



HAL
open science

Étude de la physiopathologie des formes héritable et induite d'hypertension pulmonaire

Bahgat Soilih Abdoukarim

► **To cite this version:**

Bahgat Soilih Abdoukarim. Étude de la physiopathologie des formes héritable et induite d'hypertension pulmonaire. Pneumologie et système respiratoire. Université Paris-Saclay, 2022. Français. NNT : 2022UPASQ026 . tel-03828949

HAL Id: tel-03828949

<https://theses.hal.science/tel-03828949>

Submitted on 25 Oct 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Etude de la physiopathologie des formes héritable et induite d'hypertension pulmonaire

Study of the heritable- and drug induced-pulmonary hypertension

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

École doctorale n°569, Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué (IFTA)
Spécialité de doctorat : Physiologie, physiopathologie
Graduate School : Health and Drug Sciences.
Réfèrent : Faculté de Pharmacie

Thèse préparée dans les unités de Recherche UMR_S 999 et UMR_S 1180
sous la direction de **Frédéric PERROS**, Directeur de Recherches,
et la co-direction de **Boris MANOURY**, Maître de Conférences

Thèse soutenue à Paris-Saclay, le 17 juin 2022, par

Bahgat SOILIH ABDOUL KARIM

Composition du Jury

Mme Céline DEMOUGEOT Professeur, Université de Franche-Comté (UR4267 PEPITE)	Présidente
Mme Rozenn QUARCK Professeur, Université de Louvain (BREATHE)	Rapporteuse & Examinatrice
M. Paul Mulder Professeur, Université de Rouen Normandie (UMR_S 1096)	Rapporteur & Examinateur
Mme Sophie NADAUD Chargée de Recherches, Sorbonne Université (UMR_S 1166)	Examinatrice
M. Frédéric PERROS Directeur de Recherches, Université Paris-Saclay (UMR_S 999)	Directeur de thèse
M. Boris MANOURY Maître de Conférences, Université Paris-Saclay (UMR_S 1180)	Co-directeur de thèse

Remerciements

Je voudrais, tout d'abord remercier mes parents Soilih Abdoukarim et Mariama Ali pour m'avoir soutenue dès le début de cette passionnante aventure, par leurs bénédictions qui m'ont accompagnée tout au long de ma thèse, par leurs paroles apaisantes, leur amour inconditionnel et leur confiance sans limite.

Je remercie également la Banque islamique de développement pour m'avoir accordé le financement de mes études en thèse de doctorat à l'Université Paris-Saclay. Je ne saurai jamais vous remercier pour tout le soutien moral qui vous avez manifesté durant les périodes difficiles et aussi pour tout l'engagement que vous avez fait preuve tout au long de ma thèse.

Je remercie, du fond du coeur, mon directeur de thèse, Dr Frédéric Perros, pour m'avoir fait confiance, pour m'avoir intégré dans ton équipe de l'Inserm UMR S 999 avec beaucoup de sympathie, pour m'avoir guidé et surtout aidé durant mes 3 années de thèse. Je ne saurai te remercier assez. Ton sens de responsabilité et de rigueur, ton professionnalisme et ta sympathie font de toi une grande personne. J'ai rencontré beaucoup d'obstacles dans mes travaux de recherche et la crise sanitaire qui a surgi n'a pas arrangé la situation mais tu as toujours su voir le meilleur côté des choses. Merci infiniment de ton soutien permanent et de tout ce que tu m'as appris durant ma thèse. C'était un grand honneur, pour moi, de bénéficier de ton savoir et savoir faire et surtout de tes conseils. Je te souhaite le meilleur dans la suite de ta carrière.

Je remercie infiniment, Dr Boris Manoury, mon co-directeur de thèse qui m'a accueillie chaleureusement dans le laboratoire Inserm UMR S 1180. Tu m'as appris beaucoup sur la pharmacotechnie, tu m'as fait réviser mes notions de pharmacologies et de chimie minérale. Ton côté pédagogue m'a beaucoup forgé bien que j'ai beaucoup à travailler sur l'organisation des travaux. Merci infiniment de m'avoir, sans cesse, soutenue, guidée et fait bénéficier de ton savoir et savoir-faire. Tu n'as ménagé aucun effort pour la réussite de mon projet de thèse. J'ai gardé des bons souvenirs du laboratoire U1180 où j'ai toujours apprécié l'organisation et le sens de l'humour des étudiants.

Je remercie Pr Celine Demougeot d'avoir accepté d'évaluer mon travail et de présider le jury de ma thèse. Je suis très honorée de bénéficier de vos compétences scientifiques qui m'ont beaucoup éclairée.

Je remercie Pr Paul Mulder d'avoir accepté d'être rapporteur de mon travail. C'est un grand honneur pour moi de bénéficier de votre esprit de synthèse et de votre savoir. Merci encore.

Je remercie Pr Rozenn Quarck d'avoir accepté de rapporter mon travail. Je suis très honorée et enchantée de vous avoir dans mon jury de thèse.

Je remercie Dr Sophie Nadaud d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Votre vision scientifique et vos conseils m'ont été très précieux et c'était un grand honneur de vous avoir cotoyer.

Je remercie le professeur Florent Soubrier et toute son équipe de l'UMR S 1166, qui ont été de bons collaborateurs et ont beaucoup facilité mes travaux de la première année de thèse.

Merci à Juliette Bignard pour son accueil très sympathique pendant mes passages au laboratoire U1166 et pour sa bonne collaboration.

Je remercie le professeur Marc Humbert, directeur du laboratoire Inserm U999, pour m'avoir accepté dans son unité et pour les moments d'échanges passés au laboratoire pendant les réunions du laboratoire dans le cadre des présentations des travaux des étudiants.

Je remercie également, Pr Ana-Maria Gomez qui m'a accueillie très chaleureusement dans le laboratoire U1180. C'était un grand honneur, pour moi, de bénéficier de vos connaissances pendant les réunions du laboratoire.

Je remercie très infiniment, le professeur Christian Pous pour m'avoir accepté dans l'école doctorale 569, « Innovation thérapeutique : Du fondamental à l'appliqué. C'était un grand privilège de côtoyer l'ED 569.

Je remercie infiniment le professeur Grégoire Vandecasteele pour m'avoir accepté dans l'ED 569. Merci infiniment de tes conseils dès que l'occasion se présentait. J'ai beaucoup apprécié les moments d'échanges avec vous à chaque début d'année académique

Je remercie de tout cœur, Dr Sylvia Cohen-Kamensky, de m'avoir accueilli gentiment et m'avoir intégré dans le bureau de ses étudiants.

Je remercie également Pr David Montani pour m'avoir si bien accueilli et m'avoir fait bénéficier de son savoir pendant les réunions du laboratoire U999.

Je remercie également Dr Fabrice Antigny, Dr Véronique Capuano, Dr Christophe Guignabert et Dr Ly Tu de m'avoir bien accueilli au laboratoire U999.

Je remercie également la grande dame, Yvonne Dutheil, la femme au grand cœur. Merci pour tout !

Je remercie également Dr Said Amissi et Marceau Quadredenier pour m'avoir si bien accueilli au laboratoire U999 et pour m'avoir appris beaucoup de notions de l'HTP. Vous m'avez beaucoup facilité l'accès à la bibliographie dès mes premiers jours au laboratoire.

J'adresse mes remerciements à tous mes collègues de l'U999 spécialement à Firmin Akoumia, Yassin Benahmed et Claudine pour nos moments de folies et de délire !!! C'était toujours un grand plaisir de passer du temps avec vous. Vous m'avez fait beaucoup profiter de la beauté de Paris ou de la France. Je garde de très bons souvenirs de vous 3. Vous êtes plus que des amis. Firmin, mon frère, je te souhaite bon courage et un beaucoup de succès dans ta soutenance qui approche à pas de géant.

Je remercie également Julien Gryn de ta sympathie, ton sens de l'humour et tes pâtisseries. On ne s'ennuie jamais avec toi.

Je remercie très infiniment Liting Wang, qui a été plus qu'une collègue. Tu es devenue pour moi une amie très précieuse. Je te souhaite beaucoup de courage et beaucoup de succès dans la soutenance très prochaine de ta thèse et beaucoup de succès après la thèse.

Je remercie également Grégoire Manaud, Hélène Le Ribeuz, Bastien Masson, Lucille Penalva et Marie Dutheil pour nos moments de folie au PO. C'était trop sympa.

Je remercie aussi Delphine Mika, Florence Lefebvre et toute l'équipe du laboratoire U1180 pour l'accueil que j'ai reçu dès le premier jour. C'était très sympa de me faciliter les manipes par le partage des organes des rats Wistar. Merci beaucoup de moments de convivialité passés avec vous.

Je remercie Mme Delphine Courilleau pour sa bonne collaboration dans mes travaux de recherche. Je te remercie du fond du coeur pour ta sympathie et ton accueil toujours chaleureux à la plateforme Ciblot à Chatenay Malabry.

Je remercie très infiniment toute ma famille qui a toujours été là pour moi, dans les bons comme dans les difficiles moments.

Je remercie mon meilleur ami, mon partenaire de vie, mon mari Said Ahmed Said qui m'a beaucoup soutenue, supportée et beaucoup apaisée et accompagnée. Tu es entré dans ma vie au moment où j'avais le plus besoin d'une personne patiente pour me supporter. Merci pour tout.

J'adresse mes chaleureux remerciements à Mr Said Abdallah Mchangama, ancien président de l'Assemblée nationale de l'Union des Comores, qui m'a fait confiance, soutenu et accompagné durant toute la durée de ma thèse. Ton sens de l'humour, ta générosité, ton sens de responsabilité font de toi un homme hautement placé au niveau social. Tu seras toujours mon conseiller, mon guide et mon oncle bien aimé. Je remercie aussi ta bien aimée Mme Tahamida Mzé, une grande dame au grand cœur. Merci infiniment à vous.

Je remercie tous mes amis et tous ceux qui de près ou de loin, ont contribué au bon déroulement de cette passionnante aventure.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	15
I. Le système cardiovasculaire	17
1. Les circulations systémique et pulmonaire	18
2. Les artères, veines et capillaires	21
1) Structure du tissu vasculaire	22
Les artères	22
Les veines	23
Les capillaires	23
2) Les déterminants du tonus vasculaire	24
Appareil contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs)	24
Mécanisme de la contraction du muscle lisse vasculaire	24
Régulation de la vasomotricité	27
▪ Régulation par la média	27
▪ La couche intima	28
▪ La couche adventitielle et tissu péri-adventiciel	28
3) Voies de signalisation de la vasodilatation	29
Oxyde nitrique (monoxyde d'azote ou NO)	29
Prostacycline	31
Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou EDHF	31
4) Voies de signalisation de la vasoconstriction	32
Endothéline-1	32
Sérotonine (5-HT)	33
Thromboxane A ₂ (TxA ₂)	35
II. L'hypertension pulmonaire (HTP)	36
1. Définition	36
2. Classification clinique	37
3. Stratégie de diagnostic de l'HTP	38
4. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)	39
1) Définition	39
2) Epidémiologie de l'HTAP	40
3) Diagnostic de l'HTAP	41
4) Traitements de l'HTAP	42
▪ Les antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 (ERA)	43

▪ Les Inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 (PDE5)	44
▪ Les dérivés de la prostacycline	44
▪ Les inhibiteurs calciques	44
▪ Modulation de la voie BMP	44
5) Anatomopathologie de l'HTAP	46
6) Pathogénèse de l'HTAP	48
Dysfonction endothéliale déséquilibre entre vasodilatateurs et vasoconstricteurs pulmonaires	49
Inflammation	51
Principaux médiateurs impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP	52
▪ Endothéline-1 et sérotonine	52
▪ NO et prostacycline	53
▪ Le peptide vasoactif intestinal (VIP)	54
Autres mécanismes impliqués dans l'HTAP	54
▪ Les canaux potassiques	54
▪ La superfamille de <i>Transforming growth factor beta</i> (TGFβ)	55
Facteurs de transcription (FT)	55
7) Génétique de l'HTAP	58
▪ Mutation du gène <i>BMPR2</i>	59
- Voie de signalisation BMPRII	60
- Caractéristiques de l'HTAP associée à une mutation du gène <i>BMPR2</i>	62
▪ Mutations du gène <i>KCNK3</i>	63
▪ Mutations de gènes <i>ACVRL1</i> et Endogline (<i>ENG</i>)	63
▪ Mutations d'autres gènes	63
5. Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP)	66
1) Définition	66
2) Epidémiologie	68
3) Diagnostic de la MVOP	69
Présentation clinique	69
Le cathétérisme cardiaque droit	69
Tomodensitométrie thoracique haute résolution	70
Explorations fonctionnelles respiratoires	71
Lavage broncho-alvéolaire (LBA)	71
4) Traitement de la MVOP	72
5) Anatomopathologie de la MVOP	72
Hémangiomatose capillaire pulmonaire	72
Fibrose intimale des veinules	73
Lésions artérielles	74
6) Physiopathologie de la MVOP	74

Mutations du gène <i>EIF2AK4</i>	75
▪ La protéine GCN2	76
▪ Structure de GCN2	76
- Domaine RWD (RING-finger proteins, WD repeat-containing proteins): site de régulation.	76
- Domaine Pseudokinase (PKD) ;	76
- Domaine kinase catalytiquement actif (KD) ;	76
- Domaine Histidyl-tRNA-Synthetase-like (HisRS-like), se lie à l'ARNt non chargé ;	76
- C-terminal (CTD), contribue à la liaison avec l'ARNt.	76
▪ Rôles physiologiques de GCN2	78
Association aux chimiothérapies	79
Exposition professionnelle aux solvants organiques	80
Exposition au tabac	82
Auto-immunité et conditions inflammatoires	82
Modèles animaux de la MVOP	83
6. L'HTAP induite par des médicaments	83
1) HTAP induite par les amphétamines	85
2) HTAP induite par les inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI)	86
3) HTAP induites par d'autres médicaments	87
4) Le léflunomide	88
▪ Définition, structure et métabolisme	88
▪ Mécanisme d'action	89
▪ Autres effets cellulaires et moléculaires	89
Objectifs de l'étude	91
MATERIELS ET METHODES	94
1) Evaluation de la réactivité vasculaire par la technique du myographe	96
Modèle animal	96
Isolement et préparation des tissus	97
- Prélèvement et utilisation de l'artère pulmonaire (AP) de rat	97
- Prélèvement et utilisation de l'artère pulmonaire humaine	98
- Prélèvement et utilisation de l'artère mésentériques (AM) de rat	99
Evaluation ex vivo de la vasoréactivité	99
Normalisation	101
Solutions et drogues	102
- Le KREBS	102
- La solution de KREBS enrichie en Potassium (K ⁺) (« KCl »)	102
- L'acétylcholine	102
- L'U46619	103

- Le DEANO	103
- L'ODQ	103
Agents pharmacologiques utilisés	104
Protocole expérimental utilisé	105
- Pour le projet 1 : Rôle de GCN2 dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire	105
- Pour le projet 2 : Physiopathologie des formes induites d'HTP : Cas du léflunomide	106
Analyses statistiques	106
2) Technique de Western blot	107
3) Evaluation in vitro de la viabilité et la prolifération cellulaire	111
Culture primaire de CMLs-AP	111
Mesure de la viabilité cellulaire ou test MTS	111
Mesure de la prolifération cellulaire : test BrdU (5-bromodéoxyurique)	112
Analyses statistiques	112
4) Test enzymatique : MLCK Kinase assay	112
Description du test	112
Principe du test	113
RESULTATS	115
DISCUSSION GENERALE	151
CONCLUSION	158
PERSPECTIVES	160
REFERENCES	163
ANNEXES	176

Liste des abréviations

AA : acide arachidonique

aa : acide aminé

AC : adénylate cyclase

ACH : acétylcholine

α SMA: actine

ADMA : diméthylarginine asymétrique

ADN : acide désoxyribonucléique

ADP : Adénosine diphosphate

ACVRL1 : kinase du récepteur de l'Activine A de type 1 ou ALK1

ALK1 : Récepteur de l'activine A de type 1

AMPc : adénosine monophosphate cyclique

ATP : adénosine triphosphate

BH4 : tétrahydrobioptérine

BK_{Ca} : canaux potassiques à grande conductance activés par le calcium

BMP : protéine morphogénique osseuse

BMPR2 : gène du récepteur de la protéine morphogénétique osseuse-2

BMPRII : récepteur de la protéine morphogénétique osseuse-2

Ca²⁺ : Calcium

CaM : calmoduline

CCB : inhibiteur de canaux calciques

CE : cellules endothéliales

CML : cellule musculaire lisse

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

DAG, Diacylglycérol

DC : débit cardiaque

DLCO : capacité de diffusion du monoxyde de carbone

ΔP : pression de perfusion

EIF2AK4 : *Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4*

ENG : endogline
ERK : Kinase régulée par un signal extracellulaire
ET-1 : endothéline-1
ETA : récepteur de l'ET-1 de type A
ETB : récepteur de l'ET-1 de type B
EDHF : facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
FAD : dinucléotide adénine de flavine
FMN : mononucléotide de flavine
FoxO : Forkhead box O
FT : facteur de transcription
Kv : canaux potassiques voltage-dépendants
sGC : guanylate cyclase soluble
GTP : guanosine triphosphate
GMPc : Guanosine mono phosphate cyclique
HIF : Facteurs inductible hypoxique
HTP : Hypertension pulmonaire
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire
HTAPi : HTAP idiopathique
HTAPh : HTAP héritable
5-HT : Sérotonine
IP3 : Inositol 1, 4,5- triphosphate
IP3R : récepteur de l'inositol 1,4,5- triphosphate
JAK : Janus kinase-transducteur de signal et
JNK : kinases N-terminales c-Jun
Kv : canaux potassiques voltage-dépendant
LIMK : LIM Kinase
MAPK : protéine kinase activée par les mitogènes
MEK kinase activée par des agents pathogènes
MLC : chaîne légère de myosine
MLCK : kinase de la chaîne légère de myosine

MLCP : phosphatase de la chaîne légère de myosine
MLV : muscle lisse vasculaire
MVO : maladie veino-occlusive
MVOP : maladie veino-occlusive pulmonaire
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NFAT : facteur nucléaire des cellules T activées
NIH : National Institutes of Health ou institut national de la santé
NO : nitrique oxyde ou monoxyde d'azote
NOS : monoxyde d'azote synthase
eNOS : NOS endothéliale
iNOS : NOS inductible
nNOS : NOS neuronale
NPI3K-Akt : phosphatidylinositol 3-kinase-Akt
ONOO- : peroxyneutre
P : péricyte
PAM : pression artérielle moyenne
PAPm : pression artérielle pulmonaire moyenne
PDE5 : phosphodiesterase de type 5
PGI₂ : prostacycline
PG α : protéine G α
PIP₂, Phosphatidyl inositol diphosphate
PKA: protéine kinase A
PKG: protéine kinase G
PKM2 : isozyme de la pyruvate kinase
PLC : phospholipase C
PMCA : calcium-ATPase de la membrane plasmique
REVEAL : registre pour évaluer la prise en charge précoce et à long terme de l'HTAP
RCPG : récepteur couplé à une protéine G
RE : réticulum endoplasmique
ROCK : Protéine kinase associée à Rho

ROS : espèces réactives d'oxygène

RVP : résistance vasculaire pulmonaire

RVS : résistance vasculaire systémique ou résistance systémique

SERCA : Calcium-ATPase du reticulum sarco /endoplasmique

SMAD : Homologue des mères contre la décapentaplégie (*Mothers against decapentaplegic homolog*)

SNC : système nerveux central

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3 (Transducteur et activateur de transcription)

TGF- β : Facteur de croissance transformant- β

TML : tissu musculaire lisse

TRPC : canaux cationiques à potentiel transitoire

VDCC : canaux calciques voltage-dépendants de type L

WU : unité wood

Liste des tableaux

Tableau 1. Définitions hémodynamiques de l'htp

Tableau 2. Classification clinique actualisée de l'HTP

Tableau 3. Différents sous-groupes de l'HTAP

Tableau 4. Hypertension artérielle pulmonaire héritable

Tableau 5. Signes évocateurs d'une atteinte veineuse et capillaire

Tableau 6. Classification de la MVOP

Tableau 7 : Mise à jour de la classification de l'HTAP induite par les médicaments et toxiques

Tableau 8. Concentrations croissantes utilisées dans les concentrations-réponses d'ACH

Tableau 9. Agents pharmacologiques utilisés dans l'évaluation ex vivo de la réactivité vasculaire des AP, h AP et AM

Tableau 10. Tampons utilisés dans la technique de western blot

Tableau 11. Produits utilisés dans la technique de western blot

Tableau 12 : Anticorps utilisés dans la technique de western blot

Liste des figures

Figure 1. Circulation pulmonaire et systémique

Figure 2. Evolution de la pression sanguine dans la circulation pulmonaire et systémique

Figure 3. Structure anatomique détaillée des artères, veines et capillaires

Figure 4. Schéma illustrant les changements structurels graduels dans la média de la paroi artérielle pulmonaire, passant des artères muscularisées aux vaisseaux pré-capillaires non musclés

Figure 5. Cellule musculaire lisse relâchée et contractée

Figure 6. Initiation du cycle des ponts croisés dans une cellule de muscle lisse

Figure 7. Structure d'un myofilament

Figure 8. Contraction de la cellule musculaire lisse

Figure 9. Relaxation et contraction de la cellule musculaire lisse médiée par MLCP et MLCK

Figure 10. Activité de la eNOS

Figure 11. Schéma illustrant la production de NO et de ROS par les CEs dans des conditions physiologiques, y compris les outils pharmacologiques spécifiques utilisés pour étudier la fonction vasculaire

Figure 12. Schéma résumant la synthèse et la libération des facteurs de relaxation par les CEs et leurs effets au niveau des CML

Figure 13. Synthèse de l'endothéline-1 et ses effets au niveau des CML et CEs

Figure 14. Interaction entre les produits plaquettaires, la thrombine et l'endothélium

Figure 15. Arbre décisionnel pour le diagnostic d'une HTP

Figure 16. Diagrammes circulaires montrant une comparaison des sous-groupes d'HTAP dans le registre français et le registre REVEAL

Figure 17. Mesure de la pression pulmonaire par cathétérisme droit dans le cadre du diagnostic de l'HTAP

Figure 18. Cibles moléculaires des traitements médicamenteux approuvés contre l'HTAP

Figure 19. Mécanisme d'action proposé pour Sotatercept dans l'HTAP

Figure 20. Lésions histologiques caractéristiques de l'HTAP

Figure 21. Mécanismes pathologiques clés sous-tendant les changements vasculaires dans l'HTAP

Figure 22. Schéma de la paroi artérielle en conditions physiologiques et en cas de dysfonction endothéliale

Figure 23. Représentation schématique de la perturbation immunitaire associée à l'HTAP et au remodelage vasculaire pulmonaire

Figure 24. L'endothéline-1 joue un rôle important dans le remodelage vasculaire

Figure 25. La synthèse de la sérotonine via le tryptophane dans les CEs des APs de modèles rongeurs d'HTP et de patients atteints d'HTAP

Figure 26. Rôle des facteurs de transcription dans la pathogénèse de l'HTAP

Figure 27. Mutations de BMPR2 associées à l'HTAP

Figure 28. Résumé schématique de la voie de signalisation BMPRII

Figure 29. Schéma de la transduction du signal BMP

Figure 30. Schéma des gènes de prédisposition de l'HTAP

Figure 31. Lésions vasculaires et caractéristiques pathologiques de la MVOP

Figure 32. Mesure de la PAPO par cathétérisme cardiaque droit

Figure 33. Tomodensitométrie thoracique haute résolution (TDM-HR) d'un patient atteint de MVOP

Figure 34. Lésions histologiques de la MVOP et de l'HCP

Figure 35. Lésions vasculaires pulmonaires chez un patient souffrant de MVOP (coloration à l'hématoxyline-éosine-saffron)

Figure 36 : Arbre généalogique d'une famille atteinte de MVO

Figure 37. Domaine de la serine thréonine kinase GCN2 chez les mammifères

Figure 38 : Mécanismes de la RIS (réponse intégrée au stress)

Figure 39. La MMC induit un remodelage vasculaire pulmonaire chez le rat, avec une implication veineuse et capillaire pulmonaire significative qui est fortement suggestive d'une PVOD

Figure 40. Principales expositions professionnelles identifiées par une évaluation consensuelle d'experts en aveugle chez des patients atteints de la MVOP

Figure 41. Histologie des poumons d'un patient atteint de MVOP avec des antécédents positifs d'exposition au TCE sans mutations bi-alléliques d'EIF2AK4

Figure 42. Mécanismes potentiels de la dysfonction endothéliale et de l'HTAP induits par le dasatinib

Figure 43. Structure chimique du LEF et son métabolite actif A77 1726

Figure 44. Dissection et prélèvement d'une artère pulmonaire de rat Wistar male

Figure 45. Schéma décrivant le montage d'une artère isolée sur un myographe

Figure 46 : Schéma illustrant les effets du LNAME et de l'ODQ sur la réponse vasorelaxante de l'ACH au niveau de l'AP de rat

Figure 47 : Schéma illustrant le principe de l'essai enzymatique MLCK kinase

Figure 48 : Evaluation de la capacité contractile et de la réponse à une stimulation par l'ACH (10 μ M), des AP de rats « Wild type » (WT) et KO Gcn2, mâles et femelles

Figure 49 : Etude de concentrations-réponse des agents vasoconstricteurs sur les AP de rats transgéniques KO Gcn2 et WT

Figure 50 : Réponse vasodilatatrice de l'ACH (10^{-9} M - 3.10^{-5} M) au niveau artériel pulmonaire chez les rats transgéniques KO Gcn2 et WT

Figure 51. Réponse vasodilatatrice de l'ACH (10^{-9} M - 10^{-4} M) au niveau artériel pulmonaire chez les rats transgéniques KO Gcn2 et WT

Figure 52 : La réponse vasodilatatrice induite par l'ACH ou un donneur de NO (DEANO) en présence de LNAME et celle induite par un donneur de NO en présence de LNAME, de l'ODQ chez les rats WT et KO Gcn2

Figure 53 : Expression protéique de la eNOS dans le poumon total de rats WT et KO

Figure 54. Concentrations- réponse de la phényléphrine (PE) dans l'artère pulmonaire de rat (AP) ou humaine (hAP) en présence du LEF, du TER ou du véhicule (DMSO)

Figure 55. Concentrations-réponse de l'effet contractile de la PE dans l'artère mésentérique de rat (AM) en présence de LEF, TER ou du véhicule (DMSO). Effet du LEF dans les AP à endo(-)

Figure 56. Concentrations-réponse de l'U46619 en présence de LEF, TER ou le véhicule (DMSO) dans l'AP du rat (AP) ou humaine (hAP)

Figure 57. Concentrations-réponse du potassium (K^+) en présence de LEF, TER ou le véhicule (DMSO) dans l'AP et en présence de LEF et DMSO dans l'hAP

Figure 58. Concentrations-réponse du potassium (K^+) en présence de LEF, TER ou le véhicule (DMSO) dans l'AM. Effet relaxant du LEF, TER ou DMSO dans l'AP précontractée à l'U46619 dans l'AP et l'hAP

Figure 59. Evaluation de l'effet du LEF sur les mouvements de calcium à l'aide des modulateurs calciques dans l'AP

Figure 60. Evaluation de l'effet du LEF, TER ou du véhicule (DMSO) sur la viabilité des CMLs-AP par le test de viabilité cellulaire MTS

Figure 61 : Effet de LEF sur le profil prolifératif des CMLs-AP évalué avec le test BrdU

Figure 62 : Evaluation de la capacité de prolifération par la technique de comptage cellulaires

Figure 63. Evaluation de l'activité kinase de la protéine MLCK en présence de LEF ou TER

Figure 64 : Synthèse de l'effet des différents inhibiteurs de TKI imatinib, bosutinib et dasatinib sur l'activité kinase de la MLCK

INTRODUCTION

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une condition hémodynamique et physiopathologique regroupant un ensemble de maladies cardio-pulmonaires définies par une élévation progressive de la pression sanguine dans l'artère pulmonaire à des valeurs anormales et pathologiques qui sont mesurées par cathétérisme cardiaque droit. L'HTP est répartie en cinq groupes dont l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). L'HTAP une maladie rare et sévère caractérisée par une augmentation progressive de la résistance vasculaire pulmonaire (RVP) induite par une occlusion des petites artères pulmonaires distales. Cette élévation de la RVP entraîne une hypertrophie compensatrice du ventricule droit évoluant vers la dilatation et la défaillance cardiaque droite, et par la suite le décès du patient. De nombreux facteurs sont impliqués dans la pathogenèse de l'HTAP, notamment une prédisposition génétique, des facteurs environnementaux ou une dysfonction vasculaire.

L'HTAP regroupe plusieurs pathologies ayant en commun une atteinte artérielle primitive, c'est-à-dire une pathologie intrinsèque au vaisseau pulmonaire. Ce groupe inclut la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) et l'HTAP induite par des médicaments ou chimiothérapies.

Dans cette introduction, je présenterai la circulation pulmonaire et les principaux traits de l'HTAP. Je me focaliserai ensuite sur 2 catégories d'étiologie de l'HTAP : d'une part une cause génétique, associée à un sous-groupe d'HTAP, la maladie veino-occlusive (MVO), illustrée par la déficience pour le gène *EIF2AK4* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4* ou Alpha Kinase 4 du facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2), et d'autre part, une cause iatrogène de l'HTAP, illustrée par la toxicité potentielle induite par un immunosuppresseur, le léflunomide (LEF).

I. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire est formé de deux circulations : pulmonaire et systémique ; ces deux circulations sont une structure en série et sont interconnectées par le cœur droit et le cœur gauche. C'est un circuit fermé qui a pour rôle de permettre d'une part le transport du sang et d'autre part les échanges avec les différents tissus. Le cœur est une pompe qui éjecte, continuellement, le sang avec un débit cardiaque (DC) important de l'ordre de 5 à 6L/min vers les organes. La vascularisation est un réseau de tubes ou vaisseaux qui transportent le sang dans les tissus. Elle régule le flux sanguin local et la perméabilité vasculaire pour distribuer l'oxygène et les nutriments nécessaires aux cellules. Elle contrôle aussi le passage des cellules inflammatoires à travers la membrane interne en contact avec le flux sanguin. La pression de perfusion (ΔP), qui est la différence entre la pression artérielle et la pression veineuse, influence directement la perfusion tissulaire. Pour comprendre les mécanismes vasculaires, deux lois sont essentielles : les lois d'Ohm et de Poiseuille. Pour la loi d'Ohm, ΔP dépend du produit du DC et de la résistance vasculaire (R).

La résistance vasculaire représente la résistance au flux sanguin du vaisseau. Quant à la loi de Poiseuille, elle met en relation la quatrième puissance du rayon du vaisseau (r), la longueur du vaisseau (L) et la viscosité sanguine (η) : $R = 8\eta L/\pi r^4$. Ainsi, la loi de Poiseuille met en exergue l'impact du rayon sur la résistance. La section de rayon est en effet quantitativement et physiologiquement la plus importante du fait qu'elle dépend de l'épaisseur de la paroi, du tonus vasculaire et de l'état contractile du muscle lisse vasculaire (MLV). Par exemple une réduction de 50% du rayon multiplie la résistance par 16.¹⁻³

1. Les circulations systémique et pulmonaire

La circulation systémique ou grande circulation, a pour rôle de distribuer l'oxygène et les nutriments nécessaires aux muscles et aux organes et la circulation pulmonaire ou petite circulation, a pour rôle d'assurer la réoxygénation du sang par les poumons et l'élimination, par ces derniers, du gaz carbonique et certains déchets de l'organisme (**Figure 1**). Les systèmes systémique et pulmonaire comprennent chacun trois compartiments vasculaires : artériel, capillaire et veineux. L'aorte, par sa structure d'une artère élastique et épaisse, est capable de supporter des pressions élevées lors de la contraction du ventricule gauche (systole). Les artérioles (diamètre de l'ordre de 8 à 60 μ m) sont le siège de la résistance vasculaire ; elles sont riches en cellules musculaires lisses (CML), ce qui lui confère une aptitude de vasomotricité. Elles se ramifient finalement en capillaires qui représentent le lieu unique permettant l'échange de molécules, de gaz et d'eau entre le sang et les tissus. Le ventricule droit ne doit assurer l'irrigation sanguine que des poumons, ce qui explique sa structure fine par rapport à celle du ventricule gauche car la RVP est inférieure à la résistance systémique (RVS) et ainsi une faible pression caractérise les poumons. La circulation pulmonaire doit accueillir tout le DC à l'exception d'une petite proportion (environ 1%) qui passe dans la circulation bronchique mais qui est considérée comme négligeable.^{1,4,5} (Figure 1).

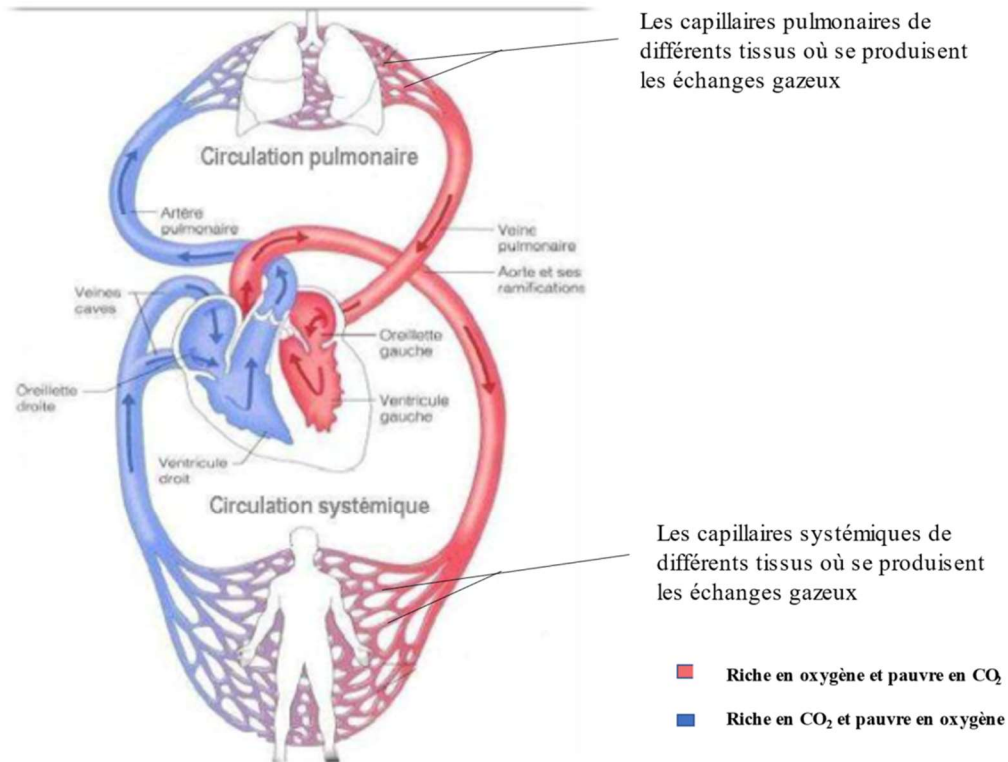


Figure 1 : Circulations pulmonaire et systémique. Le côté droit du cœur est la pompe de la circulation pulmonaire en transportant le sang qui va vers les poumons puis revient vers le côté gauche du cœur. Le côté gauche du cœur est la pompe de la circulation systémique, en transportant le sang vers les tissus de l'organisme, puis le ramène au cœur où il entre par le côté droit. Le sang qui circule dans la circulation pulmonaire s'enrichit en oxygène (O₂) et rejette le dioxyde de carbone (CO₂) (passage du bleu au rouge). Quant au sang de la circulation systémique, il distribue son O₂ et absorbe le CO₂ (passage du rouge au bleu) (Issue de⁶).

La pression artérielle moyenne (PAM) se définit par

$$PAM = \frac{1}{3} \text{ Pression systolique} + \frac{2}{3} \text{ Pression diastolique},$$

les pressions systolique et diastolique étant les deux extrêmes de la pression pulsée due à l'alternance de la contraction (systole) et la relaxation (diastole) des ventricules.

La circulation pulmonaire est un circuit à basse pression qui véhicule le sang dans un circuit court au niveau des poumons. La vascularisation pulmonaire normale assure un réseau de haute compli-ance et de faible résistance qui facilite les échanges gazeux, à une large étendue, dans le poumon.⁶ Dans la circulation pulmonaire, la PAM est de 12 mm Hg (20 mm Hg pour la pression systolique, et 8 mm Hg pour la pression diastolique). La pression aortique moyenne est plus élevée : 93 mmHg (120 mmHg : pression systolique et 80 mm Hg : pression diastolique) (**Figure 2**)

Aussi, d'après la loi d'Ohm citée plus haut, pour un même DC, la RVP est plus faible que la RVS (loi d'Ohm). Cette particularité est due à un circuit plus court au niveau de la circulation pulmonaire, à un développement moins important du muscle lisse vasculaire (MLV) dans la média et à une plus grande lumière par rapport à la taille des artérioles pulmonaires, contrairement aux artérioles systémiques⁵ (**Figure 2**). Une autre différence entre la circulation systémique et la circulation pulmonaire est le site principal induisant la résistance. En effet, dans la circulation systémique, seules les artérioles sont responsables de la résistance alors que dans la circulation pulmonaire, tous les vaisseaux contribuent à la résistance notamment les artérioles (50%), les veines (10%) et les capillaires (40%).⁶

En raison des faibles pressions, la circulation pulmonaire est très sensible aux influences mécaniques, et la paroi fine du ventricule droit est moins ou insuffisamment préparée à s'adapter aux changements rapides des conditions de charge. À l'inverse, dans la circulation systémique, les artérioles génèrent une résistance systémique nécessaire pour induire la haute pression requise permettant de conduire le sang à grand volume et longue distance.¹

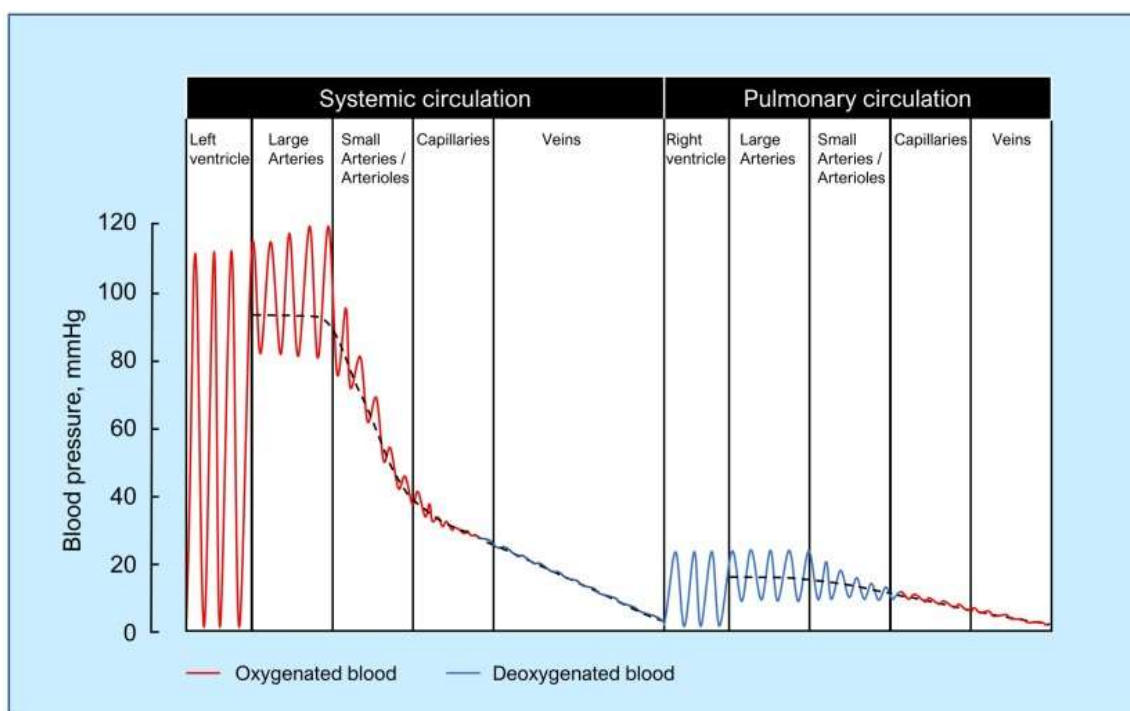


Figure 2 : Evolution de la pression sanguine dans la circulation pulmonaire et systémique

2. Les artères, veines et capillaires

La paroi vasculaire est typiquement composée de 3 couches ou tuniques superposées concentriques : l'intima, la media et l'adventice (**Figure 3**). Ces tuniques sont plus ou moins développées suivant le compartiment vasculaire. L'intima, est formée d'une monocouche de cellules endothéliales (CEs) reposant sur une membrane basale. C'est la couche la plus interne en contact direct avec le flux sanguin.⁷ La média, tunique intermédiaire, est composée de cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs) et de tissu conjonctif comprenant des fibroblastes, des fibres élastiques et des fibres de collagène. L'adventice, la couche la plus externe, est composé de tissu conjonctif comprenant des fibroblastes, des fibres élastiques, des fibres nerveuses des systèmes sympathique et parasympathique, des adipocytes et des vasa vasorum (pour les gros vaisseaux). (**Figure 3**)

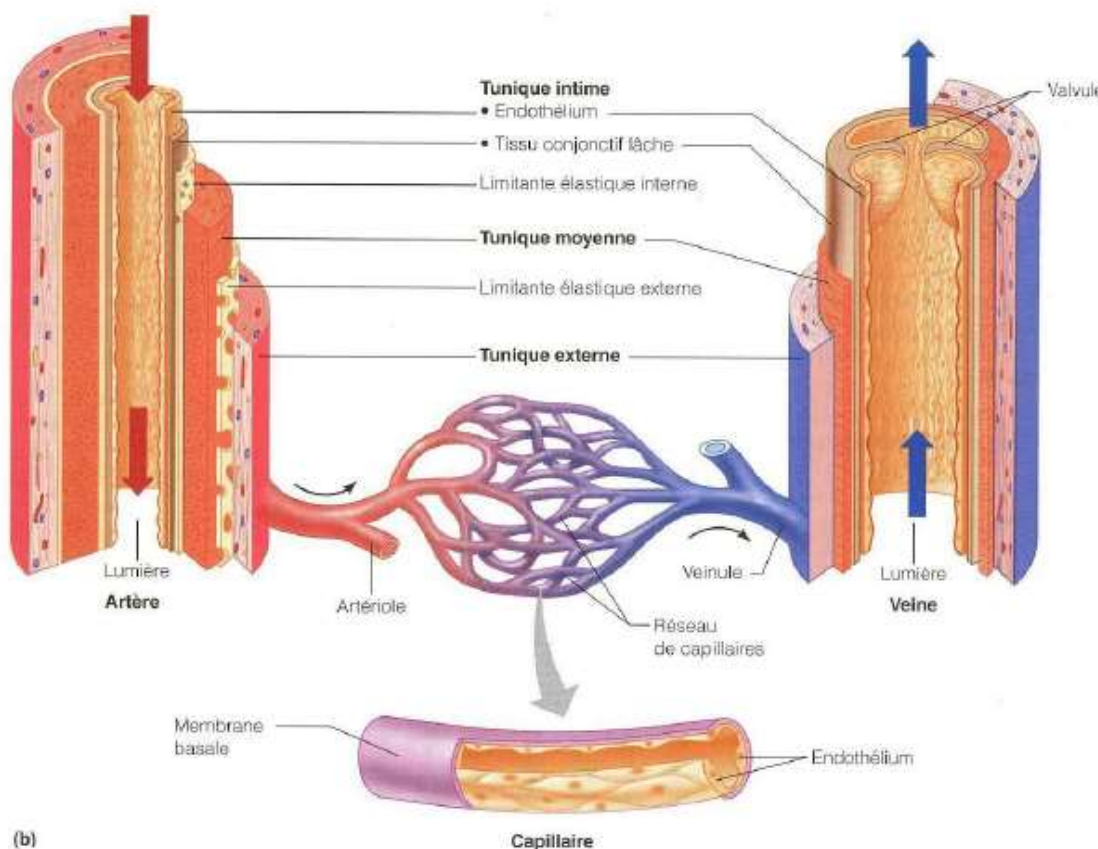


Figure 3 : Structure anatomique détaillée des artères, veines et capillaires (issue de ⁷).

1) Structure du tissu vasculaire

Les artères

Les artères peuvent être classées en 3 catégories : l'artère élastique ou de conduction ; l'artère musculaire ou de distribution et l'artère de résistance ou artériole. L'artère élastique ou de conduction comprend les grosses artères telles que l'aorte et ses principales branches, le tronc pulmonaire et les premières branches de l'artère pulmonaire (AP). Ces artères élastiques possèdent une grande quantité de fibres d'élastine et de collagène dans la média, une lame élastique interne à peine visible, ayant la capacité de s'étirer en réponse à l'éjection cardiaque, et des CMLs. Ces artères élastiques donnent des ramifications appelées artères musculaires ou de distribution, notamment les artères radiales, fémorales, cérébrales et coronaires. La média des artères musculaires est composée de moins de fibres élastiques et de plus de CMLs. Les artères musculaires présentent une lame élastique interne et une lame externe clairement visibles et sont capables de vasomotricité. Les artères musculaires se ramifient progressivement en petites artères de résistance ou artérioles. Au fur et à mesure des ramifications, il y a une perte de la lame élastique externe, une lame élastique interne inconstante et la diminution progressive du nombre de CMLs dans la média⁸. L'aboutissement de la ramification des artérioles est la vascularisation ou microcirculation capillaire (**Figure 4**).

Il existe donc, selon les artères, une lame élastique interne (mince couche de fibrilles de collagène et de fibres élastiques entre l'intima et la média) et une lame élastique externe (mince couche de collagène et de fibres élastiques entre la média et l'adventice). Comparé à celle des veines, la média des artères est plus épaisse, riche en CMLs et fibres élastiques, mais plus pauvre en collagène.⁸(**Figure 3**)

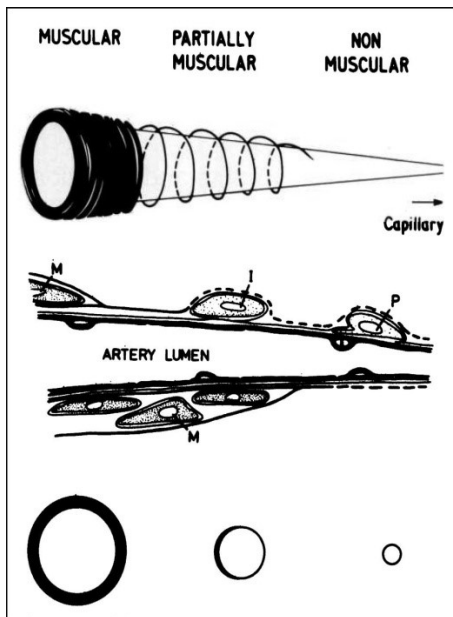


Figure 4. Schéma illustrant les changements structurels graduels dans la média de la paroi artérielle pulmonaire, passant des artères muscularisées aux vaisseaux pré-capillaires non musclés. L'image supérieure illustre la perte progressive de la musculature. L'image du milieu montre la transition des CMLs (M) aux cellules intermédiaires (I) et enfin aux péricytes (P). L'image du bas représente des coupes transversales, mettant en évidence la couverture circconférentielle partielle de la média. Les artères musculaires ont un diamètre moyen d'environ 4mm ; les artères partiellement musculaires ou artérioles environ 30µm et les artères pré-capillaires environ 8µm (Issue de 5).

Les veines

Les veines sont précédées par des veinules drainant le sang des capillaires. Elles sont formées d'une lumière plus importante. Les veines sont caractérisées par une configuration différente de celle des artères en raison de leurs pressions plus faibles. Elles ont une paroi plus fine, une élasticité moindre et un adventice collagénique plus épais. Les veines de plus grande taille peuvent également être dotées de valvules semi-lunaires pour faciliter la circulation du sang et empêcher le retour du sang veineux. ⁹

Les capillaires

Le réseau capillaire est la microcirculation entre une artériole et une veinule. C'est un réseau de vaisseaux microscopiques à paroi mince composé d'une monocouche de CE reposant sur une membrane basale.¹⁰ Il existe des sphincters post-capillaires situés entre les capillaires et les veinules.¹¹ (**Figure 3**).

2) Les déterminants du tonus vasculaire

Appareil contractile des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLs)

Les CMLs sont des cellules fusiformes avec la majorité de leur cytoplasme occupée par l'appareil contractile comprenant des filaments fins (actine) et des filaments épais (myosine). Ces filaments d'actine et de myosine convertissent l'énergie chimique en énergie mécanique induisant la force et le mouvement. Les filaments d'actine sont attachés à des corps denses servant d'ancrage pour leur permettre d'exercer une force. Les CMLs sont attachées entre elles par des jonctions adhérentes majoritairement constituées d'alpha-actinine¹⁰, jouant le rôle de couplage mécanique et des jonctions gap favorisant la communication électrique. La dépolarisation se propage rapidement en passant de cellule en cellule⁸. (Figure 5)

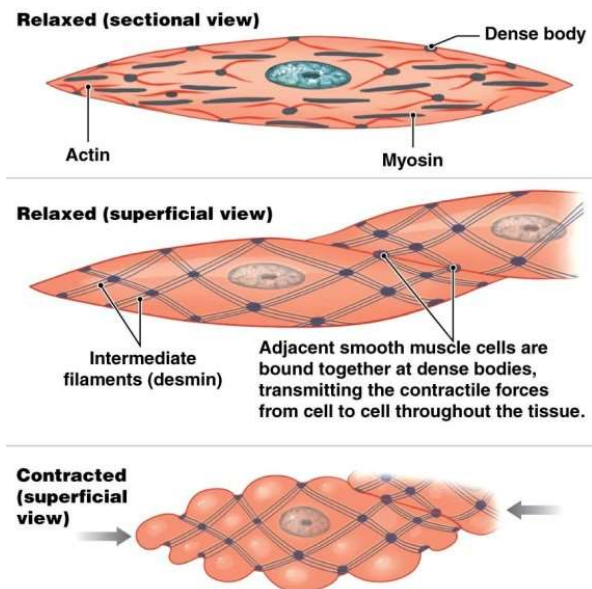


Figure 5 : Cellule musculaire lisse relâchée et contractée (Pearson Education, Inc)

Mécanisme de la contraction du muscle lisse vasculaire

La contraction des CMLs est induite par des stimuli chimiques (activation de récepteurs couplés à une protéine Gq (RCPGq) et la phospholipase C, PLC), des stimuli électriques (la dépolarisation membranaire ou activation d'un récepteur canal calcique) et par d'étirement des CMLs. Ensuite, différentes voies de signalisation sont, à leur tour, induites conduisant à une augmentation de la concentration du calcium (Ca^{2+}) intracellulaire. En effet, différents canaux s'ouvrent et le Ca^{2+} pénètre dans le cytoplasme via son gradient électrochimique. Ces canaux sont les canaux calciques situés sur la membrane plasmique tels que les canaux cationiques à potentiel transitoire (TRPCs) et les canaux

calciques voltage-dépendants de type L (VDCC) et ceux situés sur le réticulum endoplasmique (RE) tels que le récepteur inositol triphosphate, IP3 (IP3R)^{12,13}

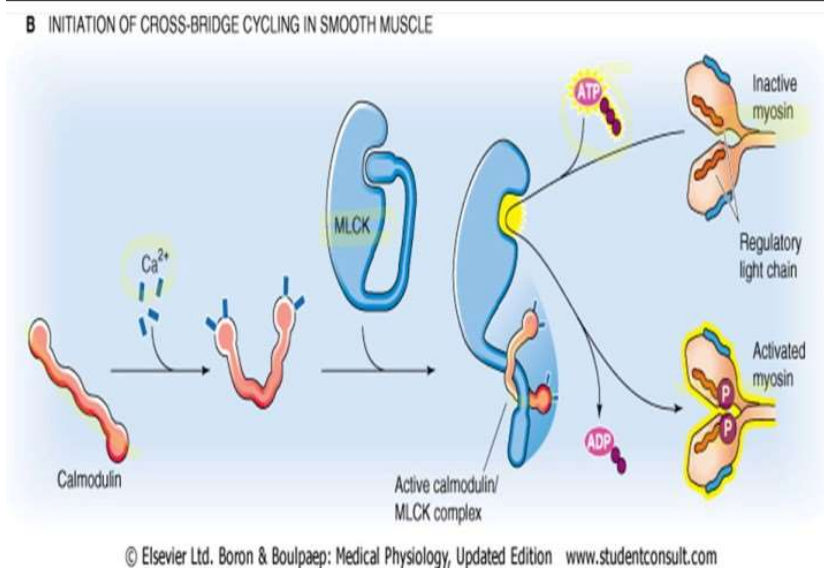


Figure 6 : Initiation du cycle des ponts croisés dans une cellule de muscle lisse.

La liaison du Ca²⁺ cytoplasmique à la calmoduline (CaM) initie la contraction des CMLs. Le complexe formé active la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK), une enzyme capable d'activer les têtes de myosine en phosphorylant la sérine 19 de la chaîne légère de myosine (MLC) régulatrice en présence d'adénosine triphosphate (ATP) (**Figure 6**). Cette phosphorylation conduit à l'initiation de ponts croisés entre les têtes de myosine et les filaments d'actine et le cycle des ponts croisés augmente la tension le long de toute la chaîne des structures contractiles, ce qui entraîne la contraction du tissu musculaire lisse (TML).⁸(**Figures7 et 8**).

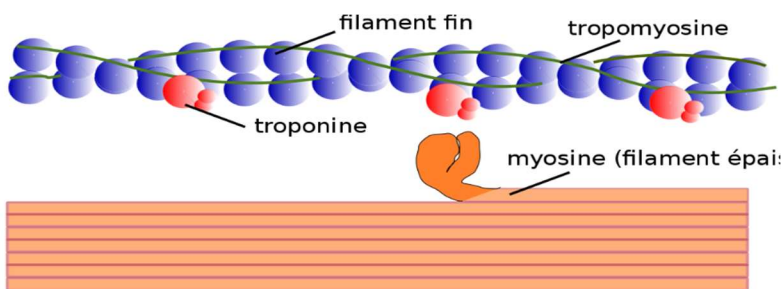


Figure 7. Structure d'un myofilament. Le myofilament ou myofibrille est une fibre contractile formée d'actineet de myosine localisée à l'intérieur des cellules musculaires lisses (CML). La zone sombre est formée de filament épais de Myosine et la zone claire est formé de filament fin d'actine (issue de ¹⁴)

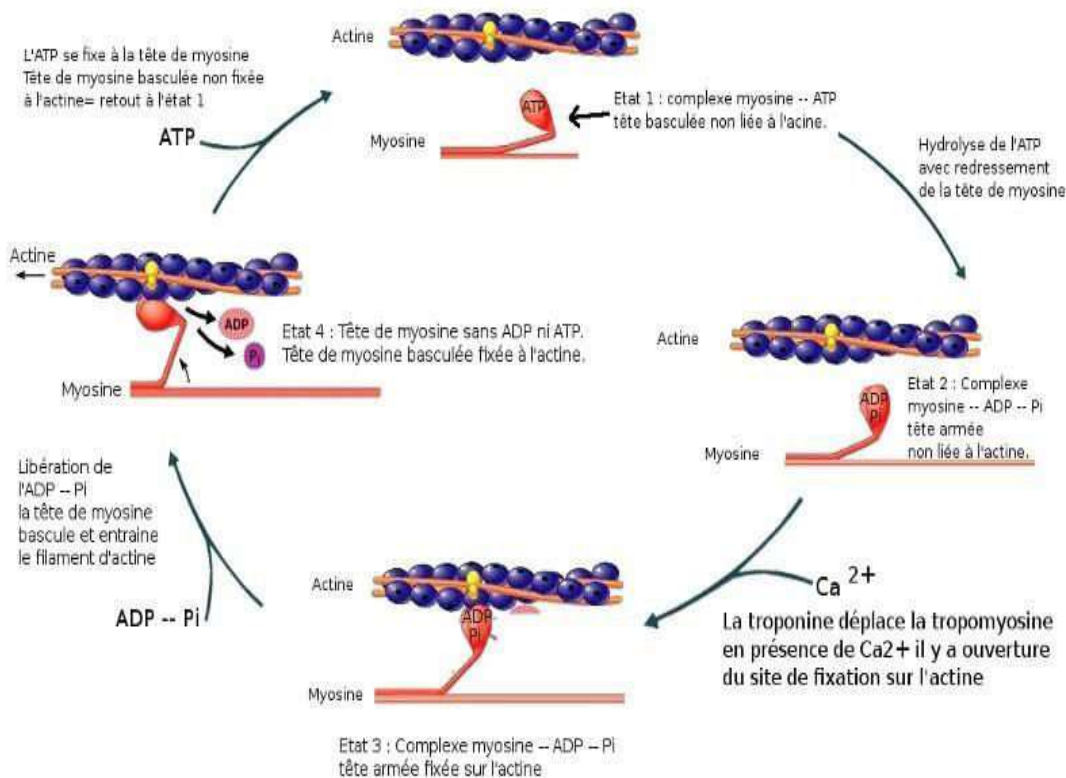


Figure 8. Contraction de la cellule musculaire lisse. Elle commence par une fixation d'une molécule d'ATP sur la tête de myosine formant le complexe myosine-ATP. **Etape 1** : La tête de myosine, basculée et non liée à l'actine, hydrolyse la molécule d'ATP en ADP + Pi. Les produits de cette réaction restent attachés à la tête de myosine. **Etape 2** : Formation du complexe myosine-ADP-Pi avec la tête de myosine dressée. Le Ca²⁺ se fixe sur la troponine qui subit un changement de conformation spatiale et entraîne un déplacement de la tropomyosine adjacente, d'où la formation du complexe troponine-tropomyosine. Il en résulte une ouverture de site de fixation de la tête myosine sur le filament d'actine. **Etape 3** : La tête de myosine se fixe sur l'actine et il y a libération d'une molécule de Pi. Lorsque la tête de myosine s'attache à l'actine, elle s'incline vers le centre du sarcomère et pivote de 45° à 90°. La myosine fait avancer le filament d'actine au centre du sarcomère et induit le raccourcissement du sarcomère. **Etape 4** : La molécule d'ADP se détache et une autre molécule d'ATP se fixe lorsque s'achève l'inclinaison de la tête de myosine. Celle-ci bascule fixée à l'actine. La fixation de l'ATP permet de réduire l'affinité de la tête de myosine pour le filament d'actine et d'entraîner le détachement de la myosine sur l'actine. Et un nouveau cycle commence(issu de¹⁵)

Le niveau de contraction est lié au niveau de phosphorylation de la sérine 19 de la MLC qui est phosphorylée par la kinase MLCK et déphosphorylée par la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP). La vasorelaxation est induite lorsque la MLC régulatrice est déphosphorylée et lorsque le Ca²⁺ est éliminé du cytoplasme par des pompes à Ca²⁺ telles que la Ca²⁺-ATPase du réticulum sarco /endoplasmique (SERCA) qui permet le repompage du Ca²⁺ pour diminuer l'activité de la MLCK, de la Ca²⁺-ATPase de la membrane plasmique (PMCA) et de l'échangeur Na⁺/Ca²⁺.¹⁶

Régulation de la vasomotricité

Il existe des mécanismes communs à tous les types de vaisseaux. Cependant, nous nous sommes principalement concentrés sur les médiateurs impliqués dans la régulation de la circulation pulmonaire.

▪ Régulation par la média

La média est le principal élément impliqué dans la régulation du tonus vasculaire basal et du diamètre de la lumière vasculaire. Cette activité contractile permet de maintenir une pression sanguine et une perfusion tissulaire normale. Le tonus vasculaire est contrôlé par des mécanismes intrinsèques (tonus myogénique), des médiateurs paracrines ou autocrines provenant principalement des CEs et CMLs de l'AP (CMLs-AP), et aussi par des neurotransmetteurs (noradrénaline) ou des médiateurs circulants libérés par d'autres cellules et organes (angiotensine II...).

Le tonus myogénique est un mécanisme de contraction intrinsèque dû à la pression intraluminaire associée à une dépolarisation membranaire et un influx calcique au niveau des CMLs-AP. Aussi, certains RCPGq induisent des voies de signalisation dont certaines seront décrites section 4 (Récepteurs de l'endothéline-1). L'activation de ces récepteurs stimule la libération de Ca^{2+} du RE par le médiateur intracellulaire IP3 qui active l'IP3R. Cette activation induit également, via le RCPG α_{12} , l'activation de la protéine Rho-kinase qui va inhiber la MLCP et ainsi la relaxation tout en favorisant la contraction. Cette MLCP, contrairement à la MLCK, déphosphoryle la MLC régulatrice (Figure 9).¹⁶

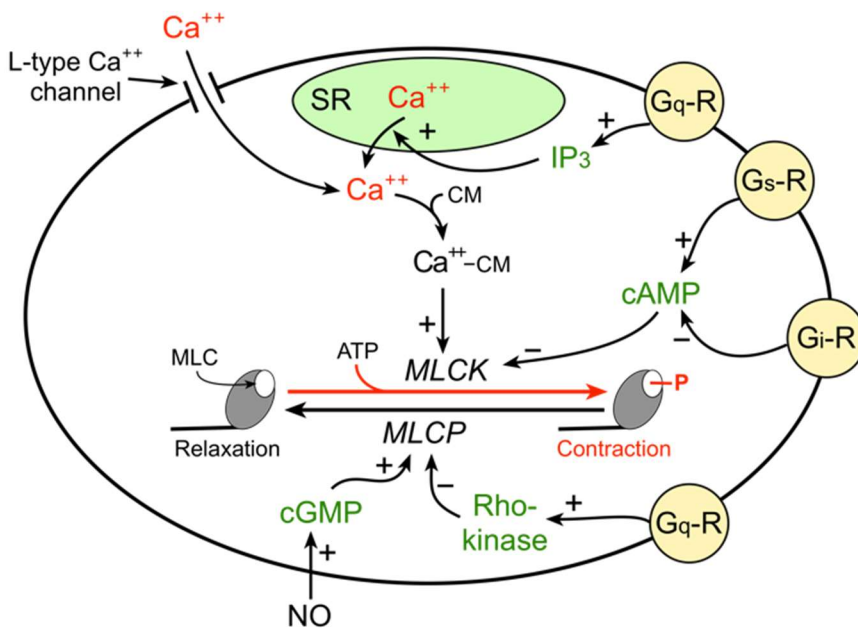


Figure 9 : Relaxation et contraction de la cellule musculaire lisse médiée par MLCP et MLCK(Issue 17).

▪ La couche intima

L'endothélium constitue une interface entre le compartiment sanguin et la média. Il a pour rôle de réguler divers processus dont le tonus vasculaire, la coagulation et la fibrinolyse, l'angiogenèse et les réponses inflammatoires et immunitaires. En raison de son implication dans ces différentes fonctions physiologiques, les dommages endothéliaux induisent diverses perturbations homéostatiques du microenvironnement conduisant au développement d'états pathologiques.⁹ L'endothélium peut réagir aux changements de pression, de débit sanguin et de concentration de gaz par la production de médiateurs du tonus induisant soit la relaxation, soit la contraction des CMLs-AP afin de maintenir une pression sanguine et une perfusion tissulaire adaptée.⁹ Les médiateurs vasorelaxants comprennent notamment le monoxyde d'azote (NO), la prostacycline (PGI₂) et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (EDHF)^{1,18} et les médiateurs vasoconstricteurs comprennent l'endothéline-1 (ET-1).¹

La contraction vasculaire induite par l'endothélium peut être due à une altération des voies liées à la relaxation par une diminution de la production de NO, ou par une formation de radicaux libres dérivés de l'oxygène (anions superoxydes qui détruisent le NO et induisent une diminution de sa biodisponibilité) et une augmentation de la production d'agents vasoconstricteurs tels que l'ET-1. Plusieurs enzymes synthétisés par les CE, tels que la xanthine oxydase, la nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydase, la cyclooxygénase et la eNOS (par manque de L arginine (L-Arg) ou de tétrahydrobioptérine (BH₄)) peuvent produire des anions superoxydes qui régulent à la baisse la production de NO.¹⁹

▪ La couche adventitielle et tissu péri-adventiciel

L'adventice est la couche vasculaire la plus externe qui joue un rôle de soutien structurel, d'innervation et d'irrigation. Il abrite les fibroblastes. Dans des états pathologiques comme l'HTP, les fibroblastes ont la capacité de se différencier en myofibroblastes capables de migrer et présentant une augmentation marquée de la production de matrice extracellulaire (collagènes, élastine, fibronectine).²⁰ De plus, la sécrétion de facteurs de croissance par les fibroblastes peut conduire au remodelage des couches vasculaires, en particulier au niveau de la couche médiale et adventitielle où elle induit la prolifération des CMLs-AP et des fibroblastes. Les fibroblastes peuvent également recruter des cellules immunitaires et inflammatoires.²⁰⁻²³

3) Voies de signalisation de la vasodilatation

Oxyde nitrique (monoxyde d'azote ou NO)

Le NO est synthétisé dans l'endothélium à partir de la L-Arg par la NO synthase (NOS) endothéliale dans tous les types de vaisseaux. Il existe trois isoformes de la NOS : la NOS endothéliale (eNOS) et la NOS neuronale, à activité constitutive et dépendante du Ca^{2+} intracellulaire, et la NOS inducible, indépendante du Ca^{2+} , qui s'exprime en réponse aux cytokines et à d'autres stimuli. Les NOS sont des enzymes homodimères oxydoréductases qui sont composées, d'une part, d'un domaine oxygénase au niveau amino-terminal contenant les sites de liaison de l'arginine et le cofacteur : l'hème BH₄ et d'autre part, d'un domaine réducteur au niveau C-terminal avec des sites de liaison pour les donneurs d'électrons tels que la NADPH, le mononucléotide de flavine (FMN) ou le dinucléotide adénine de flavine (FAD).²⁴ La production de NO et l'activité de la eNOS dépendent d'autres substrats et cofacteurs tels que le fer, la CaM, le Ca^{2+} et l'oxygène. Le Ca^{2+} provient de voies intracellulaires générées par la liaison d'agonistes (tels que l'acétylcholine (ACH), l'ATP) sur les RCPG α_q .^{1,13} La eNOS, couplée au BH₄, peut produire du NO par sa fonction oxygénase mais elle peut également produire de l'anion superoxyde (espèces réactives d'oxygène ou ROS) par sa fonction réductase qui dépend du NADPH, en l'absence de BH₄ ou si l'enzyme est sous forme découplée (monomérique) (Figure 10).

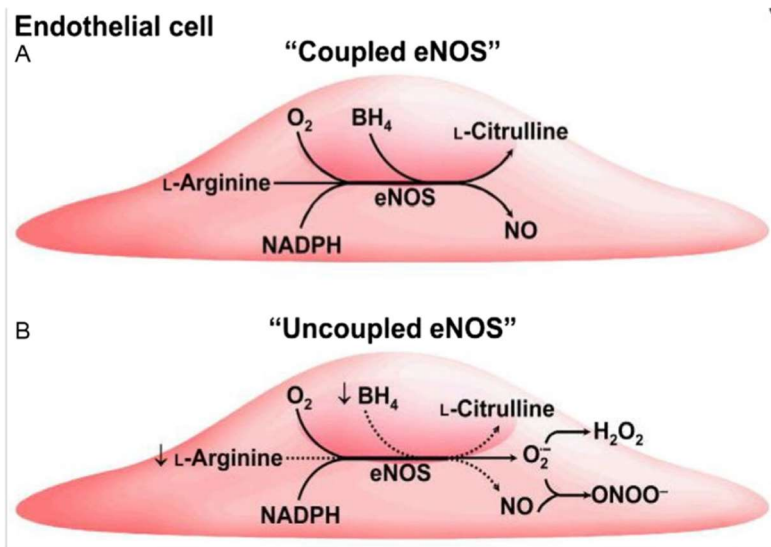


Figure 10. Activité de la e NOS. (A) À l'état couplé, la eNOS (NOS-3) synthétise du NO en présence de L-Arg et de BH₄; (B) À l'état découplé, la eNOS synthétise l'anion superoxyde d'anions O₂⁻ dans des conditions où la BH₄ et/ou la L-Arg sont à des niveaux faibles. (Issue de²⁵).

Une fois synthétisé au niveau endothélial, le NO diffuse dans la couche médiane où il est le principal vasodilatateur des CMLs-AP en réduisant la concentration intra-cytosolique de Ca^{2+} . Le NO active la

guanylate cyclase soluble (sGC) qui transforme le GTP en GMP cyclique (GMPC) (**Figure 11**). Ensuite, le GMPC active une protéine kinase G (PKG) qui inhibe la libération de Ca^{2+} du RE par l'IP3 et augmente l'absorption de Ca^{2+} par la pompe SERCA. La PKG stimule également la MLCP qui favorise la diminution de la phosphorylation de la MLC régulatrice puis la relaxation. La PKG inhibe également les canaux Ca^{2+} et stimule les canaux potassiques de la membrane plasmique aboutissant à une diminution du Ca^{2+} intracytosolique via la repolarisation du potentiel de membrane.^{18,26} Aussi, le NO a des effets anti-prolifératifs sur les CMLs-AP.²⁷

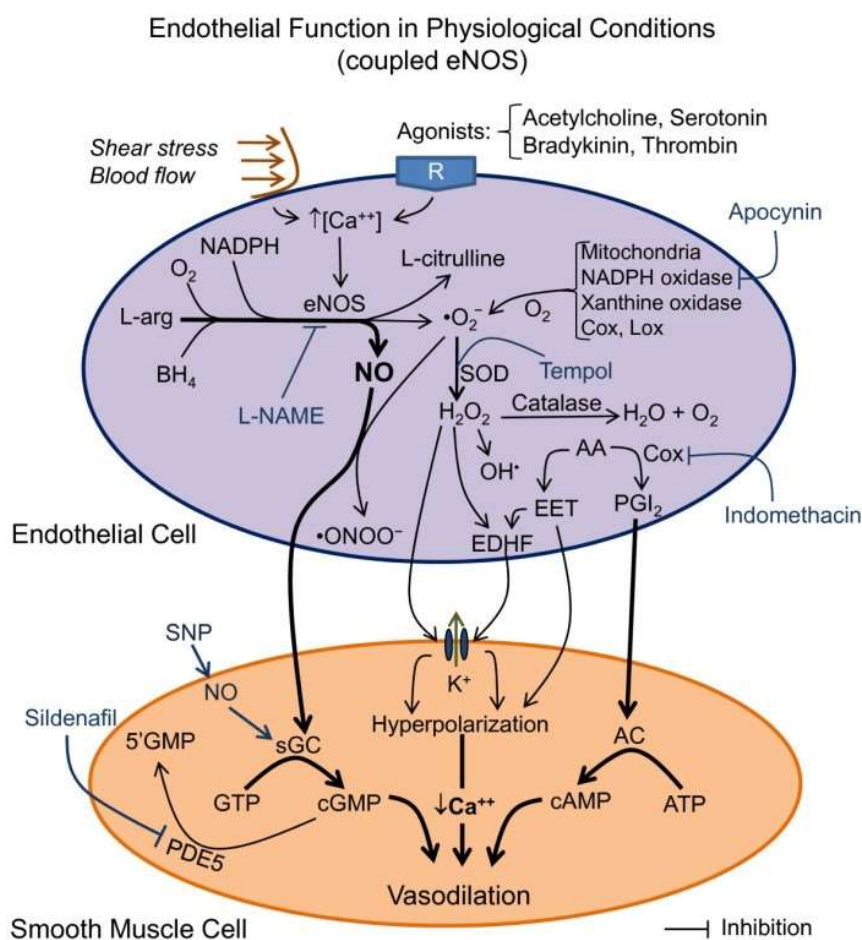


Figure 11 : Schéma illustrant la production de NO et de ROS par les CE dans des conditions physiologiques, y compris les outils pharmacologiques spécifiques utilisés pour étudier la fonction vasculaire (lignes bleues). Les voies prédominantes conduisent à une vasodilatation endothéliale normale (des lignes/flèches épaisses). AA, acide arachidonique ; Cox, cyclooxygénases ; EET, acides époxyeicosatriénoïques ; H₂O₂, peroxyde d'hydrogène ; L-arg, L-arginine ; Lox, lipoxygénases ; NADPH, nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ; $\cdot\text{O}_2^-$, anion superoxyde ; $\cdot\text{ONOO}^-$, peroxyde nitrite ; PDE5, phosphodiesterase de type 5 ; PGI₂, prostacycline ; sGC, guanylatecyclase soluble ; SOD, superoxyde dismutase (issue de¹³).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) sont produites par le métabolisme normal de l'oxygène et le cytochrome C oxydase. Elles jouent des rôles importants dans la signalisation cellulaire. Dans l'endothélium, il existe deux voies capables de produire des ROS tels que le superoxyde (O_2^-) ; soit la production par la eNOS couplée au BH4 et la NADPH oxydase ; soit dans des conditions de stress oxydatif où il y a une diminution de la concentration en BH4 induisant un découplage de la eNOS avec le BH4 et donc une production de ROS par la eNOS (Figure 10). L'excès de superoxyde non seulement réduit la biodisponibilité du NO mais aussi transforme le NO en peroxynitrite (ONOO-) (Figure 11). Le ONOO- induit de nombreux processus délétères dont l'apoptose, la nécrose et l'inflammation et l'excès de ROS comme celui observé dans des conditions pathologiques.¹³

Prostacycline

La prostacycline ou PGI2 est un prostanoïde produit au niveau de l'endothélium, dérivé de l'acide arachidonique (AA). En effet, la prostaglandine PGH2, qui est produite dans les CEs à partir de l'AA par la cyclooxygénase (COx) des acides gras, est un substrat pour les PGI2 et les thromboxanes (TxA2) synthases pour produire respectivement la PGI2 et la TxA2.²⁸ La PGI2 agit sur le récepteur de la prostaglandine I2 (IP) couplé à l'adénylate cyclase (AC) dans les CMLs-AP. Cette enzyme produit le nucléotide cyclique AMPc à partir de l'ATP. L'AMPc induit une vasodilatation par divers mécanismes²⁹, et une inhibition de la prolifération des CMLs-AP.^{13,30} (**Figure 12**) De plus, la PGI2 inhibe l'adhésion des plaquettes.¹⁴

Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium ou EDHF

Le rôle et la voie intracellulaire de l'EDHF restent controversés. Il est décrit initialement comme un facteur endothélial hyperpolarisant produit à la suite de la stimulation par des agonistes des récepteurs endothéliaux, tels que l'ACH ou la bradykinine. Il pourrait également provenir des acides époxyeicosatriénoïques produits à partir de l'AA (**Figure 12**). Par divers mécanismes, il aboutit in fine à l'ouverture des canaux potassiques dans les CMLs-AP, entraînant une hyperpolarisation et, par conséquent, l'inhibition de l'influx de Ca^{2+} dépendant du potentiel via les VDCC. Ce qui provoque la relaxation des CMLs-AP.^{13,28} (**Figure 12**)

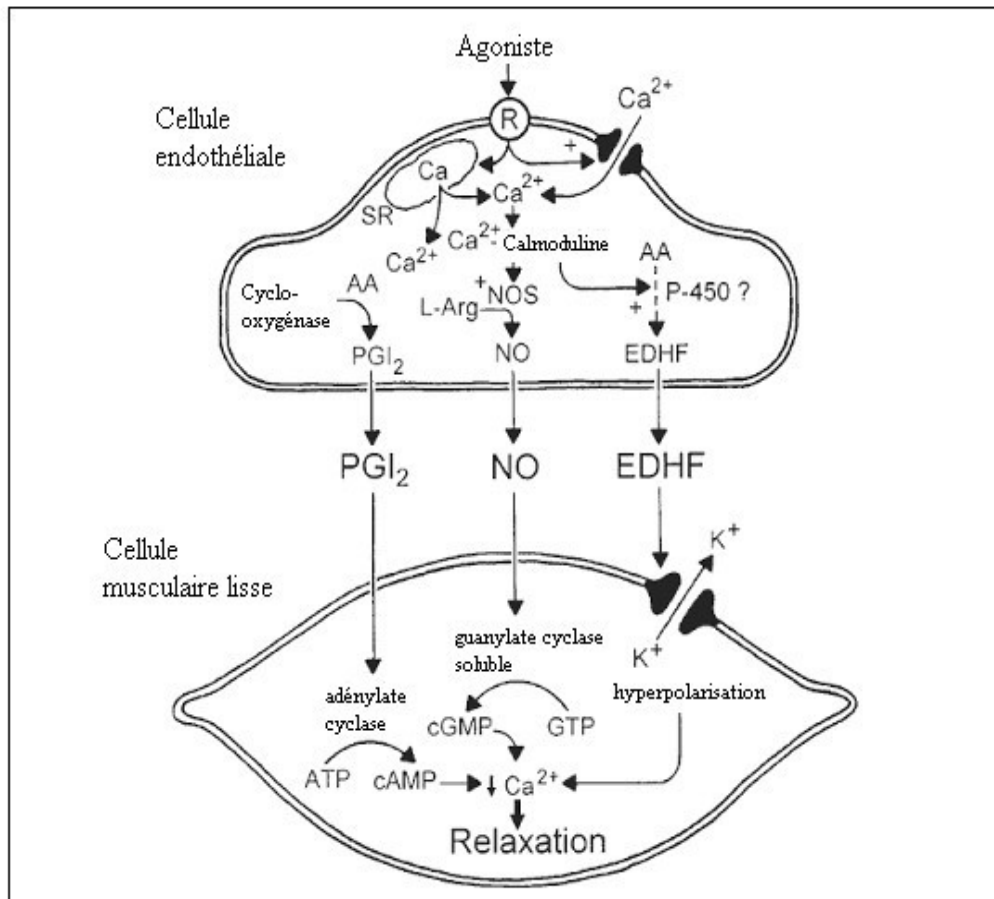


Figure 12 : Schéma résumant la synthèse et la libération des facteurs de relaxation par les CE et leurs effets au niveau des CML. AA : acide arachidonique. (Issue de³¹)

4) Voies de signalisation de la vasoconstriction

Endothéline-1

L'endothéline-1(ET-1) est un peptide de 21 acides aminés synthétisé sous forme de préendothéline-1 (PPET-1) et secrété par les CE vasculaires de tous les types de vaisseaux. Le précurseur est ensuite clivé par une endopeptidase neutre pour former le précurseur proendothéline-1 (également connu sous le nom de Big ET-1) qui est finalement transformée en ET-1 mature par l'enzyme-1 de conversion de l'endothéline (ECE-1).³²

L'ET-1 est un puissant vasoconstricteur qui agit par l'intermédiaire de 2 types de RCPG α_q : ETA et ETB. La contraction est principalement due à l'ETA et dans une moindre mesure à l'ETB dans les CMLs-AP. Les récepteurs ETA et ETB sont tous deux exprimés dans les CMLs-AP et ils stimulent la contraction, la prolifération et la migration. La stimulation de l'ETB exprimé par les CE favorise la vasodilatation par la production de NO et de PGI₂.^{1,29,30}(**Figure 13**)

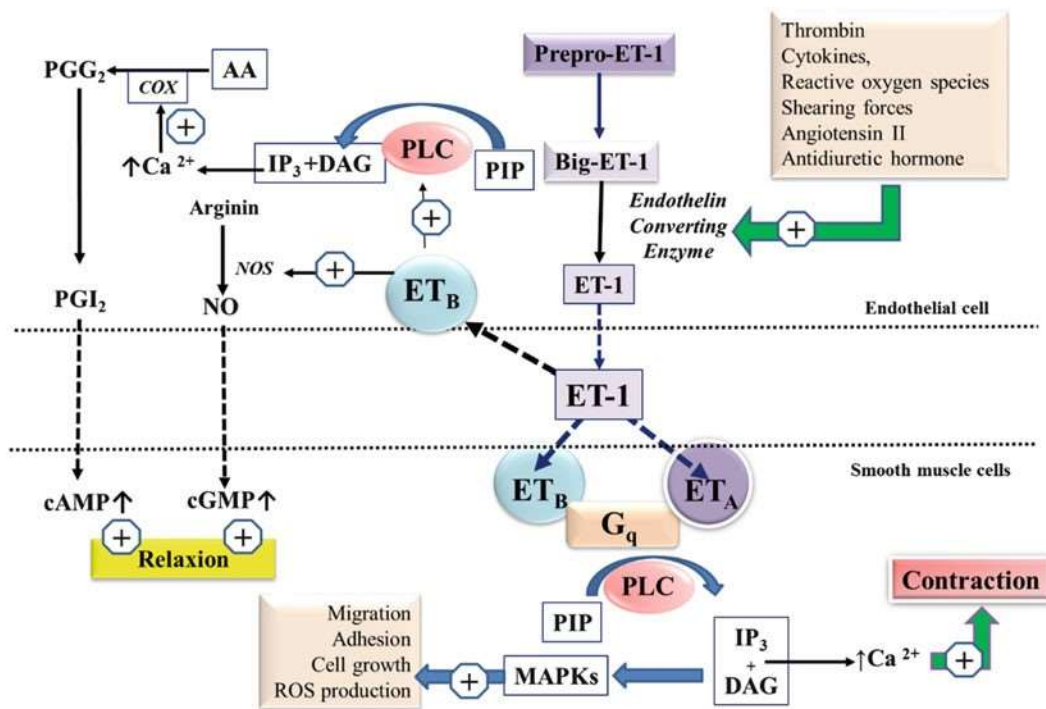


Figure 13. Synthèse de l'endothéline-1 ses effets au niveau des CML et CE. L'ET-1 est générée par l'action de l'enzyme de conversion de l'endothéline au niveau des CE. Les récepteurs ET_A et ET_B, couplés à une PGq, induisent la formation de l'IP₃ sous l'action de la PLC, et produisent une vasoconstriction des CMLs-AP par l'activation des canaux Ca²⁺ de type L. L'ET_B est aussi présent sur les CE et sous le contrôle du tonus vasculaire, des échanges se font entre l'ET-1, Le NO et la PGI₂. Lorsque ET-1 se lie à ET_B, il produit une vasodilatation par la synthèse de NO mais en absence des stimulations des ET_A et ET_B situés sur la CMLs-AP. Autres effets de ET-1 : croissance cellulaire, production ROS. PLC, phospholipase C ; PIP₂, Phosphatidyl inositol diphosphate ; IP₃, Inositol triphosphate ; DAG, Diacylglycérol ; MAPK, kinase activée par les mitogènes ; AA, acide arachidonique ; PGG₂ Prostaglandine G₂ ; PGI₂, Prostacycline (Issue de ³³)

Sérotonine (5-HT)

La 5-HT (5 hydroxytryptamine) est principalement produite par les cellules neuroendocrines du SNC et par les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal à partir d'un précurseur, le L-tryptophane. Elle est libérée par ces cellules et peut atteindre ensuite le compartiment sanguin où elle est absorbée et stockée par les plaquettes sanguines. En effet, la 5-HT est principalement stockée dans les plaquettes, une petite partie se lie aux protéines plasmatiques et seulement des concentrations de l'ordre du nano molaire restent circulantes.^{31,34} Elle agit par l'intermédiaire de ses récepteurs qui sont classés en 7 groupes : 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ et 5-HT₇ et présentent une expression tissulaire différentielle. La 5-HT a des effets sur le SNC, le système cardiovasculaire et les muscles lisses (tube digestif, utérus, bronches).³⁵

Dans le système cardiovasculaire, la 5-HT est libérée par la fixation des plaquettes sur un caillot et elle peut servir de vasoconstricteur tout en régulant l'hémostase et la coagulation sanguine par l'intermédiaire des récepteurs 5-HT₁, 5-HT₂ et 5-HT₃.³⁶ Dans les CMLs-AP, l'activation des récepteurs sérotoninergiques 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} provoque une vasoconstriction. Le 5-HT_{1B} est couplé à une protéine G α (PG α) inhibitrice (PG α (i)) de la voie d'AMPc. Les récepteurs 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B} sont couplés à une PG α (q). Ces deux voies sont associées à une vasoconstriction.³⁴ De plus, le récepteur 5-HT_{2B} induit une vasoconstriction des CMLs-AP par la voie c-Src en bloquant les canaux potassiques à grande conductance activés par le Ca²⁺ (BK_{Ca}). Le récepteur 5-HT_{2B} induit également une prolifération des CMLs-AP par une activation des protéines kinases mitogènes (MAPK).³⁴ Dans les CMLs-AP, la 5-HT peut pénétrer dans la cellule par le transporteur de 5-HT (SERT ou 5-HTT) pour induire une prolifération. Une coopération existe entre le transporteur 5-HTT et le 5-HT_{1B} pour induire la contraction et la prolifération des CMLs-AP via l'activation des voies de signalisation prolifératives et contractiles en aval.^{34,37,38}

Par ailleurs, dans des conditions physiologiques (avec un endothélium fonctionnel), les plaquettes activées libèrent des substances, dont la 5-HT, qui induisent aussi la synthèse endothéliale de substances anti-agrégantes et antiadhérentes, et vasodilatatrices, dont le NO et la PGI₂.**(Figure 14)** Cependant, cet effet s'opposerait à l'effet vasoconstricteur direct sur les CMLs-AP.^{35,39}

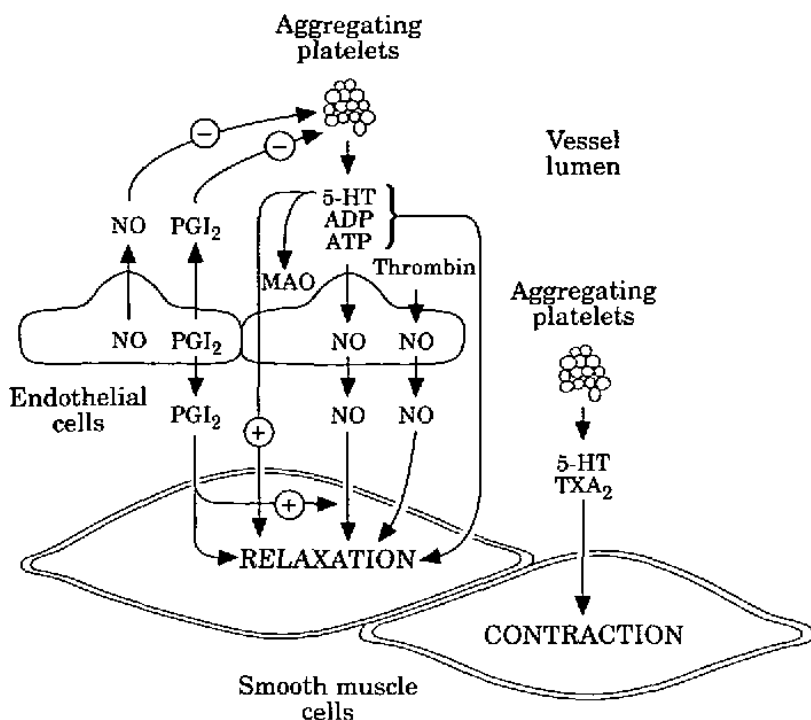


Figure 14 : Interaction entre les produits plaquettaires, la thrombine et l'endothélium. Si l'endothélium est intact, plusieurs substances libérées par les plaquettes (notamment les nucléotides adénines (ADP et ATP) et la sérotonine) provoquent la libération de NO et de PGI₂. Il en va de même pour toute thrombine formée. Le NO libéré va relaxer le MLV sous-jacent, ouvrant ainsi le vaisseau sanguin et évacuant les microagrégats ; NO sera également libéré vers la lumière du vaisseau sanguin pour empêcher l'adhésion des plaquettes à l'endothélium et, en synergie avec la PGI₂, inhiber l'agrégation plaquettaire (issue de ⁴⁰).

Thromboxane A₂(TxA₂)

Le TxA₂ appartient à la famille des lipides appelés eicosanoïdes qui sont des métabolites de l'AA. Le TxA₂, de son nom dérivant de thrombose, est libéré par les plaquettes (**Figure 14**) mais aussi par une variété d'autres cellules notamment les macrophages, les CEs et les neutrophiles. Ce puissant vasoconstricteur a des propriétés pro-thrombotiques car il stimule l'activation des plaquettes et leur agrégation.⁴¹ Le TxA₂ stimule la vasoconstriction et l'agrégation plaquettaire via les récepteurs TP membranaires principalement couplés à une PGα(q). Ces récepteurs sont localisés sur les plaquettes, les vaisseaux (les CMLs-AP, les Ces), les poumons, les reins, le cœur, le thymus et la rate. L'activité accrue du TxA₂ peut jouer un rôle important dans la pathogenèse de certaines maladies cardiovasculaires. ⁴¹

II. L'hypertension pulmonaire (HTP)

1. Définition

La définition de l'HTP est continuellement mise à jour en fonction de l'avancée de la recherche et des nouvelles données cliniques. La dernière définition a été proposée par les groupes de travail du 6^e symposium mondial sur l'HTP. L'HTP est définie cliniquement par une élévation anormale de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure ou égale à 20 mm Hg au repos (mesurée par cathétérisme cardiaque droit),⁴² (Tableau1). L'HTP peut être primitive (HTAP), mais elle peut aussi être secondaire à d'autres pathologies notamment celle du cœur gauche. Il peut y avoir des composantes pré et/ou postcapillaires. En effet, pour les groupes 2 et 5, l'HTP postcapillaire isolée induit une PAWP supérieure à 15 mm Hg et une RVP inférieure à 3 UW mais avec une HTP combinée pré- et postcapillaire, la RVP reste supérieure ou égale à 3 UW.⁴²

Definitions	Characteristics	Clinical groups [#]
Pre-capillary PH	mPAP >20 mmHg PAWP ≤15 mmHg PVR ≥3 WU	1, 3, 4 and 5
Isolated post-capillary PH (IpcPH)	mPAP >20 mmHg PAWP >15 mmHg PVR <3 WU	2 and 5
Combined pre- and post-capillary PH (CpcPH)	mPAP >20 mmHg PAWP >15 mmHg PVR ≥3 WU	2 and 5

Tableau 1 : Définitions hémodynamiques de l'HTP. mPAP : pression artérielle pulmonaire moyenne ; PAWP : pression artérielle pulmonaire d'occlusion ; PVR : résistance vasculaire pulmonaire ; WU : Unité Wood ; **groupe 1** : HTAP ; **groupe 2** : HTP due à une cardiopathie gauche ; **groupe 3** : HTP due à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie ; **groupe 4** : HTP thromboembolique chronique ; **groupe 5** : HTP dont les mécanismes ne sont pas clairs et/ou multifactoriels (Issue de ⁴²).

2. Classification clinique

Selon les dernières mises à jour du 6ème Symposium mondial sur l'HTP, l'HTP est classée en cinq groupes (Tableau 2). Le groupe 1, appelé hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), comprend entre autres l'HTAP idiopathique (HTAPi); l'HTAP héritable (HTAPh) due principalement à des mutations du gène du récepteur de la protéine morphogénétique osseuse-2 (*BMPR2*) mais d'autres mutations de gènes y existent (*KCNK3*, ...); l'HTAP induite par des drogues ou des toxines telles que la méthamphétamine; l'HTAP associée à diverses pathologies telles que les maladies du tissu conjonctif ou l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) et l'HTAP associée à des lésions des veines et capillaires ou maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP). Le groupe 2 concerne l'HTP secondaire à des maladies du cœur gauchetelles que l'insuffisance cardiaque avec fraction d'éjection réduite (HF_rEF) ou préservée (HF_pEF), et des valvulopathies. Le groupe 3 correspond à l'HTP secondaire à des maladies pulmonaires et/ou à l'hypoxie, telles que les maladies pulmonaires obstructives/restrictives (bronchopneumopathie chronique obstructive : BPCO). Le groupe 4 correspond à l'HTP due à des obstructions proximales de l'AP, notamment l'HTP thromboembolique chronique (HPTC). Le groupe 5 est l'HTP dont les mécanismes ne sont pas clairs et/ou multifactoriels (Les pathologies systémiques et métaboliques).⁴²

TABLE 2 Updated clinical classification of pulmonary hypertension (PH)

- 1 PAH**
 - 1.1 Idiopathic PAH
 - 1.2 Heritable PAH
 - 1.3 Drug- and toxin-induced PAH (table 3)
 - 1.4 PAH associated with:
 - 1.4.1 Connective tissue disease
 - 1.4.2 HIV infection
 - 1.4.3 Portal hypertension
 - 1.4.4 Congenital heart disease
 - 1.4.5 Schistosomiasis
 - 1.5 PAH long-term responders to calcium channel blockers (table 4)
 - 1.6 PAH with overt features of venous/capillaries (PVOD/PCH) involvement (table 5)
 - 1.7 Persistent PH of the newborn syndrome
- 2 PH due to left heart disease**
 - 2.1 PH due to heart failure with preserved LVEF
 - 2.2 PH due to heart failure with reduced LVEF
 - 2.3 Valvular heart disease
 - 2.4 Congenital/acquired cardiovascular conditions leading to post-capillary PH
- 3 PH due to lung diseases and/or hypoxia**
 - 3.1 Obstructive lung disease
 - 3.2 Restrictive lung disease
 - 3.3 Other lung disease with mixed restrictive/obstructive pattern
 - 3.4 Hypoxia without lung disease
 - 3.5 Developmental lung disorders
- 4 PH due to pulmonary artery obstructions (table 6)**
 - 4.1 Chronic thromboembolic PH
 - 4.2 Other pulmonary artery obstructions
- 5 PH with unclear and/or multifactorial mechanisms (table 7)**
 - 5.1 Haematological disorders
 - 5.2 Systemic and metabolic disorders
 - 5.3 Others
 - 5.4 Complex congenital heart disease

Tableau 2 : Classification clinique actualisée de l'hypertension pulmonaire (HP). PVOD ou MVOP : **maladie veino-occlusive pulmonaire** ; PCH ou HCP : **hémangiomatose capillaire pulmonaire** ; LVEF ou FEVG : **fraction d'éjection ventriculaire gauche (issue de⁴²)**.

3.Stratégie de diagnostic de l’HTP

A l’état précoce, l’HTP ne présente pas de symptômes spécifiques, seuls une dyspnée à l’effort, une fatigue et des douleurs thoraciques se manifestent chez la plupart des patients. L’examen clinique initial d’une dyspnée à l’effort nécessite la recherche de signes d’une défaillance cardiaque droite, d’une HTP ou d’une pathologie associée (connectivite, hypertension portale, maladie thromboembolique). S’ensuit un bilan initial comprenant une radiographie thoracique, un électrocardiogramme (ECG) et une spirométrie. Cependant, l’échographie cardiaque représente la méthode de choix pour dépister l’HTP (Figure 15). D’autres examens cliniques complémentaires peuvent être effectués aussi bien qu’un bilan sanguin selon la présentation clinique.⁴³

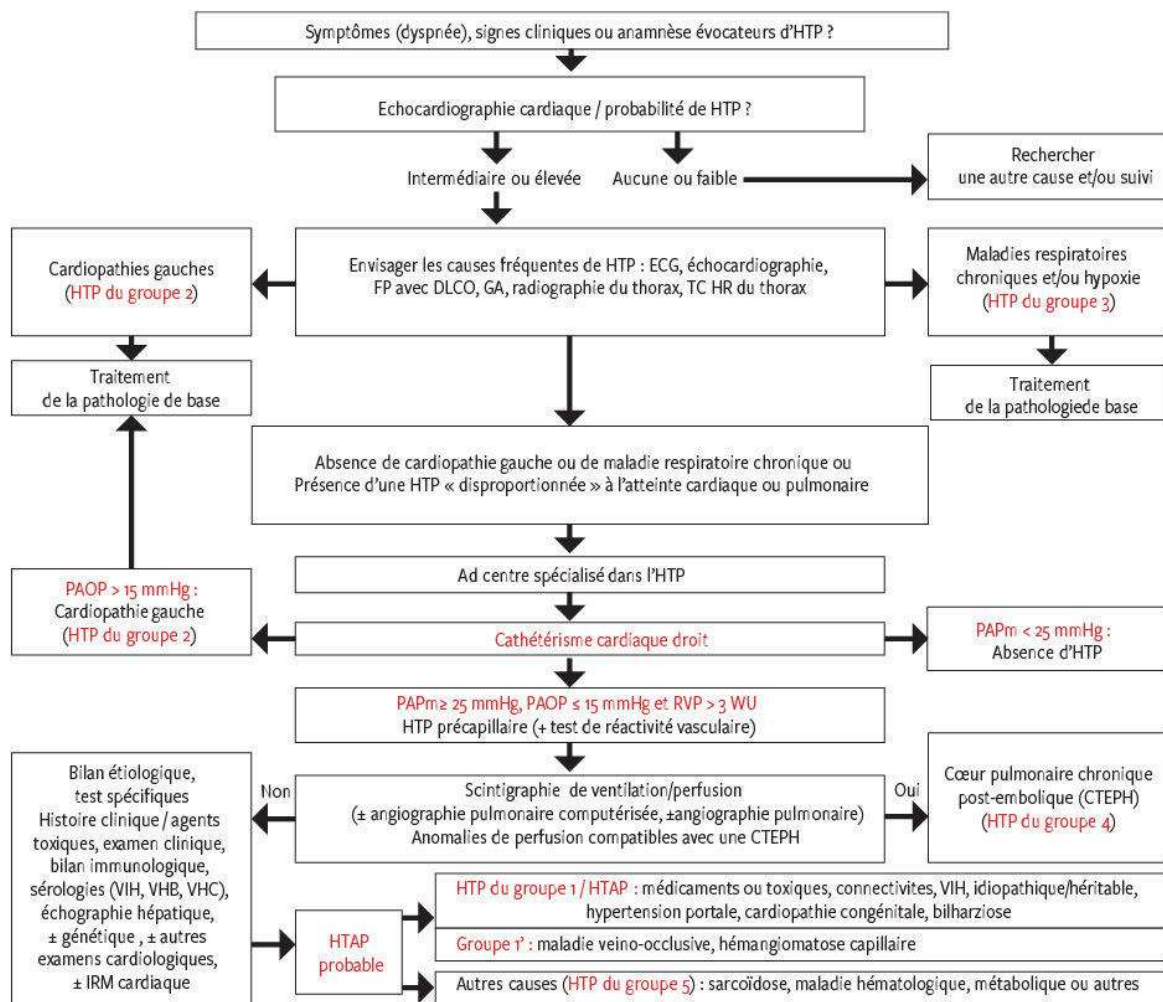


Figure 15 : Arbre décisionnel pour le diagnostic d’une HTP. GA : gazométrie artérielle ; CTEPH : chronic thromboembolic pulmonary hypertension, HTP thrombo-embolique chronique ; DLCO : capacité de diffusion alvéolaire pour le CO ; ECG : électrocardiogramme ; FP : examens des fonctions pulmonaires ; PAOP = PAWP : pression artérielle pulmonaire d’occlusion/wedge pressure ; IRM : imagerie par résonance magnétique ; TC : Tomodensitométrie; TC HR : TC à haute résolution ; PVR = RVP : résistances vasculaire pulmonaires ; VHB/VHC : infection par le virus de l’hépatite B/de l’hépatite C ; WU : Wood units.(issue de ⁴³)

4. L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

1) Définition

L'HTAP est une pathologie rare, chronique et dévastatrice progressivement conduisant à une insuffisance cardiaque droite et ensuite au décès des patients. L'HTAP est une maladie qui touche les petites AP (< 500 µm, niveau distal des artères et artérioles de type musculaire) et se caractérise par une obstruction progressive des APs conduisant à une augmentation des RVP et des pressions artérielles pulmonaires (PAP). Ces conditions induisent une augmentation de la postcharge du ventricule droit et, finalement, conduisent à une insuffisance cardiaque droite.^{21,34} L'HTAP peut être idiopathique (HTAPi), héritable (HTAPh), ou associée à d'autres conditions ou pathologies, notamment une connectivite, une cardiopathie congénitale, une infection virale (virus de l'immunodéficience acquise, VIH), une hypertension portale ou exposée à des toxines et médicaments. Selon le 6^e symposium mondial de l'HTP, L'HTAP comprend sept sous-groupes ayant tous une pathologie vasculaire pulmonaire, des présentations cliniques et des stratégies de prise en charge similaires. (Tableau 3)

TABLE 2. Classification of PAH⁴⁻⁶

1. Pulmonary Arterial Hypertension
1.1 Idiopathic PAH
1.2 Heritable PAH
1.3 Drug and toxin induced
1.4 PAH associated with:
1.4.1 Connective tissue disease
1.4.2 HIV infection
1.4.3 Portal hypertension
1.4.4 Congenital heart diseases
1.4.5 Schistosomiasis
1.5 PAH long-term responders to CCBs
1.6 PAH with overt features of PVOD/PCH
1.7 Persistent PH of the newborn

CCB, calcium channel blocker; PAH, pulmonary arterial hypertension; PCH, pulmonary capillary hemangiomatosis; PH, pulmonary hypertension; PVOD, pulmonary veno-occlusive disease.

Tableau 3 : Les différents sous-groupes de l'HTAP. PAH, HTAP ; CCBs, bloqueurs de canaux calciques, PVOD, maladie veino-occlusive pulmonaire ; PCH, hémangiomatose capillaire pulmonaire (issue de⁴²)

2) Epidémiologie de l'HTAP

L'HTAP est une maladie rare dont la prévalence est estimée à 15-50 cas par million d'individus en Europe et aux Etats Unis d'Amérique.⁴⁴ Elle touche tous les âges, aussi bien les hommes que et les femmes. L'âge moyen des patients est de 36,4 ans (femmes et hommes). Les formes d'HTAPi, HTAPhet induite par les anoréxigènes représentent à elles seules 52,6% de tous les cas d'HTAP.⁴⁵ La plupart des registres d'HTAP ont rapporté une plus grande proportion de femmes allant de 62 à 80%. Le sexe féminin représente donc un facteur de risque de l'HTAP.⁴⁶ De plus, 60 à 76% des HTAPi sont de sexe féminin.⁴⁴ Selon ces registres, paradoxalement chez les hommes, l'HTAP est plus sévère et est associée à une plus mauvaise survie.

Par ailleurs le National Institutes of Health (NIH) a été le registre de référence des données sur l'HTAP entre 1981 et 1985 ; il comprenait 187 patients HTAP d'étiologies diverses, principalement des femmes de race blanche et dont l'âge moyen est de 36 ans. En raison d'une absence de traitement spécifique d'HTAP, la médiane de survie était de 2,8 ans. Le registre du Réseau français sur l'HTAP (HAP français) de 2002 a inclus 674 personnes atteintes d'HTAP. Et le taux de survie a augmenté, de 82,9% à un an et 58,2 à 3 ans, grâce aux efforts significatifs réalisés dans le domaine de la physiopathologie et de thérapie d'HTAP. Actuellement, le REVEAL (Registry to Evaluate Early and Long-Term PAH disease management), basé aux Etats-Unis, enregistre 2767 patients HTAP avec un âge moyen de 53 ans (± 14 ans) et le sexe féminin représente 79,5% des cas. Et le rapport femme-homme est de 4,8/1,24.⁴⁴ (Figure 16) Donc il y a une prédominance féminine de la maladie. Dans ces données, 46 % des patients présentaient une HTAPi, 25 % étaient associées à des maladies du tissu conjonctif et 10 % à des cardiopathies congénitales. Enfin, selon ces données, la durée moyenne entre l'apparition des symptômes et le diagnostic est de 2,8 ans.⁴⁴ Ce qui montre qu'il y a toujours un retard pour établir le diagnostic. Et le taux de survie est de 91% à un an et 85% à 3 ans et 49% la septième année.^{44,45}

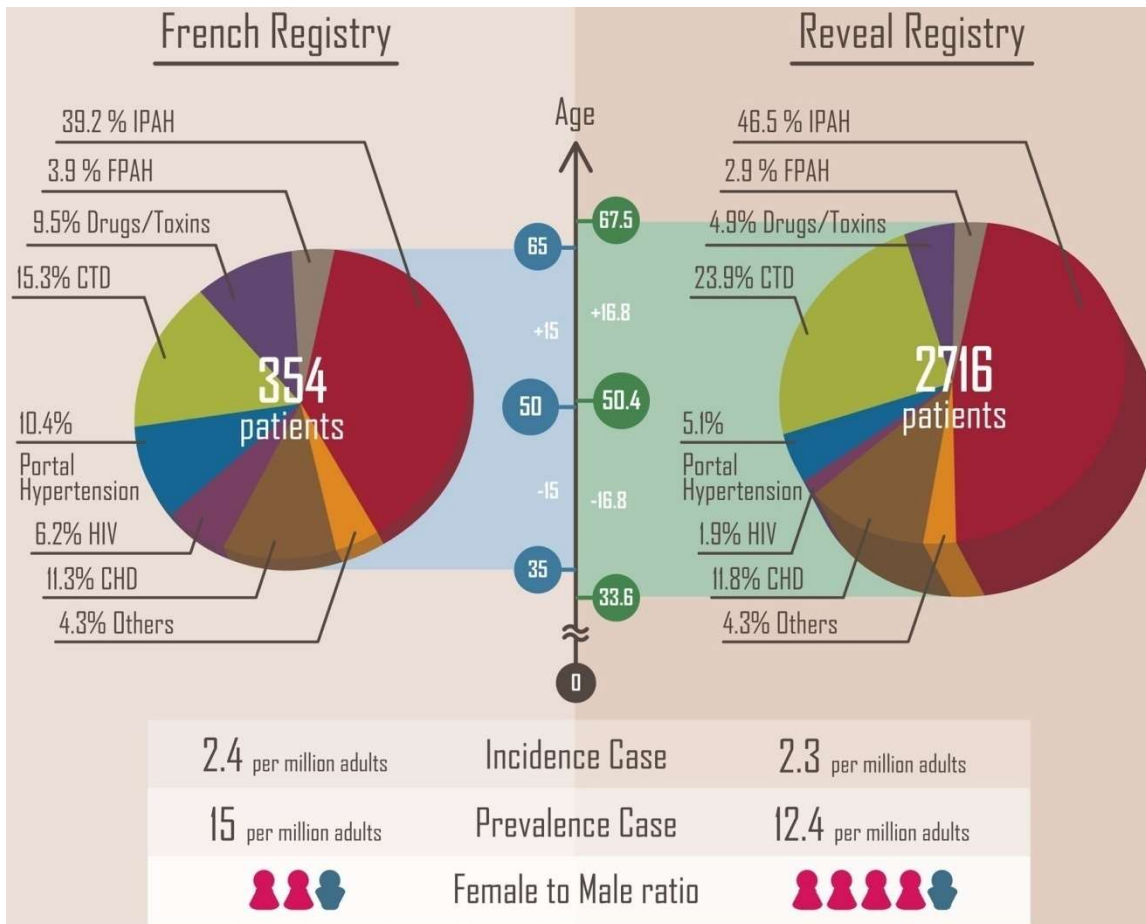


Figure 16. Diagrammes circulaires montrant une comparaison des sous-groupes d'HTAP dans le registre français et le registre REVEAL (Issue de⁴⁴)

3) Diagnostic de l'HTAP

Le diagnostic de l'HTAP est établi tardivement malgré les avancées effectuées ces dernières années. Il est souvent évoqué sur deux cadres contextuels : soit lors d'apparition de symptômes classiques peu spécifiques mais évocateurs notamment dyspnée d'effort, et fatigue ; soit lors d'une recherche systématique de l'HTAP qui a débuté dans des circonstances favorisantes (un facteur de risque associé connu).

Au stade précoce, les symptômes cliniques de l'HTAP sont peu spécifiques mais évocateurs. En effet, 90% des cas d'HTAP présentent une dyspnée d'effort, 46% présentent des douleurs thoraciques et 33% fatigue et palpitations.⁴⁷ L'examen le plus important du dépistage de l'HTAP est l'échographie cardiaque. Elle permet d'estimer la PAPm et d'évaluer le niveau de son retentissement au niveau droit jusqu'au cavités cardiaques droites c'est-à-dire mesure de la RVP, évaluer la taille ventricule gauche/ ventricule droit et la fonction systolique droite.⁴⁷

L'échographie cardiaque permet de dépister l'HTAP mais la confirmation du diagnostic est réalisée à l'aide du cathétérisme cardiaque droit (Figure 17).

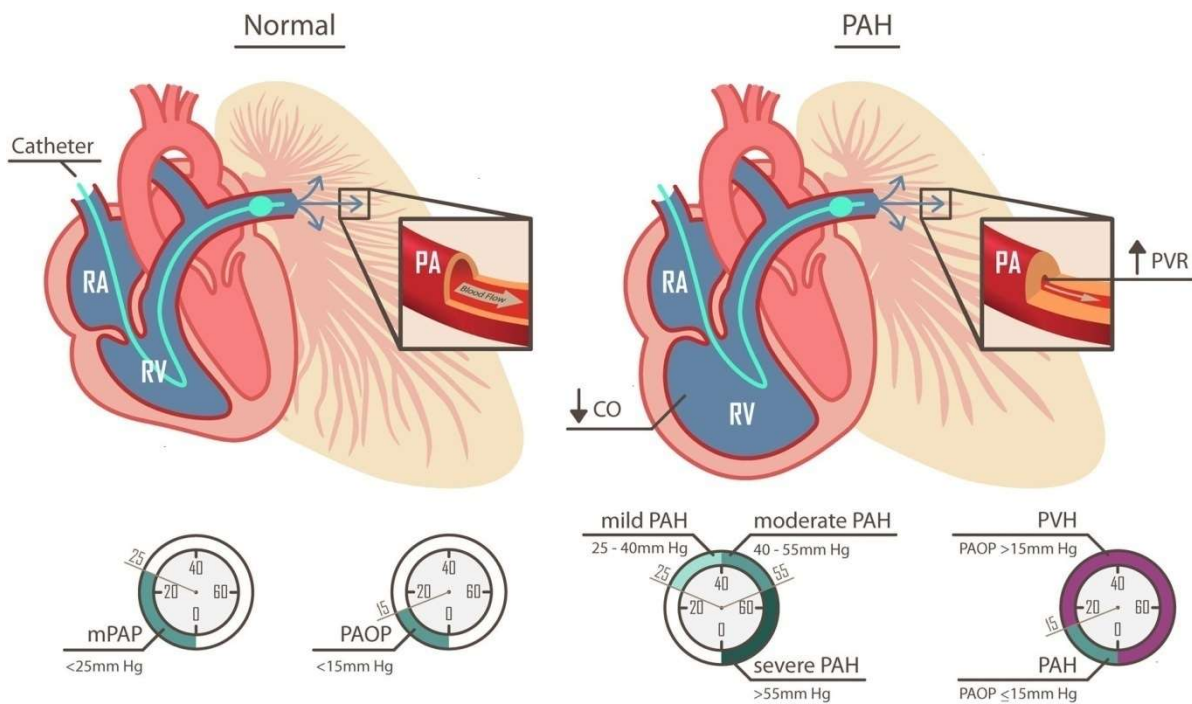


Figure 17 : Mesure de la pression pulmonaire par cathétérisme droit dans le cadre du diagnostic de l’HTAP (issue de ⁴⁸).

L’HTAP se définit par une PAPm supérieure à 20 mm Hg associée une pression capillaire inférieure à 15 mm Hg et une RVP supérieure à 3 WU (Wood Units ou unités Wood).

4) Traitements de l’HTAP

En plus des traitements spécifiques de l’HTAP, il existe des traitements symptomatiques de l’HTAP notamment l’oxygénothérapie, les diurétiques, les anti-coagulants, les inhibiteurs calciques.

Les traitements spécifiques de l’HTAP ont, en général, des effets vasodilatateurs et leur rôle est de s’opposer aux effets délétères de la vasoconstriction, de l’obstruction vasculaire pulmonaire due au remodelage ou aux thromboses in situ, conduisant à l’insuffisance cardiaque droite. Parmi les principales cibles de ces thérapies, il y a la DE.

Classiquement ces médicaments ciblent les trois voies de signalisation dysfonctionnelles de l’HTAP notamment la voie de l’ET-1, celle de la PGI2 et celle du NO- sGC. -GMPc. (Figure 18) Cependant, des nouvelles stratégies thérapeutiques ciblent la voie BMP (*Bone Morphogenic Protein* ou protéine morphogénique osseuse) –TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*).

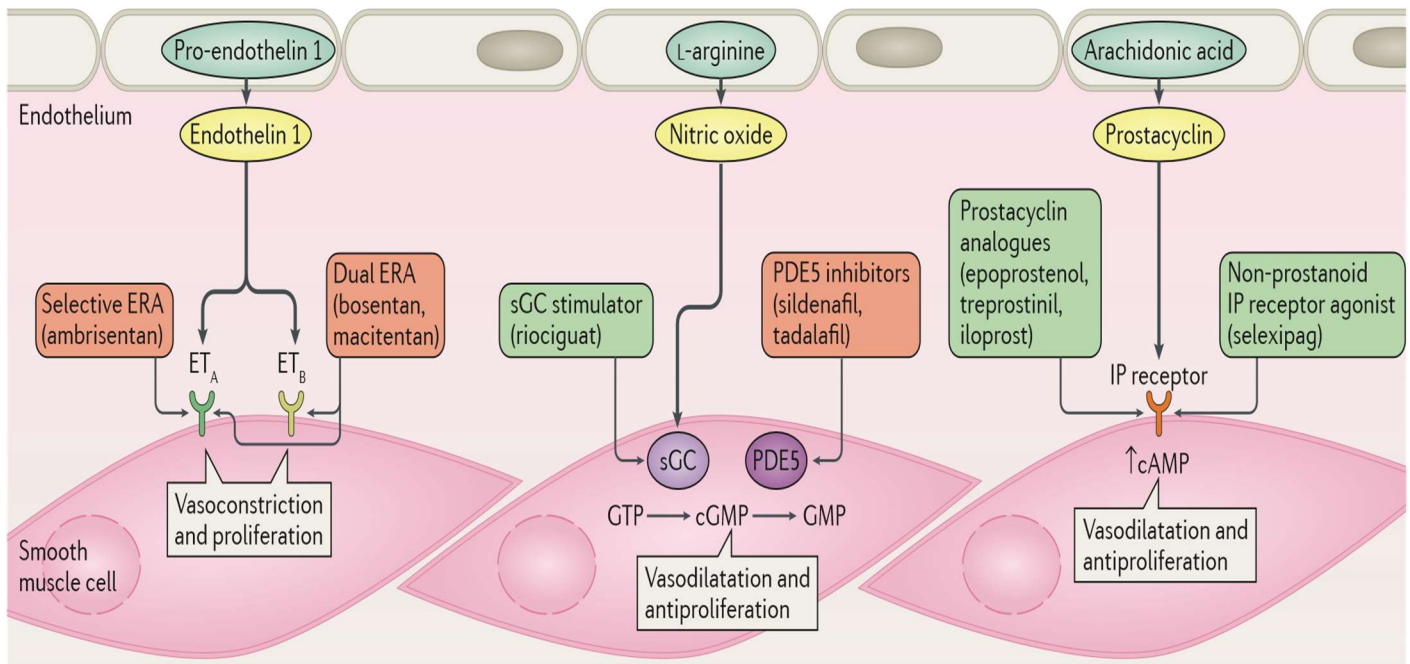


Figure 1 | **Molecular targets of approved PAH drug therapies.** The endothelin 1, nitric oxide, and prostacyclin signalling pathways or non-selective endothelin 1 receptor antagonists (ERAs); the nitric oxide pathway can be enhanced by inhibition of phosphodiesterase 5

Figure 18 : Cibles moléculaires des traitements médicamenteux approuvés contre l'HTAP. Les voies de signalisation de l'ET-1, de NO et de la PGI₂ sont des cibles thérapeutiques cruciales pour l'HTAP. Cette maladie est caractérisée par la régulation à la hausse de l'ET-1 et une diminution de la production de NO et de PGI₂. La voie de l'ET-1 peut être bloquée soit par un antagoniste sélectif des récepteurs de l'ET-1, soit par un traitement antagoniste non sélectif des récepteurs de l'ET-1; la voie de NO peut être renforcée par l'inhibition de la phosphodiesterase 5 (PDE5) ou la stimulation de la guanylate cyclase soluble (sGC); et la voie de la PGI₂ peut être renforcée par l'administration d'analogues de prostanoides ou d'agonistes non prostanoides des récepteurs IP (issue de⁴⁵).

- Les antagonistes des récepteurs de l'endothéline-1 (ERA)

L'ET-1 est connu pour ses effets de puissant vasoconstricteur. Il contribue non seulement à la vasoconstriction mais aussi à la prolifération des CMLs-AP à travers ses deux récepteurs ETA et ETB. Le récepteur ETA est fortement exprimé au niveau des CMLs-AP alors que ETB est exprimé à la fois dans les CMLs-AP et les CE où il induit une vasodilatation via la synthèse de NO et la PGI₂. Actuellement, il existe trois ERA sur le marché : Le bosentan, l'ambrisentan et le macitentan. Le bosentan a été le premier ERA qui était approuvé pour le traitement de l'HTAP et il cible à la fois ETA et ETB. Ces molécules sont administrées par voie orale.⁴⁹

- Les Inhibiteurs de phosphodiesterase de type 5 (PDE5)

Les inhibiteurs de PDE 5 ciblent le GMPc, qui est un second messenger intracellulaire, pour induire la vasorelaxation des CMLs-AP et une inhibition de la prolifération de ces cellules. Le sildénafil est le premier IPDE5 approuvé pour le traitement de l'HTAP. Ces molécules sont administrées par voie orale et n'induisent pas des effets indésirables au niveau hépatique. Les stimulateurs de sGC, avec le Riociguat comme référence, induisent aussi une vasorelaxation via une augmentation des niveaux de GMPc.⁵⁰

- Les dérivés de la prostacycline

La PGI2 est produite par les CEs à partir de l'AA et la prostacycline synthase. La principale cible de ces molécules est l'activation du récepteur de la PGI2 pour induire une production de l'AMPc. En plus de son effet vasorelaxant, il a aussi des effets antiprolifératifs, antiplaquettaire et immunomodulateur. Epoprostenol est utilisé en intraveineux et il a été démontré une amélioration de survie de 12 mois avec ce médicament⁴⁵. Il existe plusieurs formulations pour les dérivés de la PGI2. Beraprost est utilisé oralement, teprostinil en subcutanée et Iloprost en oral, intraveineux et nasal.⁴⁸

- Les inhibiteurs calciques

Les inhibiteurs des canaux calciques (CCB) sont des agents qui ont prouvé leur efficacité dans la réduction de la vasoconstriction pulmonaire bien qu'ils n'ont pas d'effet notable sur le remodelage vasculaire pulmonaire. Il est donc possible d'utiliser ce traitement chez les patients ayant une vasoconstriction plus avancée que les phénomènes de remodelage vasculaire. Ce traitement est utilisé chez les patients d'HTAPi et certains patients sont « répondeurs » aux CCB et d'autres non. Les patients répondeurs de CCB ont une survie considérablement améliorée par rapport aux non répondeurs.⁵¹ Les répondeurs ont été identifiés par un test hémodynamique (de vasodilatation) par cathétérisme cardiaque droit ; ce test étant effectué dans le but de réguler les paramètres hémodynamiques à la normale. Malheureusement, les répondeurs ne représentent qu'environ 10% des patient HTAPi.⁵²

- Modulation de la voie BMP

Un essai clinique, réalisé récemment pendant 24 semaines portant sur 106 patients adultes qui recevaient un traitement de fond pour l'HTAP, a prouvé l'efficacité du Sotatercept dans le traitement contre l'HTAPi et l'HTAPh. Le critère d'évaluation principal était la modification ou l'amélioration de la RVP entre le début de l'étude et la semaine 24. Le Sotatercept est une protéine de fusion entre la partie extracellulaire du récepteur de l'activine de type II A (Act RIIA) et un fragment d'immunoglobuline IgG1. Le mécanisme d'action de ce médicament est de piéger les ligands de l'ActRIIA en les séquestrant, permettant ainsi de

rétablir l'équilibre entre la voie pro-proliférative du TGF- β et la voie anti-proliférative des BMPs.⁵³ Le second critère d'évaluation est la distance de marche de 6 minutes entre le début de l'essai et la semaine 24. Les autres critères concernent, entre autres, le dosage sanguin de biomarqueurs de la fonction cardiaque, l'échographie cardiaque entre le début et la fin de l'essai. (Figure 19)

Au bout de 24 semaines de traitement sous Sotatercept, les patients ont présenté une diminution significative de la RVP par rapport aux patients traités avec le placebo. Les patients ont également amélioré l'activité physique avec une meilleure capacité à l'effort. Ils ont également présenté une amélioration de différents biomarqueurs de la fonction cardiaque.⁵³ Ainsi, cette étude constitue un espoir pour le traitement curatif de l'HTAP. En effet, les traitements disponibles sur le marché sont des traitements symptomatiques et non curatifs. Ces traitements améliorent de mode vie des patients et allongent un peu leur durée de vie. Ils constituent de traitement de « bridge » en attendant la transplantation qui est le traitement définitif de l'HTAP.

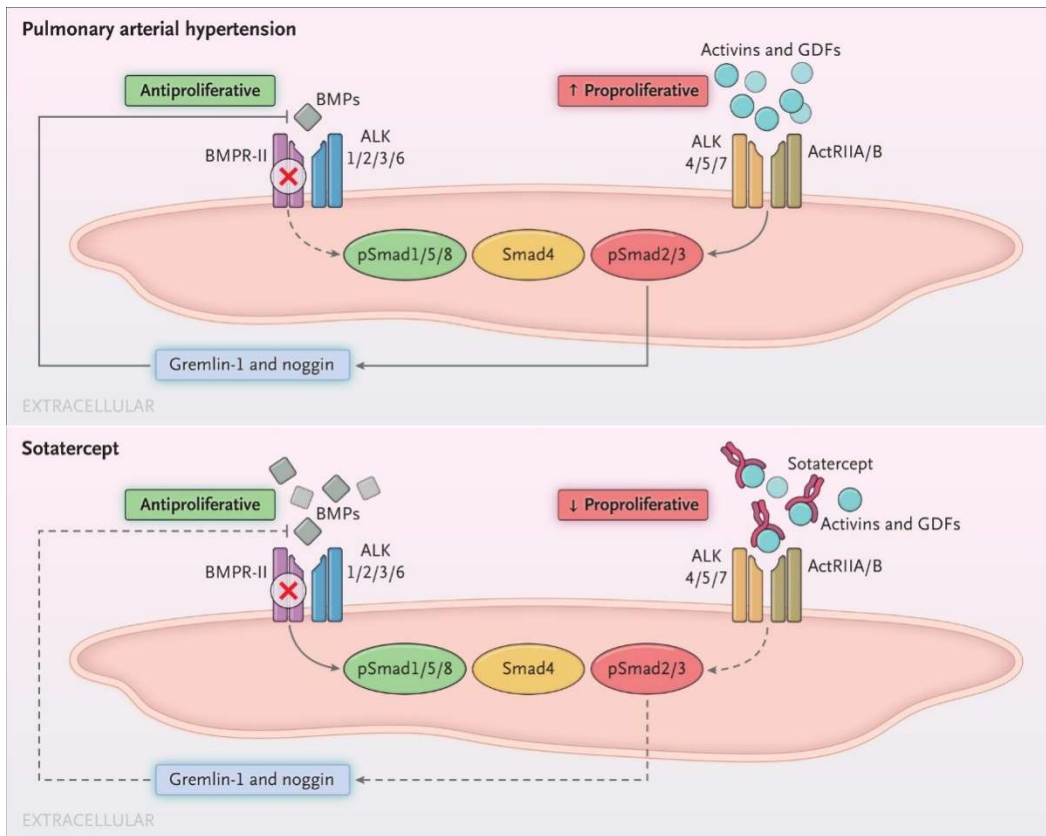


Figure 19. Mécanisme d'action proposé pour Sotatercept dans l'HTAP. Le mécanisme d'action proposé implique un rééquilibrage de la signalisation favorisant la croissance et de la signalisation inhibant la croissance. L'HTAP est associée à une dérégulation de la voie du récepteur de la protéine (BMPR-II-Smad1/5/8 dans les CMLs-AP et CEs des vaisseaux pulmonaires, provoquant un déséquilibre entre les voies de signalisation pro-proliférantes et anti-proliférantes. La régulation négative de la voie BMPR-II-Smad1/5/8 entraîne une production accrue de ligands de l'actinine, tels que l'actinine A, le facteur de différenciation de croissance 8 (GDF8) et le GDF11, contribuant à la régulation positive de la voie du récepteur de l'actinine de type IIA (ActRIIA)-Smad2/3. L'augmentation de l'activité de Smad phosphorylé (pSmad2/3) favorise l'expression des antagonistes endogènes des BMP, gremlin-1 et noggin. Gremlin-1 et noggin réduisent encore la signalisation BMP-Smad1/5/8. Globalement la signalisation antiproliférante est réduite, déplaçant l'équilibre vers la signalisation pro-proliférante activin-Smad2/3, entraînant un remodelage vasculaire pulmonaire. Le Sotatercept agit en séquestrant les ligands d'ActRIIA en excès, diminuant ainsi la signalisation ActRIIA-Smad2/3 pour rééquilibrer la signalisation favorisante et inhiber la croissance. ALK, activinreceptor-like kinase (issue de ⁵³).

5) Anatomopathologie de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par des lésions des artères distales de type musculaire de diamètre compris entre 70µm et 500µm et des lésions des artérioles de diamètre compris entre 20µm et 70µm. Ces lésions peuvent conduire à la rigidité des grandes AP (principales, lobaires ou segmentaires). Ces lésions sont aussi caractérisées une inflammation périvasculaire exubérante.²³L'HTAP est aussi caractérisée par des lésions

artérielles pulmonaires complexes et des anomalies structurelles telles que : les lésions plexiformes, les lésions intimales et l'hypertrophie de la media. Les lésions plexiformes s'organisent, du fait d'une prolifération des CEs, myofibroblastes et CMLs-AP, en canaux microvasculaires endo-lumineux dans une matrice oblitérante riche en collagène.⁵⁴ Les lésions plexiformes se produisent souvent au niveau des points de ramification des APs.⁵⁵ Les lésions intimales sont caractérisées par une accumulation de myofibroblastes, de matrices extracellulaires et d'infiltrat inflammatoire formant une couche supplémentaire entre l'endothélium et la lame élastique interne de l'artère. Quant à l'hypertrophie de la media, elle est causée par la prolifération et la résistance à l'apoptose des CMLs-AP qui induisent un épaissement de la média des APs.²³ L'épaississement de la paroi des APs a été attribué à la prolifération et à la migration anormale des CML existantes ou à leur différenciation ou à partir des cellules progénitrices ou fibrocytes.⁵⁶ (Figure 20)

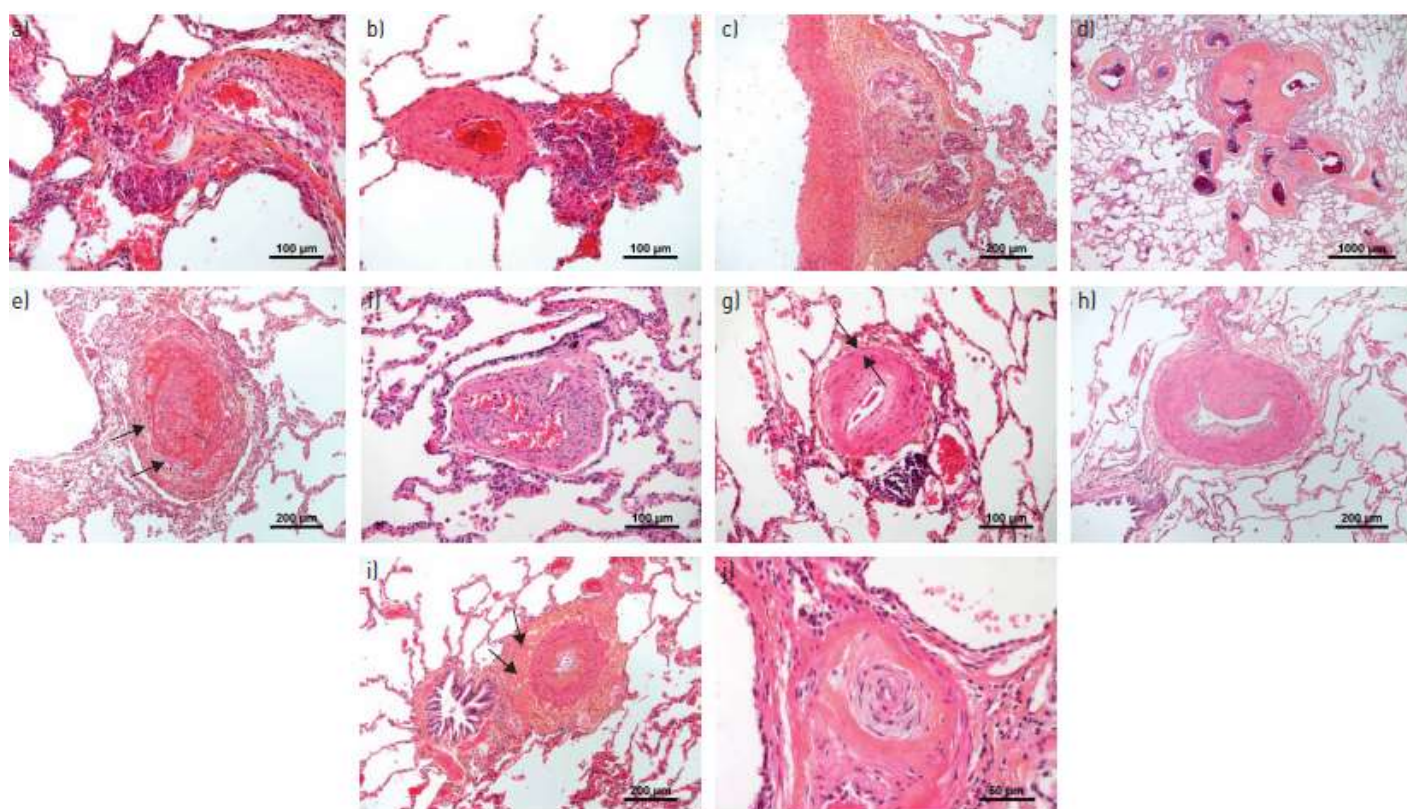


Figure 20 : Lésions histologiques caractéristiques de l'HTAP. a-c) Lésions plexiformes ; b) Lésions fibrovasculaires atypiques situées souvent dans les formes héréditaires BMPRII mutés ; e-f) Fibrose intimale concentrique non laminaire ; h) Fibrose intimale excentrique ; i. hypertrophie de la média ; j) Fibrose intimale concentrique avec un aspect de « bulbe d'oignon » (issue de ²³).

6) Pathogénèse de l'HTAP

Il existe de multiples voies/facteurs pathogènes impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP, aux niveaux cellulaire, moléculaire et génétique et dans les trois couches des artères pulmonaires(Figure21).

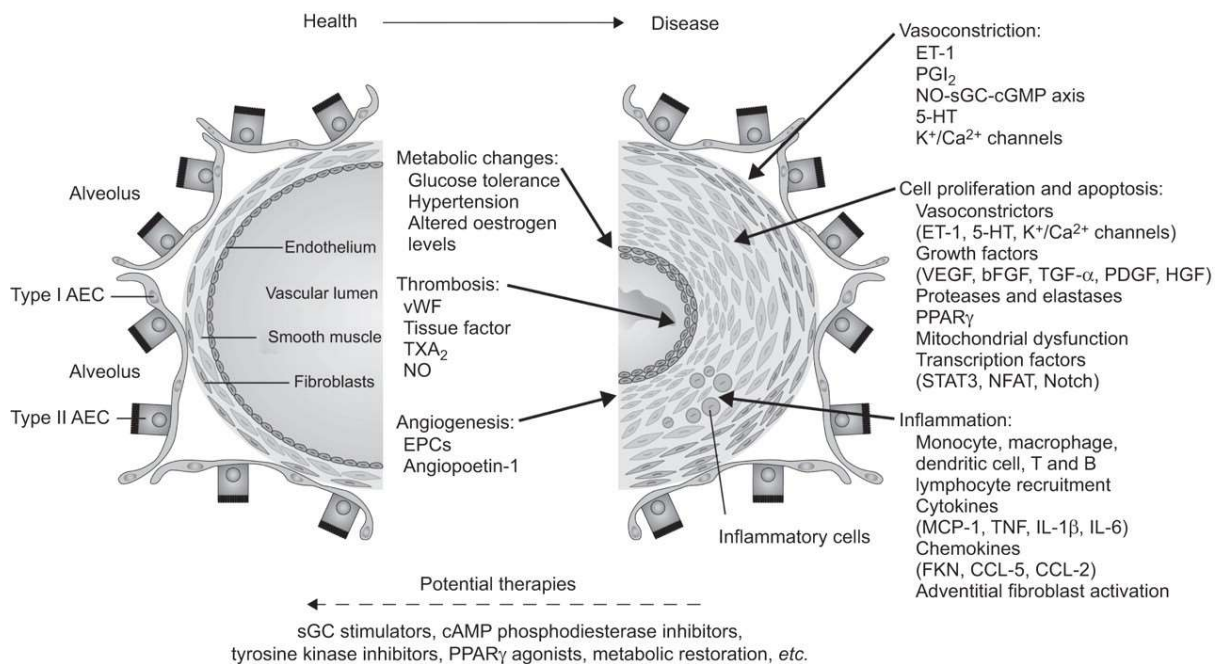


Figure 21 : Les mécanismes pathologiques clés qui sous-tendent les changements vasculaires dans l'HTP. Les nouvelles thérapies potentielles pour l'HTP sont également indiquées. AEC : cellule épithéliale alvéolaire ; vWF : facteur de von Willebrand ; A₂ ; EPC : cellule progénitrice endothéliale ; 5-HT : 5-hydroxytryptamine ; VEGF : facteur de croissance endothélial vasculaire ; bFGF : facteur de croissance fibroblastique basique ; TGF- α : facteur de croissance transformant- α ; PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes ; HGF : facteur de croissance des hépatocytes ; PPAR γ : récepteur- γ activé par les proliférateurs de peroxydase; STAT3 : transducteur de signal et activateur de transcription 3, NFAT : facteur nucléaire des lymphocytes T activés ; MCP-1 : protéine chimio-attractante monocyttaire 1 ; TNF : facteur de nécrose tumorale ; IL : interleukine ; FKN : fractalkine ; CCL : ligand de chimiokine(issu de ⁵⁷).

Bien que de nombreux auteurs considèrent la vasoconstriction pulmonaire comme un événement précoce dans la pathogénèse ou le processus de l'HTAP, l'ordre dans lequel ces processus se déroulent, reste inconnu. Et on ne sait pas si le résultat observé sur un type de cellules est dû à une dérégulation de celui-ci (facteur intrinsèque), ou à l'influence de facteurs venant de l'extérieur (autres cellules/molécules), ou les deux ensembles. Cependant, il existe des preuves de diaphonie entre les CEs, les CMLs-AP et la couche

adventitielle. Plusieurs études ont montré que la diaphonie entre les CE et les CMLs-AP peut impliquer plusieurs voies de signalisation notamment la voie TGF β /ALK 1, la voie BMP/BMPRII. Les CE vasculaires pulmonaires synthétisent et libèrent plusieurs substances solubles qui vont agir sur les CMLs-AP et les cellules circulantes inflammatoires, pour induire ou renforcer le remodelage vasculaire et l'inflammation.^{58,59}

Dysfonction endothéliale déséquilibre entre vasodilatateurs et vasoconstricteurs pulmonaires

La dysfonction endothéliale (DE) entraîne un déséquilibre entre les niveaux de médiateurs vasoactifs circulants et ceux libérés par l'endothélium. Elle entraîne une diminution de la production de vasodilatateurs comme le NO et la PGI₂ et une augmentation de la production de vasoconstricteurs comme l'ET-1 et laTxA₂. Actuellement, ces médiateurs constituent des cibles stratégiques pour les thérapies médicales utilisées chez les patients atteints d'HTAP. Il a été démontré que dans certaines conditions, notamment l'hypoxie, le NO peut entraîner une activation biaisée de la sGC conduisant à la production d'inosine monophosphate cyclique (IMPC) au lieu de GMPc. Ainsi le NO, via la production d'IPMc, induit une contraction plutôt qu'une relaxation des CMLs-AP sous-jacentes.^{37,40,57,58}

Notons que les principaux facteurs de la DE sont une réduction de la biodisponibilité du NO, une altération de la réponse vasculaire aux vasodilatateurs, la sensibilité élevée des CE aux vasoconstricteurs et une contrainte de cisaillement élevée. Bien que la DE soit définie par une altération de la réactivité vasculaire en favorisant la vasoconstriction, mais elle reflète également un état pro-inflammatoire et pro-thrombotique.⁶⁰L'ET-1, étant un puissant vasoconstricteur, peut induire la DE en réduisant la biodisponibilité de NO. Des études ont montré qu'une surexpression de l'ET-1 au niveau endothélial provoque une DE et une diminution de biodisponibilité de NO. Dans cette même étude, des données cliniques et précliniques suggèrent que l'utilisation, d'antagonistes sélectifs des récepteurs ETA et d'antagonistes d'ETA et ATB, induit une amélioration de la fonction endothéliale et la biodisponibilité de NO. L'ET-1 peut induire la DE par divers mécanismes ; soit en inhibant la synthèse de NO par inhibition de l'activité de la eNOS via la caveoline-1, une protéine qui régule négativement l'activité de la eNOS ; soit en induisant une dégradation de NO et ainsi une augmentation de la production de ROS au niveau vasculaire (**Figure 22**) ; soit en induisant, via le récepteur ETB et ETA, un phénotype pro-inflammatoire des CE chez la souris surexprimant l'ET-1 endothélial.⁶⁰Des niveaux plasmatiques de l'ET-1 sont élevés chez les patients HTAP. Dans l'HTAPi, l'expression de l'ARN messager et de la protéine ET-1 sont élevés dans les CE particulièrement dans les lésions vasculaires. Chez les patients HTAP, le taux de NO expiré

est diminué. Les facteurs déclenchant la libération de ET-1 peuvent être métaboliques (hypoxie), hémodynamiques (faible stress de cisaillement) ou liés à la maladie (anticorps anti-CE). Enfin, l'inhibition chronique des ETA et ETB entraîne une réversion de la DE et du développement de l'HTAP.⁶⁰

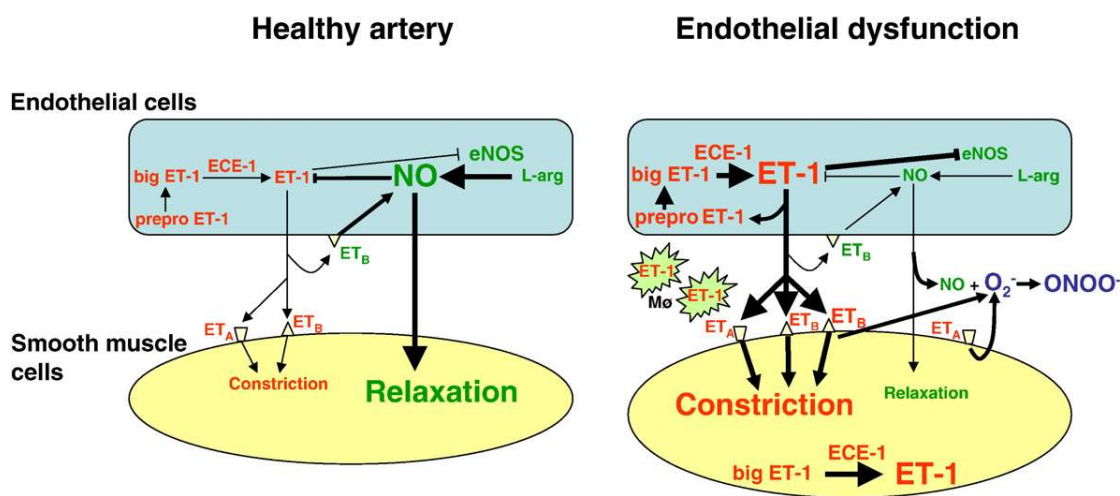


Figure 22. Schéma de la paroi artérielle en conditions physiologiques (à gauche) et en cas de dysfonction endothéliale (DE) (à droite). Dans les artères saines, la production d'ET-1 est faible et la biodisponibilité du NO est préservée. Ainsi, l'équilibre des effets favorise la vasorelaxation par une signalisation accrue du GMP cyclique. En cas de DE, il y a une augmentation de l'expression de l'ET-1 dans les CML et les macrophages (MØ). Il y a également une augmentation de l'expression des récepteurs ETB sur les CML entraînant une vasoconstriction. L'ET-1 peut diminuer l'expression de la eNOS, réduisant ainsi la production de NO. Les récepteurs de ETA sur les CML peuvent médier la formation de superoxyde (O₂⁻). Le superoxyde diminue l'activité biologique du NO en formant du peroxynitrate (ONOO⁻). Collectivement, l'équilibre des effets est déplacé vers le plus de vasoconstriction, d'inflammation et de stress oxydatif dans la DE (issue de³²).

Par ailleurs, l'ET-1 est connue non seulement par ses propriétés vasoconstrictrices mais aussi par ses effets pro-prolifératifs des CMLs-AP. Ainsi, l'ET-1 participe également au remodelage vasculaire pulmonaire en induisant la prolifération des CMLs-AP. Le remodelage vasculaire est donc une conséquence de la DE.⁶⁰

Le remodelage vasculaire est favorisé par des voies de signalisation clés parmi lesquelles la dérégulation des voies de la prolifération et de l'apoptose et la transition endothéliale-mésenchymateuse (endo-MT). L'endo-MT est un processus par lequel les CEs présentent une plasticité phénotypique et acquièrent des propriétés des myofibroblastes ou de cellules mésenchymateuses. Les CEs perdent leurs jonctions serrées, se dissocient de la membrane basale et migrent vers la média où elles perdent leurs marqueurs endothéliaux typiques (CD31, cadhérine endothéliale vasculaire ou VE-Cadhérine) et expriment l' α -actine musculaire lisse (α -SMA) et la vimentine. Le remodelage vasculaire est parfois stimulé par la voie du TGF- β ou par l'exposition à des molécules inflammatoires telles qu'IL-1 β , le facteur de nécrose tumorale- α (TNF- α) et l'activation de récepteur de type 1 de l'angiotensine II.⁶¹

Inflammation

La dérégulation de l'immunité et l'inflammation jouent un rôle actif au niveau de la DE pulmonaire et le remodelage vasculaire dans l'HTAP. Il existe une infiltration périvasculaire exagérée de cellules immunitaires et inflammatoires telles que les mastocytes, les cellules dendritiques et les macrophages.^{62,63} Les cellules vasculaires pulmonaires sont des sources locales importantes de médiateurs pro-inflammatoires qui contribuent au remodelage. En effet, les CEs des APs, les CMLs-AP, les fibroblastes et les myofibroblastes des patients atteints d'HTAP présentent une expression accrue de diverses cytokines pro-inflammatoires, de chimiokines et de molécules d'adhésion cellulaire inflammatoires.⁶³ La sécrétion locale excessive de cytokines telles qu'IL-1, IL-6, TNF- α , joue un rôle crucial dans les changements structurels (remodelage vasculaire) et fonctionnels (DE) des APs dans l'HTAP.⁶⁴⁻⁶⁶ Par ailleurs, une augmentation des taux circulants de cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, telles que l'IL-1, l'IL-6 et la fractalkine sont décrites chez les patients atteints d'HTAP. Les taux sanguins de ces médiateurs inflammatoires sont corrélés à un plus mauvais résultat clinique dans l'HTAP.^{67,68} (Figure 24).

Un dérèglement du système immunitaire est également constaté chez les patients atteints d'HTAP, et des auto-anticorps circulants dirigés contre les composants de la paroi vasculaire sont fréquemment détectés.⁶⁹ Une infiltration de cellules immunitaires dans le poumon, plus précisément dans le tissu périvasculaire et la couche adventitielle des patients atteints d'HTAP, est identifiée. Les mastocytes, les monocytes, les cellules dendritiques, les lymphocytes T et B, ainsi que les lymphocytes T cytotoxiques et T auxiliaires, sont présents en plus grande quantité dans et autour des artérioles pulmonaires.^{62,63,70} Le remodelage pulmonaire caractéristique de l'HTAP est associé au dérèglement immunitaire. Et ce remodelage pathologique des APs est marqué par une muscularisation excessive des APs et par la formation des lésions dues à la prolifération aberrante des CMLs-AP, des CEs et des fibroblastes. Ceci conduit à l'épaississement de la média et à la DE. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques repose sur les rôles joués par les cellules immunitaires et les cytokines/chimiokines clés.^{71,72}

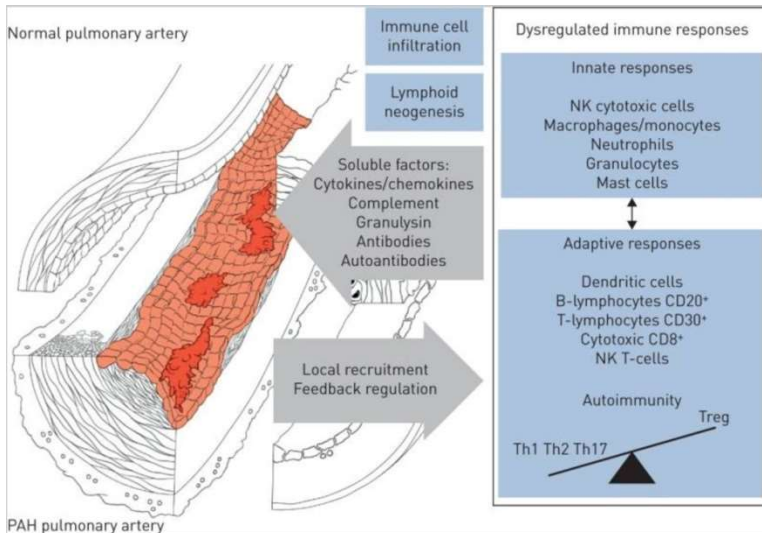


Figure 23 : Représentation schématique de la perturbation immunitaire associée à l'HTAP et au remodelage vasculaire pulmonaire. NK : natural killer ; Th : T-helper ; Treg : T-regulatory (issue de²³)

Principaux médiateurs impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP

- Endothéline-1 et sérotonine

La production d'ET-1 est régulée à la hausse dans les CE vasculaires des patients atteints d'HTP. Une fois sécrétée, la majorité de l'ET-1 achemine vers les CMLs-AP adjacentes, bien que des niveaux circulants élevés d'ET-1 aient été trouvés dans l'HTAP. En effet, les niveaux pulmonaires et circulants de l'ET-1 sont élevés aussi bien chez les patients HTAP que chez les modèles expérimentaux animaux.^{32,37,49,73,74} En plus d'une production accrue d'ET-1, les récepteurs ETA et ETB sont régulés à la hausse dans le système vasculaire pulmonaire des patients atteints d'HTAP.^{32,57}(Figure 24)

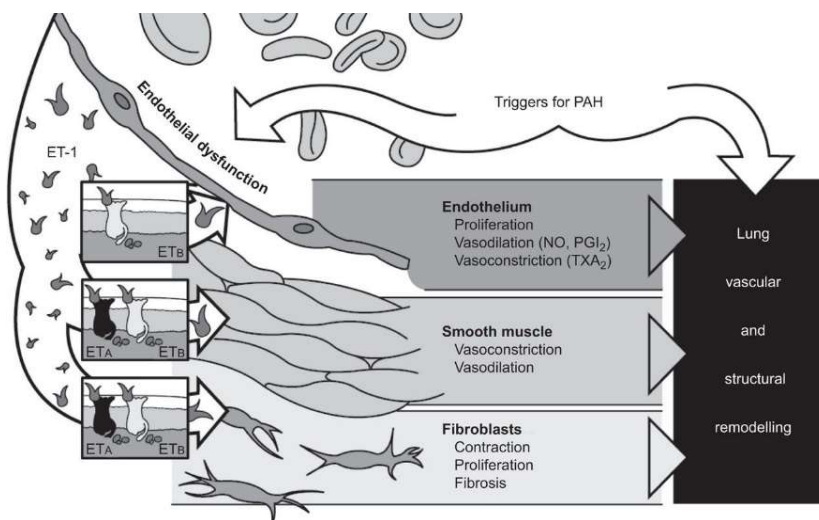


Figure 24 : L'endothéline (ET)-1 joue un rôle important dans le remodelage vasculaire. ETA/ETB : sous-types A et B des récepteurs ET ; PGI2 : prostacycline ; TXA2 : thromboxane A2 (issue de ⁷⁴).

Des taux circulants élevés de 5-HT ont été trouvés chez les patients atteints d'HTAP.⁷⁵ En plus d'une diminution de son stockage dans les plaquettes, la synthèse endothéliale pulmonaire de 5-HT est augmentée chez les patients atteints d'HTAP et peut agir sur les CMLs-AP adjacentes et les fibroblastes de manière paracrine. Cette synthèse est due à la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) et l'expression de cette enzyme est augmentée dans l'HTAP. Chez les rats développant l'HTAP induite par l'hypoxie, une augmentation de la réponse à la 5-HT est augmentée et cette réponse est médiée par le récepteur 5-HT1B dont l'expression est augmentée au niveau des vaisseaux pulmonaires.⁷⁶ La 5-HT peut augmenter la susceptibilité des souris *BMPR2*^{+/-} à l'HTP induite par l'hypoxie. Les CMLs-AP de ces souris *BMPR2*^{+/-} ont présenté une synthèse d'ADN et une activation de la protéine ERK ½ régulée par le signal extracellulaire en réponse à la 5-HT, par rapport aux CMLs-AP des souris Walt-type (WT). Ainsi, la 5-HT pourrait jouer un rôle de « second hit » nécessaire facilitant la pathogénicité de l'insuffisance d'activité des récepteurs BMPRII.³⁶ Il existerait un effet synergique entre la 5-HT et le récepteur BMPRII (Figure 25).

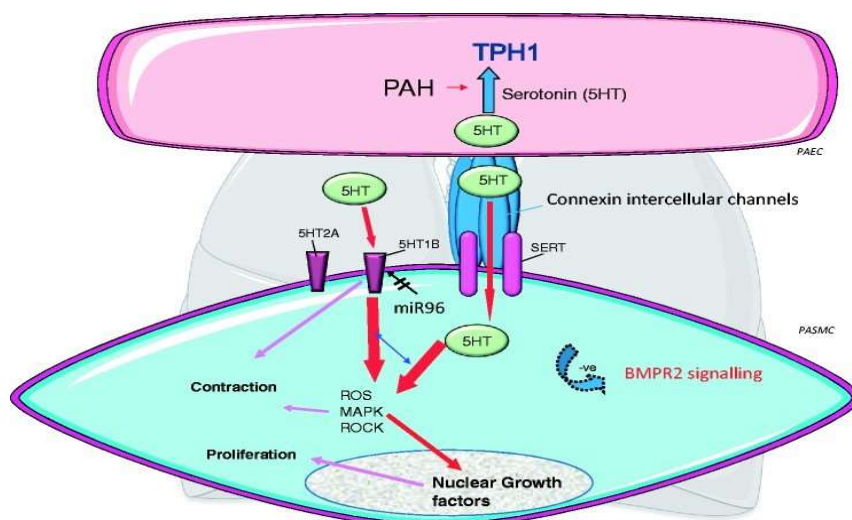


Figure 25. La synthèse de la sérotonine via le tryptophane hydroxylase 1 (TPH1) dans les CE des APs (PAEC) de modèles rongeurs d'HTP et de patients atteints d'HTAP. La 5-HT peut agir de manière paracrine sur les CMLs-AP sous-jacentes, ceci est facilité par les jonctions myoendothéliales (canaux intercellulaires de connexion). Elle peut pénétrer dans ces CMLs-AP via le transporteur de SERT ou activer les récepteurs de 5-HT. Le récepteur important dans la CMLs-AP est le récepteur 5-HT1B, régulé à la hausse par le microARN96 (miR96) (par une diminution de l'expression du miR96) chez les patients atteints d'HTAP. 5-HT1B et SERT coopèrent pour induire la contraction et la prolifération des CMLs-AP via une augmentation des ROS et l'activation des voies de signalisation en aval telles que MAPK et rho-kinase (ROCK). Une augmentation de la 5-HT peut optimiser un phénotype d'HTP chez les souris *BMPR2*^{+/-} en facilitant l'insuffisance d'activité de BMPRII (issue de³⁶).

▪ NO et prostacycline

Le rôle de la voie de NO dans l'HTP fait l'objet d'un intérêt intense, notamment sur la stratégie thérapeutique. Dans l'HTAP, une diminution de la biodisponibilité du NO due à une diminution de la

synthèse du NO a été identifiée. Ceci est induit par une diminution de l'expression de la NOS et une augmentation du stress oxydatif qui augmente la production de ROS notamment le superoxyde. Les ROS interagissent avec le NO tout en réduisant les niveaux de NO.⁷⁷⁻⁷⁹ Aussi, des niveaux élevés d'ADMA, connu comme étant un inhibiteur compétitif endogène de la eNOS, ont été trouvés chez les patients atteints d'HTAP.⁷⁹

L'une des conséquences d'une diminution de la biodisponibilité du NO est une baisse des niveaux de GMPc dans les CMLs-AP ; et cette baisse est accentuée par une expression accrue de l'enzyme PDE5, une enzyme qui dégrade le GMPc. La PDE5 catalyse la conversion du GMPc en GMP. Par conséquent, il y a une diminution des effets vasodilatateurs et antiprolifératifs sur les CMLs-AP.^{50,77}

Dans l'HTP, la synthèse de PGI₂ est diminuée et les niveaux de TxA₂ sont augmentés, ce qui entraîne une vasoconstriction, une prolifération des CMLs-AP et une agrégation plaquettaire.^{80,81}

▪ Le peptide vasoactif intestinal (VIP)

Le VIP est un neuromédiateur peptidique. Il est connu comme étant un puissant vasodilatateur pulmonaire et systémique. Il a également une action inhibitrice de la prolifération des CML et de l'agrégation plaquettaire. Son action passe par deux sous-types d'un récepteur : VPAC-1 et VPAC-2. Ce récepteur est couplé à l'AC pour induire une vasorelaxation par l'activation d'AMPc et GMPc.⁷⁶

Notons que ces deux récepteurs VPAC-1 et 2 sont exprimés sur la surface de tous les vaisseaux sanguins. Chez des patients HTAP, des concentrations sériques basses de VIP ont été mesurées au niveau des APs. Une administration en inhalation de VIP a induit des réponses positives chez un petit nombre de patients.⁷⁶

Autres mécanismes impliqués dans l'HTAP

▪ Les canaux potassiques

Même si l'HTAP implique aussi la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose, les mécanismes de la vasoconstriction pulmonaire hypoxique (VPH) apportent des réponses à sa pathogénèse. On parle de VPH lorsque l'hypoxie entraîne une inhibition d'un ou plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants (Kv) des CML des APs résistives. L'inhibition des Kv entraîne une dépolarisation membranaire qui va augmenter l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants induisant l'entrée de Ca²⁺ au niveau cytosolique. Ceci va induire une initiation de la contraction des CMLs-AP. Des études ont montré une sous expression des canaux Kv 1.5 chez des patients HTAP. D'autres études ont démontré la sous expression des Kv 1.5 et Kv 2.1 chez les rats ayant développé l'HTAP induite par une hypoxie pulmonaire. La perte sélective de canaux Kv entraîne une dépolarisation des CMLs-AP qui conduit à une augmentation du

Ca²⁺cytosolique aboutissant à la fois à une vasoconstriction et une prolifération cellulaire.⁷⁶ Ainsi, activer ces canaux Kv devrait entraîner une vasodilatation et une réduction du remodelage vasculaire pulmonaire. En outre, la plupart des effets hémodynamiques de NO sont médiés par GMPc qui induit une vasodilatation via l'activation de la PKG lequel phosphoryle et active les canaux potassiques Ca²⁺-dépendants de grande conductance (BK_{Ca}).⁷⁶

- La superfamille de *Transforming growth factor beta* (TGFβ)

La famille de TGFβ est formée de médiateurs multifonctionnels incluant les BMP (Bone Morphogenic Protein), l'activine et des facteurs de croissance et de différenciation. Ces molécules qui étaient initialement identifiées comme régulant la croissance et la régulation des os, jouent divers rôles dans une grande variété de processus physiologiques. Des mutations des récepteurs du TGFβ, ALK-1 ou ENG, ont été identifiées dans des HTAP associés à la maladie de Rendu-Osler.⁷⁶

Facteurs de transcription (FT)

Les facteurs de transcription (FT) sont des protéines de liaison à l'ADN spécifiques d'une séquence qui contrôlent le processus de transcription. Les FT se fixent à des séquences spécifiques d'ADN adjacentes aux gènes grâce à leurs domaines de liaison à l'ADN (un ou plusieurs domaines de liaison). Les FT sont classés en deux grandes catégories selon les fonctions dans lesquelles elles sont impliquées : les FT généraux et les FT régulateurs ou spécifiques à un gène. Les premiers participent à la régulation transcriptionnelle de base tandis que les seconds contribuent à l'expression différentielle des gènes en exerçant un contrôle sur un ou quelques gènes. Les FT régulateurs déterminent si le gène est « activé » ou « désactivé » en se liant à des sites régulateurs se situant à une certaine distance de la zone codante. Les FT garantissent si les gènes sont exprimés dans la bonne cellule, au bon moment et à la bonne quantité en fonction des besoins de l'organisme. Des études ont démontré que les FT ont besoin d'autres molécules, telles que des coacteurs et des répresseurs appelées « corégulateurs », pour réguler leurs activités.⁸² Par ailleurs, des nombreux stimuli et conditions pathologiques (hypoxie, stress oxydatif) induisent le remodelage vasculaire sévère, caractéristique de l'HTP, par l'activation d'une cascade complexe de voies de signalisation impliquant la prolifération (MAPK, ERK) la différenciation et l'inflammation des cellules vasculaires. Ces voies de signalisation modulent l'activité de certains FT. Cela conduit à l'activation d'un programme de gènes vasculaires dans le noyau qui se manifeste par un phénotype vasculaire HTP. Des nombreux FT et coacteurs ont été impliqués dans l'HTAP et le dysfonctionnement du ventricule droit, parmi lesquelles il y a le FoxO (Forkhead box O), le NFAT (facteur nucléaire des cellules T activées), le CBF1/RPB-Jk (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J region), les HIFs (facteurs inductibles hypoxiques), le coacteur transcriptionnel PKM2 (isozyme de la pyruvate

kinase), le corépresseur CtBP1 (membre de la famille des protéines de liaison C-terminal CtBP1) et le TWIST1 (facteur de transcription b HLH 1 de la famille Twist).^{83,84}(Figure 26)

Les FoxO sont des puissants activateurs transcriptionnels mais peuvent agir aussi comme répresseurs transcriptionnels. Il existe quatre isoformes de FoxO chez les mammifères : FoxO1, FoxO3, FoxO4 et FoxO6. Les FoxO contrôlent diverses réponses cellulaires notamment la prolifération, l'apoptose, réparation d'ADN et sont impliqués dans le maintien de la structure vasculaire. La déplétion de FoxO1 spécifiquement dans les CMLs-AP est impliquée dans la pathogénèse de l'HTAP.^{82,85}

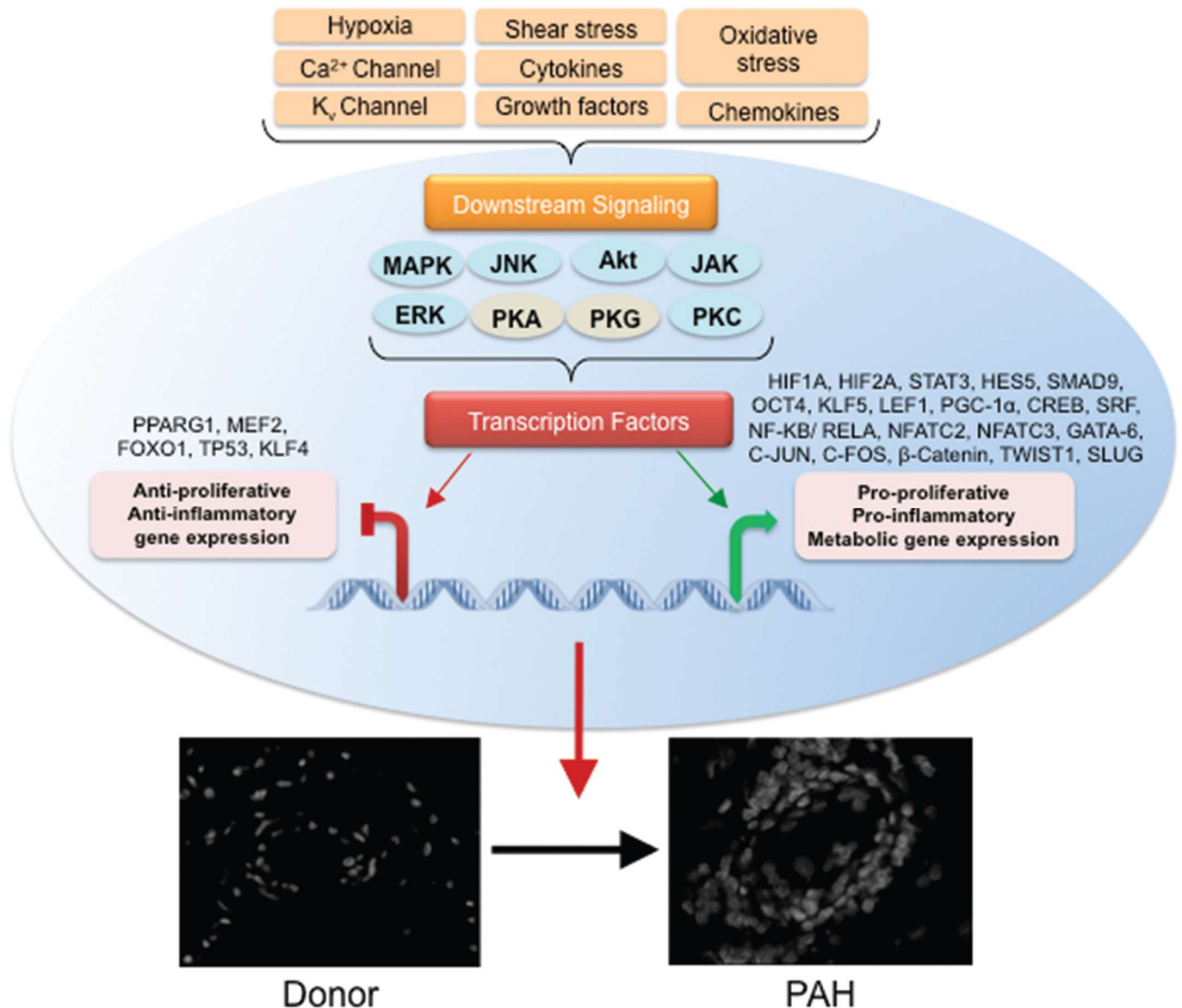


Figure 26. Rôle des facteurs de transcription dans la pathogénèse de l'HTAP. De multiples stimuli pathologiques (hypoxie, stress de cisaillement, stress oxydatif, mitogènes et l'inflammation (cytokines et chimiokines)), déclenchent des cascades de signalisation en aval (MAPK, JNK, PI3K-Akt, JAK-STAT, ERK, PKA, PKG, PKC, etc.), modulant le recrutement et l'activation des FT qui déterminent les réponses transcriptionnelles spécifiques au stimulus dans l'HTAP. ERK, kinase régulée par le signal extracellulaire ; JAK-STAT, Janus kinase-transducteur de signal et transducteur et activateur de transcription ; JNK, kinases N-terminales c-Jun ; MAPK, protéine kinase activée par l'agent mitogène ; MEK, kinase activée par des agents

mitogènes; NPI3K-Akt, phosphatidylinositol 3-kinase-Akt ; PKA, protéine kinase dépendant de AMPc (Adénosine monophosphate cyclique) ou protéine kinase A ; PKC, protéine kinase C ; PKG, protéine kinase dépendante de la GMPc ou protéine kinase G(issue de ⁸²).

NFAT est aussi impliqué dans l'HTAP. L'augmentation de la concentration de Ca^{2+} intracellulaire active plusieurs voies de transduction du signal en aval et des FT qui pourraient être impliqués dans la prolifération des CMLs-AP, en particulier NFAT. NFAT réduit l'expression des canaux potassiques et augmente la prolifération des CMLs-AP. Il a été montré que la délétion ou l'inhibition pharmacologique de NFAT prévient et régresse le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chez un modèle animal. ¹

Les HIFs sont des régulateurs clé de la réponse moléculaire à l'hypoxie. Ils ciblent les gènes contrôlant la vascularisation, la prolifération cellulaire, la migration et le métabolisme. Ces sont des hétérodimères composés de sous-unités α (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α) et de sous-unité β (HIF-1 β).⁸²HIF-1 comprend deux sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 α jouerait un rôle dans le développement de l'HTP induite par l'hypoxie. Les HIF-1 sont susceptibles d'être impliqués dans de nombreux mécanismes qui médient le HTP. De plus, la protéine HIF-1 α est détectable dans les CMLs-AP de patients atteints d'HTAP.¹La déplétion conditionnelle de HIF-1 α dans les CMLs-AP améliore le degré de remodelage chez les souris en hypoxie chronique.⁸²

Le corépresseur de transcription RBPJ/CSL est aussi impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP. En effet, La voie de signalisation Notch joue un rôle important dans le développement vasculaire et est activée lors d'un contact cellule à cellule ou des interactions entre les récepteurs Notch et leurs ligands (Delta, Jagged). La liaison du récepteur Notch et son ligand entraîne la libération du domaine intracellulaire de Notch (NICD). Ce qui active la principale cible de Notch en aval qui est CBF1/RBP-Jk de la famille CSL des facteurs de liaison de l'ADN chez les mammifères. Une régulation à la hausse des récepteurs Notch et leurs ligands est observée dans les CML de l'AP des cas d'HTP hypoxique chez la souris.⁶³

PKM1 et PKM2, des isoformes du pyruvate, sont exprimés dans différents types de tissus et cellules. En plus de son rôle dans la glycolyse, PKM2 est impliqué dans d'autres fonctions cellulaires notamment la translocation dans le noyau lors d'une stimulation mitogène et oncogène. Dans le noyau, il est à la fois un coactivateur et une protéine kinase en phosphorylant les histones d'où son rôle crucial dans la régulation épigénétique de la transcription des gènes de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Des études ont montré l'état métabolique des fibroblastes adventitiels des APs (PAAFs) isolés chez des veaux hypertendus et des patients HTAPi, et l'activité enzymatique glycolytique de PKM2 dans ces cellules..PKM2 ades fonctions métaboliques.⁸²Une prolifération accrue et une activation inflammatoire peuvent se produire lors de changements du métabolisme cellulaire vers la glycolyse aérobie et ces changements métaboliques ont

été observés dans les CEs, CMLs-AP et les PAAFs dans l'HTP. Le knockdown de PKM2 diminue la prolifération des PAAFs dans l'HTP.⁸²

Les corépresseurs transcriptionnels CtBP1 représentent une famille dimérique de répresseurs codés par deux gènes paralogues : CTBP1 et CTBP2 qui jouent un rôle majeur dans le développement cellulaire. Ce sont des « détecteurs » de l'état métabolique des cellules et peuvent moduler de nombreux aspects phénotypiques cellulaires. Ces corépresseurs promeuvent la survie cellulaire tout en réprimant l'apoptose. Des études ont démontré l'activation de CtBP1 et le contrôle de la prolifération des PAAFs, de la résistance à l'apoptose et de l'expression des gènes inflammatoires dans les PAAFs chez les modèles animaux et patients HTP.⁸²

TWIST1 est un FT qui joue un rôle crucial dans le remodelage vasculaire pulmonaire caractéristique de l'HTAP chez l'humain et les modèles expérimentaux par le processus de la transition endothéliale-mésenchymateuse (EndoMT). En effet, BMPRII régule négativement l'expression de Twist1. La protéine Twist 1 joue un rôle clé dans la régulation transcriptionnelle des cellules mésenchymateuses.⁸² La réduction de la voie BMPRII, dans l'HTAP, optimise l'expression de TWIST dont la fonction promeut la transition endothéliale-mésenchymateuse.

7) Génétique de l'HTAP

La compréhension de la génétique de l'HTAP a eu beaucoup de progrès durant les 21 dernières années. Il existe chez environ 6 à 10% des patients HTAP des antécédents familiaux.⁸⁶ Souvent les patients, identifiés au départ ayant une HTAP sporadique dite HTAPi, sont ré étiquetés par la suite dans le groupe d'HTAPh car une cause de mutations génétiques est identifiée. En effet, environ 25 à 30% des patients HTAPi ont une cause génétique et basculent dans le groupe des HTAPh.⁸⁶ Ainsi, l'exploration génétique fait partie intégrante de l'investigation dans l'HTAP. Actuellement, dix gènes sont connus de manière convaincante étant associés à l'HTAP mais d'autres gènes impliqués pourraient être découverts dans les prochaines années. Ces gènes associés à l'HTAP sont *ACVRL1*, *BMPRI1*, *BMPRI2*, *CAVI*, *ENG*, *KCNK3*, *KDR*, *SMAD9*, *TBX4* et *TET2*.⁸⁷ (Tableau 4)

Gène	Pourcentage de personnes présentant un variant pathogène dans le gène
<i>ACVRL1</i>	Rare (16/2572)
<i>BMPRI1B</i>	Rare (4/2572)
<i>BMPRI2</i>	75% des cas d'HTAPH et 201/ 2572 cas d'HTAP
<i>CAVI</i>	Rare (10/2572)
<i>ENG</i>	Rare (6/2572)
<i>KCNK3</i>	Rare (3/2572)
<i>KDR</i>	Rare (4/2572)
<i>SMAD9</i>	Rare (13/2572)
<i>TBX4</i>	Rare (23/2572)
<i>TET2</i>	Rare (10/2572)

Tableau 4 : Hypertension artérielle pulmonaire héritable (HTAPH) : Gènes impliqués dans l'HTAP. Les gènes associés sont classés par ordre alphabétique. Etude effectuée sur 2572 patients atteints d'HTAP (6^e symposium mondial de l'HTAP)(issue de ⁸⁷).

- Mutation du gène *BMPRI2*

Selon une étude réalisée dans une cohorte de 2572 patients HTAP, la mutation du gène *BMPRI2* est la plus connue associée à l'HTAP avec plus de 75% des patients (Tableau 4). Les mutations *BMPRI2* présentent une pénétrance incomplète car le risque de développer la maladie pour les porteurs des mutations de ce gène est seulement de 14% pour les hommes et de 42% pour les femmes.⁸⁷ Ces mutations sont identifiées dans 70 à 80% des formes familiales et dans 10 à 20% des formes sporadiques ou idiopathiques.⁵⁶ Ces mutations sont de divers types selon le domaine où elles sont localisées.(Figure 27) Elles peuvent être de plusieurs types notamment entraînant un codon stop prématuré (délétion, duplication, codon stop prématuré) au niveau des différents domaines du récepteur BMPRII.⁸⁸

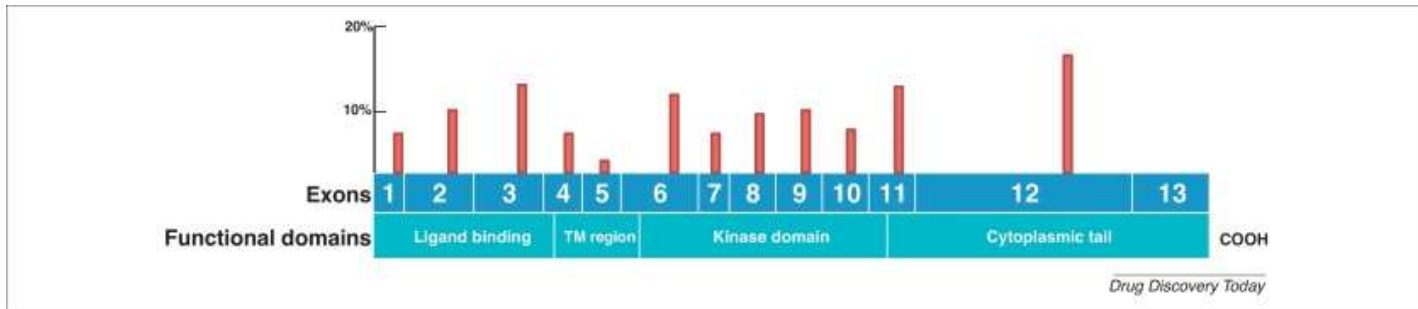


Figure 27 : Mutations de *BMPR2* associées à l'HTAP. Les barres rouges représentent toutes les différentes catégories de mutation et leur occurrence relative dans l'exon. Abréviation : Région TM, région transmembranaire (issue de ⁸⁸).

Ces mutations entraînent une perte de fonction de l'allèle à l'état hétérozygote et cela suffit à aboutir à la susceptibilité de la pathologie. Si la mutation entraîne une perte des deux allèles alors cela entraîne la non-viabilité du porteur.⁶⁹

- Voie de signalisation BMPRII

Le gène *BMPR2* code pour le récepteur de la protéine morphogénique osseuse de type II (BMPRII), un récepteur membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs TGF- β . La famille de ces récepteurs se signalent sous forme de complexes hétéromériques et elle se divise en deux catégories : les récepteurs de type I au nombre de sept (ALK 1-7) et les quatre récepteurs de type II : BMPRII, TGF- β R1, ACVR2a et ACVR2b. Les ligands de ces récepteurs comprennent les TGF- β , les BMPs, les facteurs de croissance et de différenciation, les activines (ACVR) et les inhibines. Les BMPs forment une famille de 20 ligands divisés en quatre sous-groupes : BMP 2/4, BMP5/6/7/8, BMP9/10, BMP12/13/14. Chaque ligand possède une affinité plus ou moins importante pour un récepteur donné. En présence d'un ligand, les récepteurs de type II forment un complexe avec des récepteurs de type I, par exemple un ligand BMP dimère active un complexe contenant deux récepteurs de type I et deux récepteurs de type II.^{69,89} Pour la voie canonique de BMPRII, en liaison avec un ligand, le récepteur BMPRII, activé, phosphoryle le récepteur de type I qui va transmettre le signal intra-cellulaire en phosphorylant les récepteurs SMAD 1/5/8. Une fois phosphorylé, le complexe SMAD 1/5/8 migre vers le noyau en se liant avec la navette commune le co-SMAD 4. Dans le noyau, les SMAD induisent le signal transcriptionnel. (Figure 28) La voie de signalisation de BMPRII passe aussi par la phosphorylation des MAP-Kinases, ERK1/2 et p38 indépendamment de la voie des SMAD.^{89,90} La voie de signalisation BMP est complexe et cela est amplifié par la multiplicité des ligands, par les inhibiteurs endogènes de la voie et par les différents types de phosphorylation modulant leur activité.

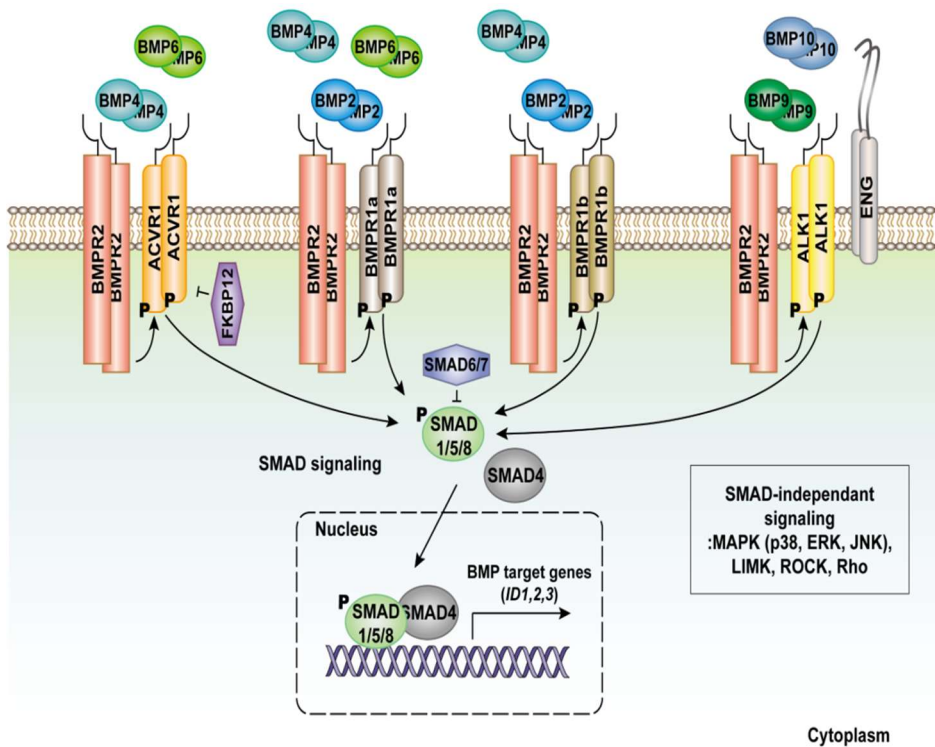


Figure 28 : Résumé schématique de la voie de signalisation BMPRII. Les liaisons entre les ligands (BMP) et les récepteurs BMPRII associées aux différents récepteurs de type I (ALK1, BMPRIb, BMPRIa, ACVR1) induisent une cascade de signalisation médiée par les BMP. Les ligands BMP4 et BMP6 se lient au complexe de récepteurs BMPRII- ACVR1 ; BMP2, BMP4 et BMP6 se lient à BMPRII-BMPRIa ; BMP2 et BMP4 se lient à BMPRII-BMPRIb et BMP9 et BMP10 se lient à BMPRII-ALK1. L'activité d'ACVR1 est régulée négativement par l'interaction avec FKBP12. L'ENG (endogline), un corécepteur d'ALK1, favorise la formation du complexe avec ce récepteur. L'engagement des ligands BMP déclenche la phosphorylation de SMAD1/5/8, qui se lie ensuite à SMAD4. Le complexe SMAD se transloque dans le noyau pour induire l'expression du gène cible. Les BMP ont d'autres des gènes cibles : les protéines ID, MAPK, LIMK, ROCK et Rho sont activés par la protéine SMAD de manière indépendante. (Issue de⁹¹)

La liaison des BMPs à leurs récepteurs hétérodimères déclenche l'une des deux voies de signalisation, soit la voie SMAD-dépendante, soit la voie SMAD- indépendante. Il existe 3 classes de SMAD, qui sont toutes importantes pour la transduction du signal BMP : les récepteurs-SMAD (R-Smads) qui interagissent directement avec les récepteurs de type I activés ; les SMAD communs (co-Smads) forment des complexes avec les R-SMAD activés pour la régulation de l'expression génétique dans le noyau ; et les SMAD inhibiteurs (I-Smads) qui régulent négativement la signalisation des BMP, en inhibant la transduction du signal en plusieurs points de la voie. SMAD6 et SMAD7 (I-Smads), induits par la signalisation BMP, se lient aux récepteurs de type I et régulent ainsi négativement la signalisation BMP par une boucle de rétroaction négative.⁹² (Figure 29)

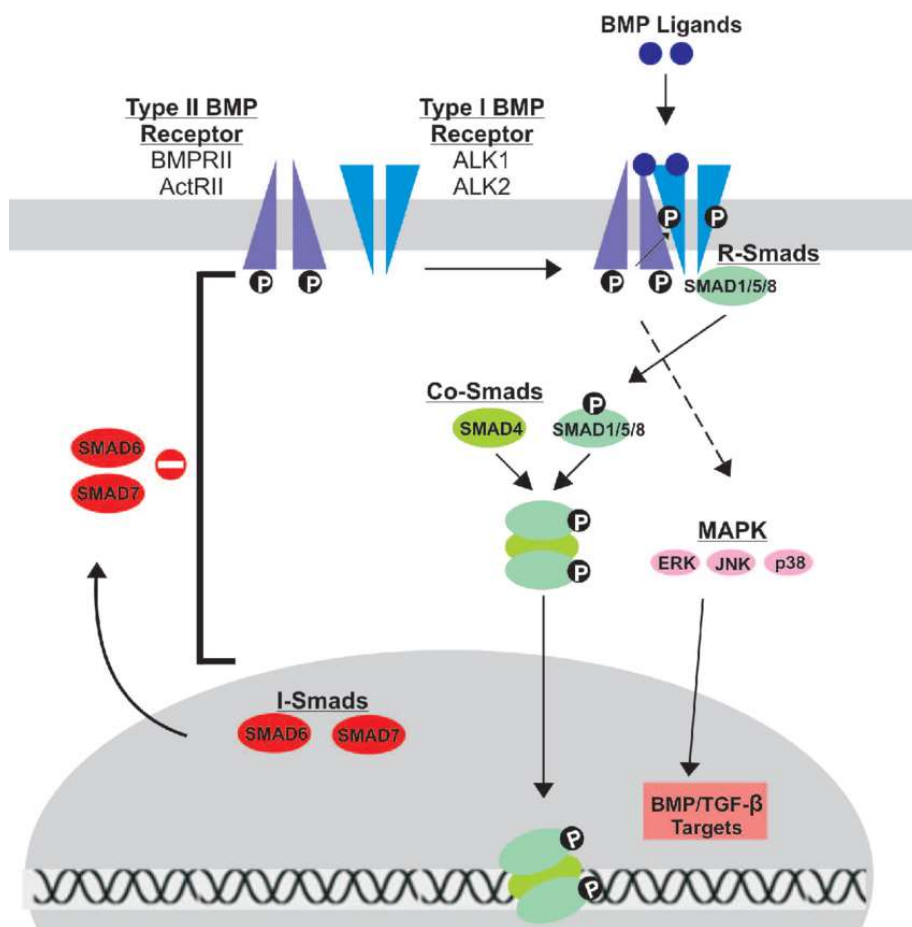


Figure 29 : Schéma de la transduction du signal BMP. Lors de la liaison du ligand BMP aux récepteurs BMP de type II, les récepteurs BMP de type I subissent une phosphorylation croisée, recrutant les R-Smads (Smads 1/5/8) dans le domaine intracellulaire du récepteur de type I et initiant la transduction du signal par phosphorylation. Les R-Smads activés forment ensuite un complexe hétéromérique avec les Co-Smads (Smad 4) avant de se déplacer vers le noyau pour réguler l'expression génétique. Les Smads inhibiteurs (Smads 6/7) résident dans le noyau, migrent vers le cytoplasme et régulent négativement la signalisation BMP en inhibant la transduction du signal en plusieurs points de la voie (Issue de⁹²)

Des études ont démontré que la voie BMP est impliquée dans une série de fonctions cellulaires notamment l'ostéogénèse et la croissance cellulaire, et la différenciation cellulaire. Toutefois, au niveau du lit vasculaire pulmonaire, l'une des fonctions les plus importantes de BMPRII est d'inhiber la prolifération des CMLs-AP et l'apoptose des CEs. Ainsi, l'altération de la voie BMPRII (ou la mutation perte de fonction du gène *BMPR2*) induit une prolifération des CMLs-AP et ainsi l'HTAP.⁹³

- Caractéristiques de l'HTAP associée à une mutation du gène *BMPR2*

Les patients porteurs de mutations de *BMPR2* ont des profils hémodynamiques plus sévères et présentent une réponse réduite aux tests de vasodilatations aigue. Ces patients développent la maladie environ 10 ans

plus tôt que ceux non porteurs de mutations. Les patients HTAP présentant des mutations *BMP2* faux-sens (induisant changement d'un acide aminé) avaient des formes plus graves que ceux ayant des mutations tronquées (codon-stop prématuré). La plupart de ces études ont été faites à partir des données du registre français de l'HTP ou le *New York Presbyterian pulmonary hypertension* ou d'autres registres officiels.⁹⁴ Les mutations *BMP2* déclenchent la maladie d'une façon précoce. Cependant les mécanismes expliquant ce déclenchement précoce restent encore non inconnus. La plupart de ces mutations sont de perte de fonction et diminuent la voie de BMP au profit de la voie de TGF- β .⁹⁵

▪ Mutations du gène *KCNK3*

Il existe d'autres voies impliquées dans la pathogénèse de l'HTAP en dehors de la voie BMP. C'est le cas de la protéine TASK-1, un canal potassique sensible au pH ou *KCNK3*, une protéine codée par le gène *KCNK3* (*Potassium channel subfamily K member 3*). *KCNK3* joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire. Des mutations perte de fonction de *KCNK3* ont été identifiées chez des patients HTAP.⁹⁶ De plus, les niveaux d'expression protéique de *KCNK3* au niveau pulmonaire sont réduits dans l'HTAPh ainsi que dans l'HTAPi. Des études sur des rats *Kcnk3*KO ont montré une augmentation significative des pressions systoliques du ventricule droit (PSVR) en réponse à l'hypoxie. Ces rats ont présenté une augmentation significative de la PSVR à la suite de l'exposition à la monocrotaline qui induit une lésion endothéliale pulmonaire. Ce qui suggère l'altération des cellules immunitaires circulantes pourrait être à l'origine de la susceptibilité de l'HTAP par les patients porteurs de mutations de gènes *KCNK3*.⁹⁷

▪ Mutations de gènes *ACVRL1* et Endogline (*ENG*)

Des études ont identifié d'autres mutations de gènes, bien que moins fréquentes, impliquées dans la pathogénèse de l'HTAP notamment celles des gènes *ACVRL1* (la kinase du récepteur de l'Activine A de type 1 ou ALK1) et l'*ENG*.⁹⁵ Les patients porteurs de mutations *ACVRL1* sont caractérisés par un âge significativement plus bas au moment du diagnostic de l'HTAP et du décès que ceux non porteurs de ces mutations. Cette mutation induit une haplo-insuffisance de l'*ACVRL1* qui conduit à un état vasculaire pulmonaire prédisposant le développement de l'HTAP.⁹³

ENG est dépourvue d'activité kinase et renforce la liaison de ligand BMP à ses récepteurs. Une mutation germinale d'*ENG* a été identifiée chez un patient HTAP. Cependant les patients porteurs de mutations *ENG* présentent un risque plus faible de développer l'HTAP que ceux porteurs de mutations *ACVRL1*.⁹³

▪ Mutations d'autres gènes

Des mutations du gène *CAV-1* (qui code pour la protéine caveolin-1) ont été découvertes associées à l'HTAP.⁸⁵ Ces mutations ont été identifiées dans une grande famille d'HTAP et dans des formes

sporadiques de l'HTAP. Les mutations de *CAV-1* associées à l'HTAP présentent une pénétrance réduite. Le rôle de la *CAV-1* a été confirmé avec des études montrant une réduction de l'expression de *CAV-1* dans les poumons de patients atteints d'HTAP, indépendamment de mutation.⁹⁶ *CAV-1* code pour une protéine impliquée dans la formation des cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique et ce gène est fortement exprimé dans les CE où sont localisés les récepteurs BMPII. De plus, même en absence de mutation de gènes, les niveaux d'expression de *CAV-1* et *BMP2* sont réduits dans les poumons HTAP.⁹⁸

Le gène *TBX4* code pour le facteur de transcription T-box 4 qui est aussi impliqué dans le développement de l'HTAP chez les enfants. Dans cette étude, des cas d'HTAP avec des mutations du gène *TBX4* ont été décrits chez 7,5% des patients du cohorte.⁹⁵

Le gène *KDR* code pour le récepteur du facteur de croissance endothélial vasculaire VEGFR2 qui est impliqué dans l'angiogénèse.⁹⁹ Des mutations du gène *KDR* bien que très rares (0,01%) ont été associées au développement de l'HTAP. Des variants faux-sens de *KDR* sont observés dans les cas d'HTAP mais aussi dans plusieurs témoins non HTAP. Les patients porteurs de mutations *KDR* étaient plus âgés au moment du diagnostic.⁹⁹

La protéine TET2 est reconnue comme un régulateur important de l'hématopoïèse normale, en particulier la myélopoïèse¹⁰⁰. Des mutations germinales rares, prédites comme délétères, dans le gène *TET2* ont été identifiées chez des patients HTAP. Des souris dépourvues de TET2 ont développé spontanément une oblitération vasculaire pulmonaire, une inflammation et une HTP.¹⁰¹

La protéine SOX17 est un régulateur clé dans la spécification des cellules germinales primordiales impliquées dans l'embryogénèse.¹⁰² Des études de séquençage du génome entier ont identifié le gène *SOX17* comme nouveau gène de risque dans l'HTAP, avec un mode de transmission dominant et une pénétrance incomplète.¹⁰³

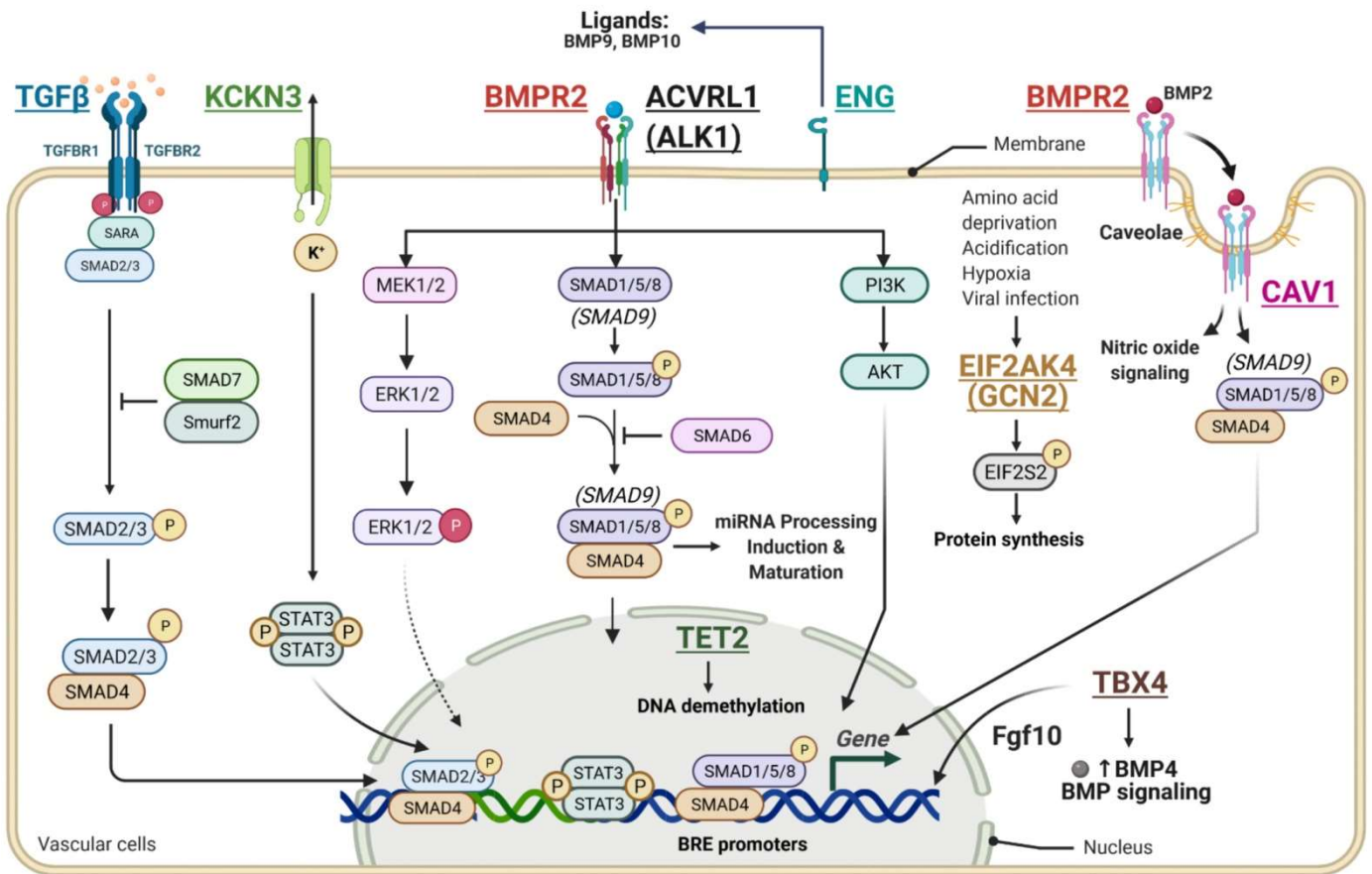


Figure 30. Schéma des gènes de prédisposition de l'HTAP

Les mutations de *BMPR2*, *ENG*, *ALK1*, *SMAD9*, *EIF2AK4*, *CAV-1*, *KCNK3*, et *TBX4* altèrent la signalisation BMP et potentialisent le développement de l'HTAP. Ces mutations génétiques sont caractérisées par une perte de fonction dans l'HTAP et convergent au sein de la signalisation BMP-SMAD1/5/8, augmentant la prolifération, la résistance à l'apoptose, la migration des cellules vasculaires et le développement de l'HTAP. Les mutations du gène *KCNK3* induisent une dépolarisation de la membrane et l'ouverture des canaux VDCC, La perte de *CAV-1* induit la perturbation des cavéoles, bloque l'initiation de la signalisation SMAD, augmente l'activité de la eNOS et potentialise le développement de l'HTAP par la nitration de la PKG. *TBX4* joue un rôle central dans le développement des voies respiratoires et de la ramification des poumons pendant l'embryogenèse par son interaction avec le facteur de croissance des fibroblastes 10 (FGF10). *ACVRL1*, activin receptor-like 1 (ALK1); *CAV-1*, Caveolin-1; *ENG*, Endoglin; *EIF2AK4*, Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 4; *SMAD9*, mothers against decapentaplegic homolog 9; *STAT3*, Signal Transducer and Activator of Transcription 3; *TBX4*, T-Box Transcription Factor 4. (Issue de ¹⁰⁴)

Il existe plusieurs gènes dont les mutations prédisposent à l'HTAP. Les mécanismes d'action incriminés convergent vers une perte ou une altération de la voie BMP et une suractivation de la voie TGF-β qui est une voie pro-proliférative (Figure 30). D'autres voies impliquant l'embryogenèse (*TET2*), l'angiogenèse (*KDR*) et les canaux potassiques (*KCNK3*), semblent contribuer aussi à la pathogénèse de l'HTAP. Bien que plusieurs mécanismes physiopathologiques liés à ces gènes restent à élucider mais l'identification de

ces différents gènes représente une véritable avancée dans la compréhension et le diagnostic de cette pathologie multifactorielle.

5. Maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP)

1) Définition

La maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) est une forme rare d’HTP caractérisée par un remodelage vasculaire de l’ensemble du lit vasculaire. Cette atteinte se traduit, généralement, par une obstruction fibreuse des petites veines et veinules et aussi par une prolifération des capillaires. En effet, bien que la MVOP se définisse par une atteinte préférentielle des petites veines ou veinules pulmonaires, les lésions atteignent également les capillaires et le réseau artériel pulmonaires (Figure 31). La MVOP est caractérisée par un pronostic sombre. Elle est souvent mal diagnostiquée puisque 5 à 10% des formes d’HTAP considérées initialement comme idiopathiques sont en fait des MVOP.^{105,106} Les mutations du gène *EIF2AK4* et des approches non invasives comme la tomodensitométrie thoracique haute résolution (TDM-HR), le lavage bronchoalvéolaire (LBA), les gaz du sang artériel et la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO) permettent d’établir le diagnostic de la MVOP (Tableau 5).¹⁰⁶ Actuellement, il n’existe aucun traitement spécifique pour cette pathologie, seule la transplantation pulmonaire constitue son traitement définitif pour les patients éligibles.

Signes évocateurs d'une atteinte veineuse et capillaire (maladie veino-occlusive pulmonaire/hémangiomatose capillaire pulmonaire).

Tests de la fonction pulmonaire	Diminution de la DLCO (fréquemment <50 %)
	Hypoxémie sévère
HRCT thoracique	Lignes septales
Réponse au traitement de l'HTAP	Œdème pulmonaire possible
Antécédents génétiques	Mutations bi-alléliques d' <i>EIF2AK4</i>
Exposition professionnelle	Solvant organique (trichloréthylène)

DLCO : capacité de diffusion du monoxyde d’azote ; HRCT : tomodensitométrie du thorax à haute résolution.

Tableau 5. Signes évocateurs d'une atteinte veineuse et capillaire (Issue de ⁴²)

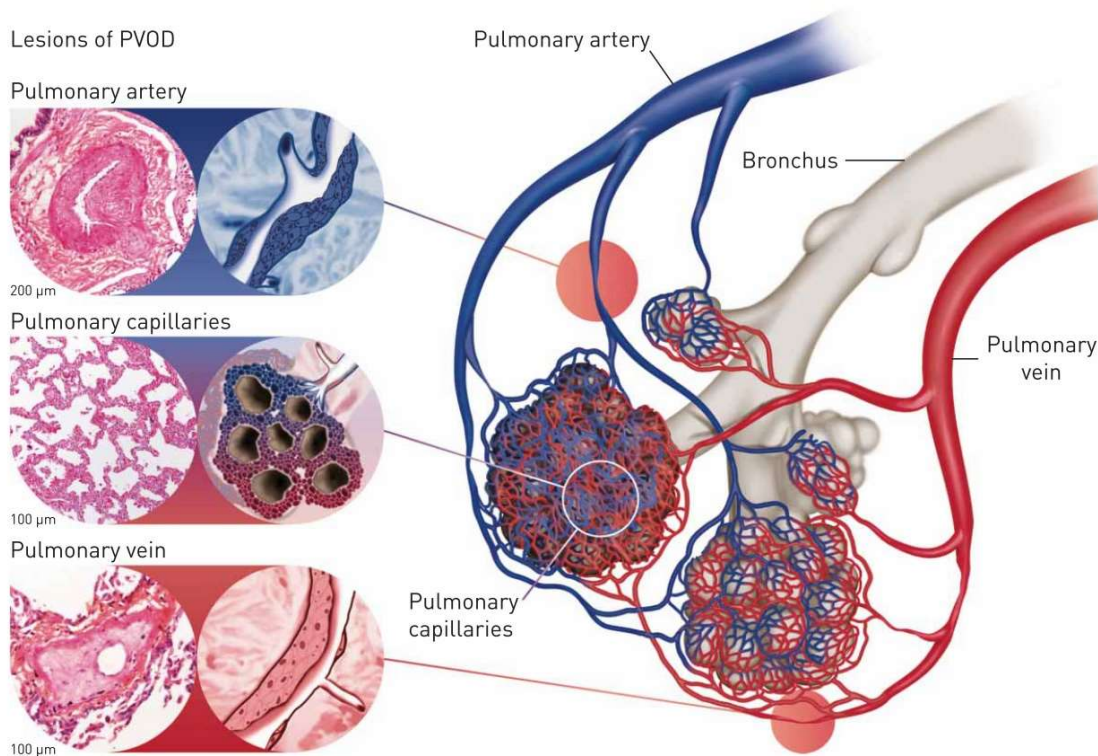


Figure 31 : lésions vasculaires et caractéristiques pathologiques de la MVOP. Les 3 compartiments de la microcirculation pulmonaire sont affectés dans la MVOP, bien qu'il y ait une implication préférentielle du système veineux pulmonaire. Les lésions veineuses comprennent une fibrose intimale des petites veinules pré-septales. Les lésions capillaires sont caractérisées par une prolifération exubérante de cellules endothéliales (hémangiomatose capillaire). Les lésions artérielles ressemblent à celles de l'hypertension artérielle pulmonaire avec fibrose intimale et une hypertrophie médiane, mais les lésions plexiformes complexes sont absentes. (Issue de¹⁰⁵).

D'après le dernier congrès de l'HTP, la MVOP est classée en tant que sous-groupe de l'HTAP étant donné que ces deux pathologies partagent des profils hémodynamiques et des présentations cliniques similaires. La MVOP est donc classée comme une HTAP avec des atteintes veineuses et/ou capillaires manifeste (Tableau 3).⁴² La MVOP peut être idiopathique ; elle peut survenir dans un contexte familial, c'est-à-dire elle peut être héritable, associée à des mutations génétiques notamment les mutations bi-alléliques perte de fonction du gène *EIF2AK4* qui restent jusqu'à ce jour les seules mutations ayant un lien avec la MVOP ; elle peut être induite par des toxines ou chimiothérapies (mitomycine C) ou par une exposition professionnelle aux solvants organiques (agents alkylants) ; et enfin elle peut être associée ou secondaire à d'autres pathologies telles que l'infection au virus VIH, la connectivité.¹⁰⁵ (Tableau 6)

1 .6 Pulmonaryveno-occlusive disease and/or pulmonary capillary haemangiomas

1.6 .1 Idiopathic

1.6 .2 Heritable

1.6. 2..1 EIF2AK4 mutation

1' .6.2 .2 Other mutations

1' .6. 3 Drugs, toxins and radiation induced

1'.6.4 Associated with:

1' 6.4.1 Connective tissue disease

1'.6.4.2 HIV infection

1.7 Persistent pulmonary hypertension of the newborn

Tableau 6. Classification de la MVOP (Issue de ^{42,106})

Des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4* ont été également identifiées chez des formes isolées dites sporadiques de la maladie. Ce qui semble confirmer que les mutations perte de fonction d'*EIF2AK4* constituent les seules mutations génétiques associées à la pathogénèse de la MVOP.¹⁰⁵

2) Epidémiologie

La MVOP est une pathologie rare ayant une incidence annuelle estimée de 0,1 à 0,2 cas par million. Cette prévalence n'est pas précise et est probablement sous-estimée car le diagnostic précis est difficile à établir sans une confirmation histologique (ou génétique). Or la confirmation histologique reste difficile à réaliser car les biopsies présentent des risques non négligeables chez les patients. Ainsi, de nombreux cas de MVOP restent classés à tort HTAP. Des études histopathologiques de patients atteints d'HTAP suggèrent que la MVOP représente peut-être 3 à 12 % des cas précédemment considérés comme HTAPi. La prévalence de la MVOP pourrait être encore plus élevée si les patients atteints d'une "HTAP réfractaire au traitement" et qui nécessitent une transplantation pulmonaire sont pris en compte. Ce qui suggère que le nombre réel de cas de MVOP est probablement plus élevé.¹⁰⁵ La MVOP touche tous les groupes d'âge, de la population pédiatrique à la population âgée. Les patients atteints de MVOP héréditaire sont jeunes au moment du diagnostic (27±10 ans) alors que les cas sporadiques de PVOD sont principalement des hommes avec un âge plus avancé au moment du diagnostic. Le sexe ratio est réparti d'une façon égale.¹⁰⁵

3) Diagnostic de la MVOP

Le diagnostic de la MVOP est idéalement anatomopathologique, mais tenant compte du risque des biopsies pulmonaires chez les patients HTP, celles-ci sont contre-indiquées. La difficulté d'obtenir un diagnostic histologique a poussé au développement des méthodes non invasives et plus efficaces notamment la tomodensitométrie à haute résolution, les gaz artériels et les explorations fonctionnelles respiratoires.¹⁰⁶ Pour les formes héritables de la maladie, l'identification des mutations du gène *EIF2AK4* est largement suffisante pour établir le diagnostic.

Présentation clinique

La présentation clinique de la MVOP est proche de celle de l'HTAPi et elle se manifeste par une dyspnée d'effort progressive. Une autre manifestation clinique de la MVOP est l'hippocratisme digital ou un syndrome de Raynaud qui sont parfois révélateurs. La survenue d'œdème pulmonaire à la suite d'un traitement spécifique d'HTAP constitue aussi un facteur déterminant du diagnostic de la MVOP. Les patients ayant des œdèmes pulmonaires présentent des crépitations à l'auscultation et des épanchements pleuraux. Enfin, il existe deux phénotypes caractéristiques de la maladie : le premier étant caractérisé par des patients, sans prédominance sexuelle ni d'exposition professionnelle, présentant souvent des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4* ; le deuxième est caractérisé par des patients plus âgés en général, de sexe masculin pour la plupart et exposés aux solvants et ne présentant aucune mutation génétique.¹⁰⁷

Le cathétérisme cardiaque droit

Il est nécessaire de réaliser le cathétérisme cardiaque droit (CCD) pour confirmer le diagnostic de la MVOP et évaluer le stade de la maladie et ainsi son stade de sévérité. Cependant, la MVOP est caractérisée par une même manifestation hémodynamique que l'HTAPi ; ces deux pathologies présentent des similarités en termes de PAPm, de PAPO et d'index cardiaque. Ainsi, la MVOP est caractérisée par une HTP précapillaire au CCD, avec une PAPm > 20mmHg et une PAPO < 15 mmHg, malgré une obstruction postcapillaire particulièrement au niveau des petites veines et veinules. La PAPO présente une valeur normale car elle ne reflète pas la réalité de la MVOP. En effet, la PAPO, ainsi mesurée, représente la valeur de la pression au niveau d'une veine, située en aval de l'obstruction veinulaire caractéristique de la MVOP, et cette veine est de même diamètre que l'artère occluse servant à la mesure par le CCD. La PAPO reflète donc la pression au niveau des veines et de l'oreillette gauche (Figure 32). Quelques patients (environ 10%) peuvent présenter une réponse hémodynamique positive à la suite du test de vasodilatation en aigu par le NO. En revanche, les inhibiteurs calciques ne sont pas recommandés chez ces patients MVOP.^{105,107}

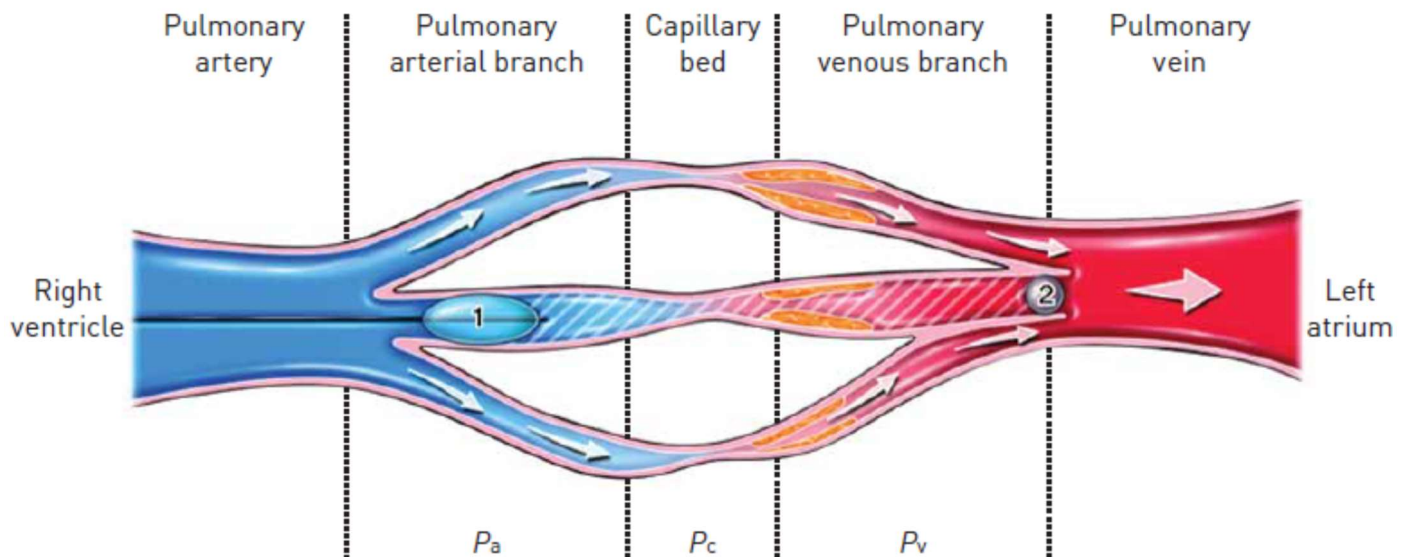


Figure 32 : PAPO normale dans la MVOP Dans la MVOP, les petites veines pulmonaires sont touchées, ce qui entraîne une élévation de la pression dans cette région (P_v), ainsi qu'une élévation de la pression capillaire pulmonaire vraie (P_c) et de la pression artérielle pulmonaire précapillaire (P_a). Les veines pulmonaires de plus grande taille ne sont généralement pas affectées par la MVOP, et c'est en fait la pression dans cette région qui est reflétée par la PAPO ; la colonne de sang statique (hachurée) occluse par le calage du cathéter artériel pulmonaire ou le gonflage du ballonnet d'une branche artérielle pulmonaire (ballonnet 1) reflète la pression dans une veine de diamètre similaire (ballonnet 2), généralement de plus grande taille que les vaisseaux affectés par la MVOP. Par conséquent, cette technique de mesure ne reflète pas l'élévation importante de la pression dans les vaisseaux de plus petit diamètre associés à la MVOP (issue de ¹⁰⁵).

Tomodensitométrie thoracique haute résolution

La tomodensitométrie (TDM) thoracique est un élément essentiel de diagnostic de la MVO après une confirmation de HTP précapillaire. En effet, les opacités en verre dépoli centro-lobulaires, les lignes septales et les adénopathies médiastinales sont les trois anomalies radiologiques significativement associées à la MVOP. 75% de patients, confirmés MVOP histologiquement, présentent deux ou trois de ces anomalies radiologiques. Ce qui signifie qu'un patient sur quatre ne présentait qu'un seul critère radiologique ou aucun. Selon une étude réalisée sur 24 cas de sclérodermie. 61,5% atteints d'HTP précapillaire, présentaient au moins 2 critères radiologiques de MVO précédemment cités, Ces patients étaient plus à risque de développer un œdème pulmonaire sous traitements spécifiques HTAP et aussi ils évoluaient plus rapidement à une transplantation pulmonaire ou au décès. Ces données suggèrent donc que la présence de ces critères scanographiques de MVOP pourrait corrélérer avec la survenue d'œdème pulmonaire.^{105,107}

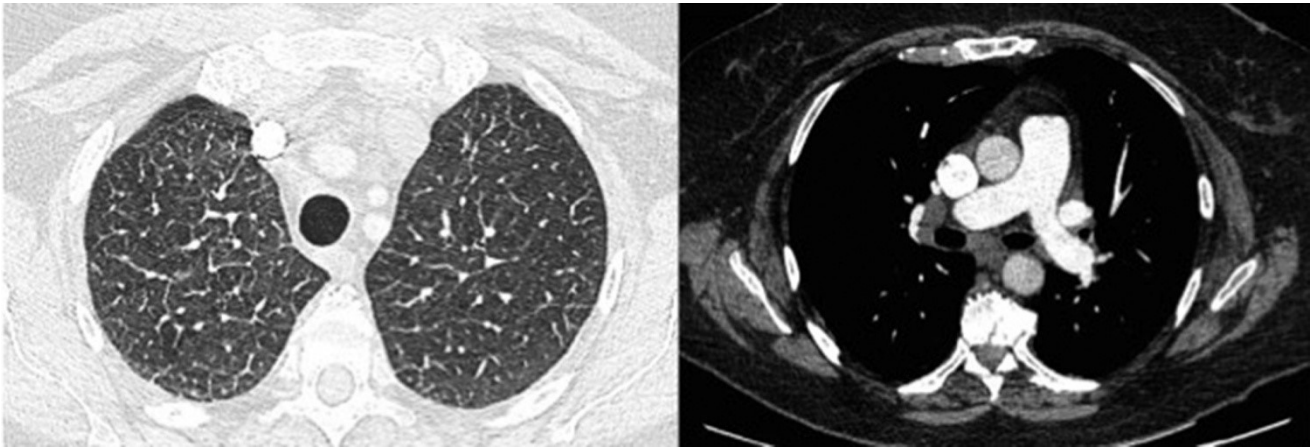


Figure 33 : Tomodensitométrie thoracique haute résolution (TDM-HR) d'un patient atteint de MVOP. La TDM-HR peut mettre en évidence des opacités en verre dépoli, des lignes septales et des adénopathies médiastinales (issue de ¹⁰⁷).

Explorations fonctionnelles respiratoires

Classiquement, les patients MVOP, sans une maladie pulmonaire associée, ne présentent pas de troubles ventilatoires obstructifs ni de syndrome restrictif. Cependant, une diminution de la DLCO est généralement observée chez ces patients. En fait, une diminution de la DLCO signifie une faible diffusion transmembranaire due au remodelage capillaire pulmonaire. Les sujets atteints de MVOP présentent une DLCO significativement plus basse (inférieure à 50%) et une hypoxémie plus sévère (PaO_2 inférieure à 65% en air ambiant le plus fréquemment) que les patients HTAP. Ceci est confirmé par une étude comparant les réponses physiologiques à l'effort des patients MVOP et celles des patients HTAPi et héritable. Et à l'issue de cette étude, les patients MVOP ont présenté une intensité de la dyspnée à l'exercice significativement plus élevée que chez les patients HTAP. C'est aussi la même tendance pour la demande ventilatoire et le gradient alvéolo-artériel en oxygène au repos et à l'effort. Ces résultats reflètent une diminution de la capacité de diffusion de la membrane alvéolocapillaire et les inégalités ventilation/perfusion plus marquée dans la MVOP. ^{105,107}

Lavage broncho-alvéolaire (LBA)

Le LBA n'est pas une technique de routine pour explorer l'HTP mais il peut contribuer en tant qu'aide diagnostique en cas d'une suspicion de MVOP. Une hémorragie alvéolaire occulte est fréquemment identifiée chez les patients MVOP contrairement chez les patients HTAP. La présence de cette hémorragie permet d'orienter le diagnostic, en revanche son absence n'exclut pas le diagnostic de MVOP. Enfin, le LBA est rarement utilisé du fait de l'hypoxie profonde chez les patients MVOP. ^{105,107}

4) Traitement de la MVOP

Selon les études réalisées sur la MVOP, cette pathologie a un pronostic plus sombre que celui de l'HTAP et seule la transplantation pulmonaire reste le traitement définitif pour les patients éligibles. Cependant, il existe des thérapies alternatives, palliatives qui servent de traitement de « bridge » jusqu'à la transplantation pulmonaire ou le décès du patient. En effet, des avancées considérables ont été réalisées dans le traitement de l'HTAP, au cours de cette dernière décennie, avec la mise au marché de plusieurs classes de médicaments : les prostacyclines et les agonistes de récepteurs de prostacycline (époprosténol par exemple) ; les antagonistes des récepteurs de l'endothéline 1 ou ERAs (bosentan par exemple) ; les inhibiteurs de la PDE5 et les stimulateurs de la guanylate cyclase soluble. Ces différentes thérapies utilisées en tant que vasodilatateurs, permettent d'améliorer la qualité de vie et le pronostic des patients HTAP. Et en ce qui concerne la MVOP, aucune étude randomisée n'a été réalisée pour pouvoir évaluer l'efficacité et la sécurité de ces traitements spécifiques d'HTAP dans la MVOP à une large échelle. Ainsi, la prise en charge de cette pathologie se base sur des faibles effectifs rapportés et sur l'expérience des centres d'experts.¹⁰⁷ Dans les directives cliniques, il n'y a pas de thérapies médicales établies pour la MVOP. Et il est connu que les traitements spécifiques d'HTAP provoquent des œdèmes pulmonaires voire le décès chez les patients MVOP. Cependant, des cas rapportés ont indiqué une efficacité de traitements HTAP chez les patients MVOP.¹⁰⁸ Enfin, selon les recommandations européennes de 2015, il y a une nécessité de suivre les patients MVOP dans des centres de compétence de l'HTP bénéficiant d'une expérience dans la prise en charge de cette pathologie rare.¹⁰⁷

5) Anatomopathologie de la MVOP

Hémangiomatose capillaire pulmonaire

L'hémangiomatose capillaire pulmonaire (HCP) a été longtemps considérée comme une pathologie différente de la MVOP mais partageant des similitudes cliniques et anatomopathologiques avec cette dernière. Mais plusieurs années d'études approfondies ont montré qu'il s'agit de deux manifestations distinctes de la même pathologie qu'est la MVOP. L'HCP représente l'atteinte capillaire qui est caractéristique de la MVOP. Elle est caractérisée par une prolifération multifocale des capillaires pulmonaires plus particulièrement une prolifération des cellules endothéliales des capillaires. Ces capillaires ont la capacité de former des nodules envahissant l'interstitium et infiltrant par la suite les parois vasculaires et lymphatiques. Cette infiltration peut impliquer à la fois les parois vasculaires, bronchiques et interstitielles (Figure 34 B). La prolifération des capillaires correspond à une angiogenèse secondaire à l'obstruction des veinules pulmonaires.¹⁰⁹

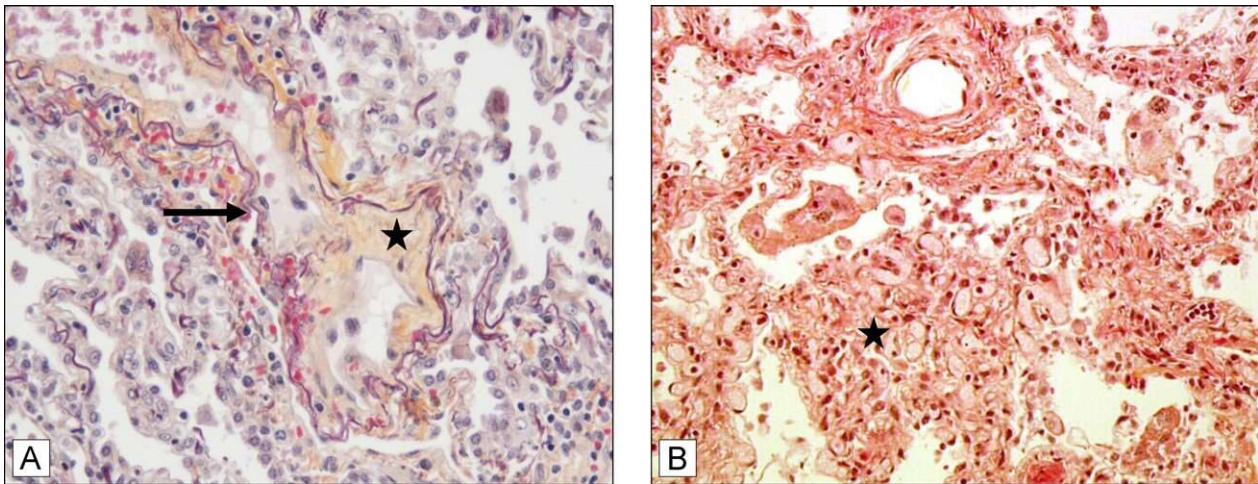


Figure 34 : Lésions histologiques de la maladie veino-occlusive et de l'hémangiomatose capillaire pulmonaire.
 A : veinopathie occlusive mettant en évidence une veine oblitérée (flèche) par une obstruction fibreuse (*) dans une cloison septale. B : hémangiomatose capillaire avec prolifération capillaire dans les septas alvéolaires formant des lésions nodulaires (*).(issue de¹⁰⁹)

Fibrose intimale des veinules

Les lésions postcapillaires caractéristiques de la MVOP sont définies par un remodelage obstructif des petites veines et veinules pulmonaires. Ce remodelage est caractérisé par une obstruction diffuse et fibreuse de l'intima des veines et des veinules pré-septales. Cet épaissement fibreux et occlusif de l'intima aboutit à un rétrécissement ou une obstruction de la lumière veineuse ou veinulaire. Notons que l'atteinte des veinules pré-septales constitue un élément fondamental pour le diagnostic anatomopathologique de la MVOP (Figure 35 b).¹⁰⁵ Dans certains cas, il peut y avoir une muscularisation des veines sépales et pré-septales. Les fibres élastiques composant la paroi veineuse peuvent contenir des dépôts de calcium qui sont semblables à des pigments noirs. Des minuscules granulomes contenant des fibres élastiques dégradées par phagocytose sont souvent identifiés près des veinules dans la MVOP.¹⁰⁵ Par ailleurs, on observe également une tendance à une augmentation du nombre de cellules alvéolaires avec un pourcentage significativement élevé de macrophages chargés d'hémosidérine et un score de Golde plus élevé, conformément à l'observation selon laquelle la PVOD est associée à une hémorragie alvéolaire occulte. Le degré d'hémorragie peut être évalué de manière semi quantitative et qualitative à l'aide du score de Golde. Ce score se fait sur la coloration de Perls et prend en compte le nombre de macrophages intra-alvéolaires chargés d'hémosidérine, et le degré de coloration de ces macrophages par le bleu de Prusse de Perls (Figure 35).¹⁰⁶

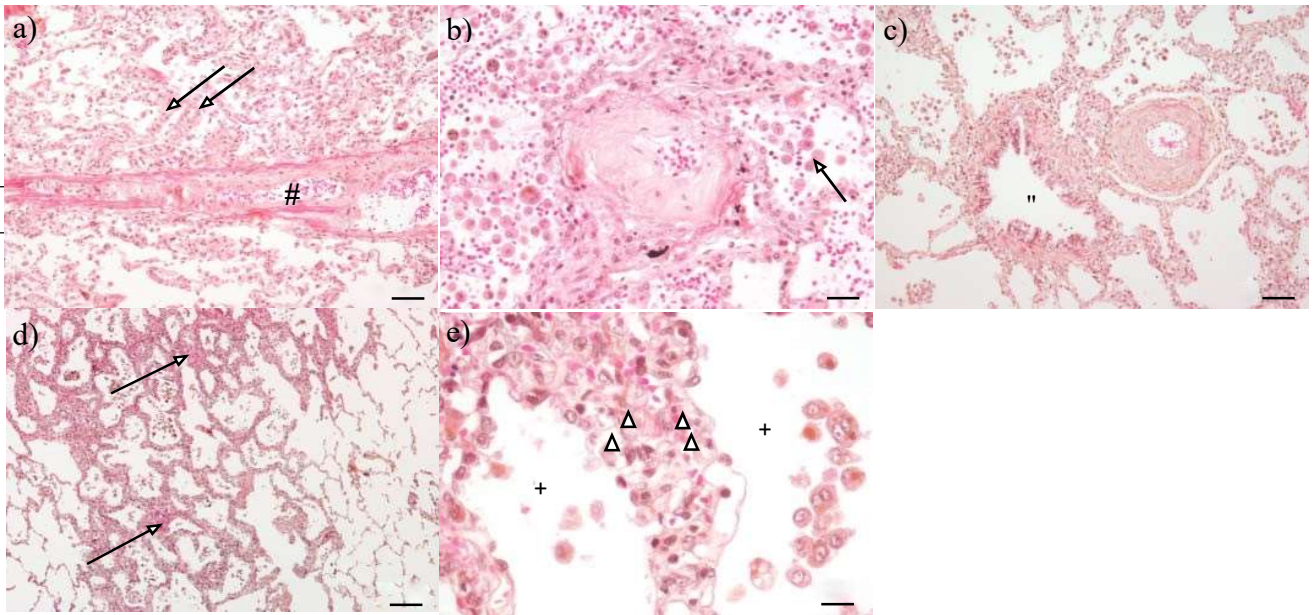


Figure 35 : Lésions vasculaires pulmonaires chez un patient souffrant de MVOP (coloration à l'hématoxyline-éosine-saffron). a) Obstruction fibreuse d'une veine septale (#) et de veinules pré-septales (flèches). b) Veinule pré-septale avec remodelage occlusif. Notez l'hémorragie intra-alvéolaire et les macrophages chargés de siderine (flèche).c) Artère musculaire présentant une fibrose intimale marquée et une bronchiole adjacente ("). d) Épaississement parcellaire des septa alvéolaires en présence de microvaisseaux occlusifs (flèches). e) Septum alvéolaire présentant une prolifération capillaire. Notez la lumière multicouche (pointes de flèche) qui sépare deux alvéoles (+). (issue de ¹⁰⁶)

Lésions artérielles

Bien que la MVO soit caractérisée principalement par un remodelage des veinules pulmonaires et une prolifération des capillaires secondaire à l'obstruction veinulaire, des lésions artérielles ont été identifiées dans la majorité des cas. Cette atteinte artérielle est caractérisée par un remodelage des artères et artérioles pulmonaires mais avec une absence confirmée de lésions plexiformes. Ce remodelage artériel et artériolaire est le résultat d'une fibrose intimale et une hypertrophie médiale.¹⁰⁶(Figure 35)

6) Physiopathologie de la MVOP

La récente découverte des mutations bi-alléliques du gène *EIF2AK4a* permis une mise en lumière de l'étiologie de la MVOP héréditaire. Mais d'autres facteurs de risque peuvent être à l'origine ou contribuent au développement de la MVOP dite sporadique notamment la MVOP associée à la chimiothérapie, l'exposition à des solvants organiques et au tabagisme, et l'association à d'autres pathologies (auto-immunes et inflammatoires).

Mutations du gène *EIF2AK4*

En 2014, selon le réseau français de HTP, la généalogie de 13 familles ayant la MVOP révélait une maladie héréditaire. Après avoir poussé plus loin l'étude généalogique de ces 13 familles, les chercheurs ont découvert qu'une seule génération était touchée par la maladie MVOP avec une fréquence de consanguinité élevée, laquelle était présente chez plus de la moitié des familles (Figure 36). Ces deux observations montrent qu'il s'agit d'une transmission autosomique récessive. Le séquençage complet de l'exon de deux frères et sœurs malades provenant de cinq familles a permis de confirmer que des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4* (facteur d'initiation de la traduction eucaryote 2 α kinase 4) étaient présentes dans les 13 familles de MVOP. Ainsi, la forme héréditaire de la MVOP a été mise en évidence. Plus récemment, des grandes familles d'Espagne avec plusieurs cas de MVOP, ont été décrites portant des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4*. Aussi, des cas pédiatriques de MVOP portant des mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4* ont également été rapportés et le plus jeune patient comportant cette forme de MVOP héréditaire, avait seulement 11 ans.^{105,107}

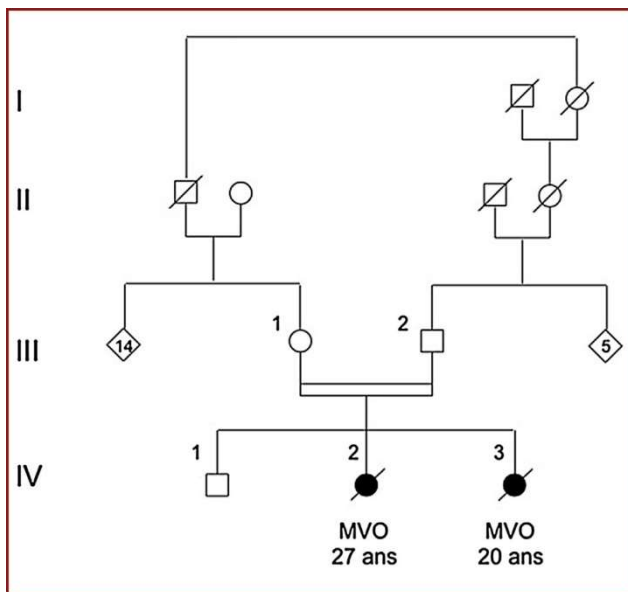


Figure 36 : Arbre généalogique d'une famille atteinte de maladie veino-occlusive (MVO). Du fait du mode de transmission autosomique récessive, seule une génération est atteinte. Une consanguinité (représentée par le double trait horizontal) est fréquemment retrouvée au sein des familles atteintes de MVO (Issue de ¹⁰⁷).

Après la découverte des mutations bi-alléliques du gène *EIF2AK4*, il était possible d'étudier et comprendre le rôle de ce gène au niveau de l'organisme. Cette découverte a permis d'élucider les voies de signalisation impliquées dans la pathogénèse de la MVOP. C'est un gène qui code pour la protéine GCN2 laquelle appartient à une famille de quatre thréonine-sérine kinases : GCN2 (general control non derepressible), PERK (PKR-like endoplasmicreticulum kinase), PKR (protein kinase double stranded RNA-dependant) et HRI (heme-regulated inhibitor) qui phosphorylent la sous unité alpha du facteur 2

d'initiation de la traduction des eucaryotes ($eif2\alpha$) en réponse à différents stress cellulaires. Ces quatre protéines kinases agissent en contrôlant la traduction générale en réponse à divers stress cellulaires notamment une carence en acides aminés (aa), stress du RE, stress de l'hème et stress des protéines non repliées. La phosphorylation d' $eif2\alpha$ permet de protéger la cellule en réduisant la traduction générale et en induisant la traduction de quelques gènes spécifiques qui vont agir pour rétablir l'homéostasie cellulaire soit par la biosynthèse d'aa, soit par l'autophagie, ou par la survie ou l'apoptose. Cette réponse cellulaire aux différents stress est connue sous le terme de « réponse intégrée au stress, RIS ou *ISR* », un ensemble de mécanismes développés par la cellule pour se protéger contre les stress ou les changements environnementaux (Figure 38). En ce qui concerne la kinase GCN2, elle est connue être principalement impliquée dans la réponse au stress induite par une carence en aa, mais aussi dans la résistance à l'hypoxie ou à l'inflammation ou l'infection virale. Ainsi, la diminution de l'expression et de l'activité de GCN2 secondaire aux mutations du gène *EIF2AK4* favorise la vulnérabilité au stress oxydatif et à l'inflammation.¹⁰⁵

▪ La protéine GCN2

La protéine GCN2 est une enzyme essentielle à l'organisme. Elle a une structure unique qui est composée de cinq domaines repliés et conservés. Ses différents domaines peuvent interagir entre eux, ce qui rend son mécanisme d'activation plus complexe. GCN2 est activée par autophosphorylation induite par une accumulation d'ARN de transfert (ARNt) non chargé d'acide aminé ou dé-acétylé et/ou une augmentation des protéines P de la tige du ribosome appelée « P-stalk ». L'activation de GCN2 est induite principalement par une carence en acide aminé mais d'autres facteurs peuvent être impliqués.¹¹⁰

▪ Structure de GCN2

GCN2 (General non-derepressible 2) est une protéine formée de 1649 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 190 kDa (380 kDa en tant que dimère). Elle est formée de cinq domaines¹¹⁰ (Figure 37) :

- Domaine **RWD (RING-finger proteins, WD repeat-containing proteins)**: site de régulation.
- Domaine Pseudokinase (**PKD**) ;
- Domaine kinase catalytiquement actif (**KD**) ;
- Domaine Histidyl-tRNA-Synthetase-like (**HisRS-like**), se lie à l'ARNt non chargé ;
- C-terminal (**CTD**), contribue à la liaison avec l'ARNt.

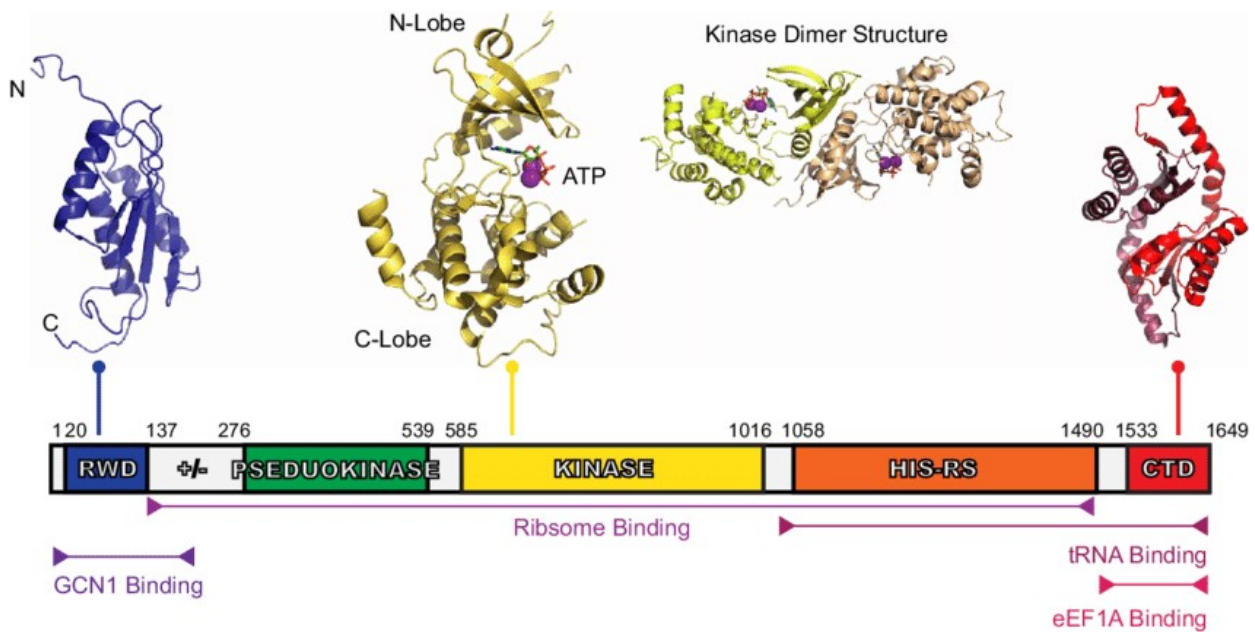


Figure 37. Domaine de la serine thréonine kinase GCN2 chez les mammifères

Le domaine RWD et le domaine pseudo kinase sont reliés par une région de " lieu chargé " (" +/- ") un tronçon de résidus d'ARG, de lysine, de glutamate et d'aspartate. RWD : site de liaison de GCN1/GCN20. Le domaine kinase est présenté à la fois comme un monomère et un dimère avec son ATP et son Mg²⁺ associés. Le domaine HisRS-like est essentiel à l'activité de GCN2 in vivo, il interagit directement avec l'ARNt. Le CTD, représenté ici en structure dimérique, est constitutivement dimérique, et il a une interaction avec les ribosomes. Les CTD de levure co-migrent avec les ribosomes sur un gradient de saccharose. Les domaines RWD et His-RS sont impliqués dans la réponse au stress cellulaire. (Issue de¹¹⁰)

La structure tridimensionnelle complète de GCN2 n'a pas encore été déterminée mais certains domaines isolés ont pu être modélisés. L'organisation des domaines de GCN2 permet une bonne compréhension de son mécanisme d'activation bien que ses domaines peuvent interagir entre eux et rendre mode d'action plus complexe. Le domaine RWD, situé en N-terminal contient un site essentiel permettant à la protéine GCN2 de se lier au complexe GCN1/ GCN20.¹¹⁰ La protéine GCN2 est un dimère constitutif et l'activation lors de la liaison avec l'ARNt nécessiterait un changement de conformation passant de l'état auto-inhibé à l'état activé. KD et HisRS interagissent dans la médiation de la dimérisation. Et en absence d'activation ou de stress cellulaire, GCN2 forme un homodimère inactif avec des multiples interactions auto inhibitrices ; PKD interagit avec KD pour inhiber l'activité catalytique de ce dernier.¹¹¹

- Rôles physiologiques de GCN2

La protéine GCN2 est une protéine ubiquitaire et conservée de la levure à l'homme. C'est une protéine codée par le gène *EIF2AK4*. GCN2 est activée principalement par une carence en acides aminés au niveau cellulaire. GCN2 semble être aussi impliquée dans d'autres fonctions physiologiques notamment senseur d'infection virale, ou réponse à l'exposition aux rayons ultra-violets.¹¹²

L'activation de GCN2 permet une réponse au stress cellulaire. En se liant aux ARNt non chargés dont les niveaux sont augmentés par une carence nutritionnelle, GCN2 déclenche une réponse au stress causé par un manque d'aa (RIS). Son activation peut être régulée aussi par l'activation des ribosomes à la place des ARNt dé-acétylés. La RIS se fait via une phosphorylation de la sérine 51 de eIF α 2 (phosphorylation dé-activatrice) qui entraîne une réduction globale de la traduction d'un petit nombre de gènes intégrés à la RIS. (Figure 38) Cette dernière permet non seulement d'économiser de l'énergie mais aussi de réguler les voies de signalisation qui privilégient la survie cellulaire.¹¹³

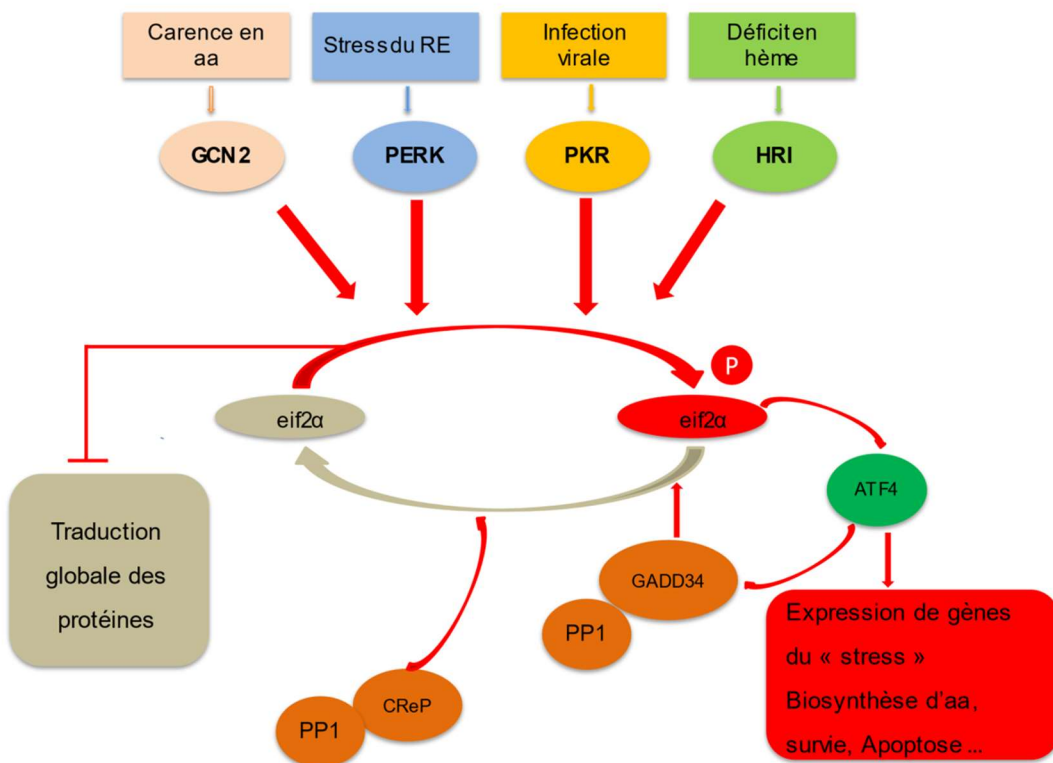


Figure 38 : Mécanismes de la RIS (réponse intégrée au stress). Déclenchée par l'activation d'un des quatre kinases à la suite de différents stress métaboliques. La kinase activée phosphoryle eif2 α qui va induire une inhibition de la traduction générale dans la cellule et favoriser la traduction des ARN messagers spécifiques à la RIS dont l'ATF4. L'ATF4, un effecteur principal de la RIS, va induire l'expression des gènes impliqués dans la réponse adaptative cellulaire. A la fin de la RIS, un mécanisme de rétrocontrôle négatif est déclenché, il est régulé par deux complexes

GADD34-PP1 et CReP-PP1 qui déphosphorylent eif2 α permettant le rétablissement de la traduction globale. Les flèches grises : état basal et les flèches rouges : mécanismes activés sous l'effet de stress.

Association aux chimiothérapies

Une association temporelle entre l'administration d'agents de chimiothérapie et le développement de MVOP a été signalée dans plusieurs rapports de cas. La MVOP représente une complication évidente mais peu fréquente de chimiothérapie à forte dose particulièrement dans le cas des traitements myéloablatifs dans le cadre d'une transplantation de cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, le réseau français de l'HTP a rapporté des cas de MVOP induite par l'administration d'agents alkylants. Ces derniers représentent la classe de chimiothérapie, associée au développement de MVOP, la plus prédominante. Cependant, plusieurs patients ont reçu un traitement comprenant plusieurs médicaments, ce qui a rendu difficile l'identification des chimiothérapies spécifiquement associées au développement de MVOP. La mitomycine C qui est une option dans le traitement du cancer anal, est aussi connue en tant qu'agent induisant la MVOP avec un taux d'incidence de 3,9 pour 1000 patients par an ; un taux nettement plus élevé par rapport à celui de la MVOP idiopathique qui est de 0,5 par millions de personnes par an. Aussi, il a été rapporté que des chimiothérapies, utilisées dans la thérapie des cancers pédiatriques et d'hémopathies malignes, induisent la MVOP. La radiothérapie est aussi considérée comme étant un facteur de risque de la MVOP. Enfin la découverte des agents alkylants, en tant que facteurs de risque de la MVOP, a permis d'une part d'étudier les effets de ces chimiothérapies au niveau vasculaire pulmonaire et d'autre part de développer des modèles animaux par exemple le modèle de rat exposé à la mitomycine C ou au cyclophosphamide.^{105,114} (Figure 39)

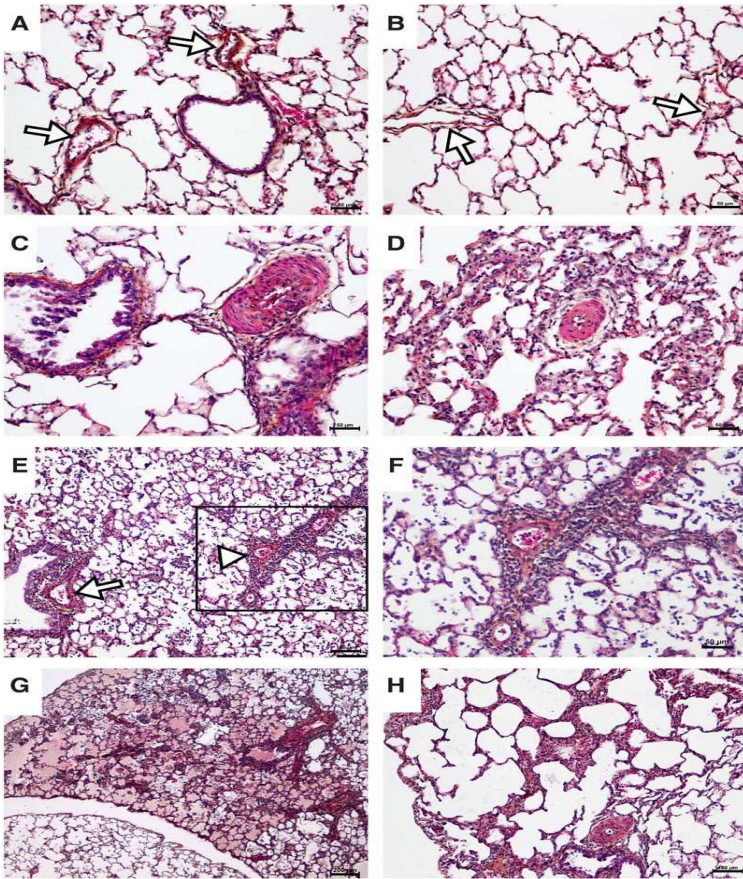


Figure39. La MMC induit un remodelage vasculaire pulmonaire chez le rat, avec une implication veineuse et capillaire pulmonaire significative qui est fortement suggestive d'une PVOD. A à B, poumons témoins. C à H, poumons exposés à la MMC. A, artères pulmonaires témoins (flèches). B, microvaisseaux distaux des témoins (flèches, les artérioles et les veinules sont indiscernables). C, artère pulmonaire avec hypertrophie/hyperplasie médiane. D, Néomuscularisation de petits microvaisseaux pulmonaires distaux, normalement non musclés. E, vascularisation de l'artère (flèche) et de la veine (pointe de flèche) pulmonaires. F et G, foyers d'œdème pulmonaire et de capillarite. H, Foyers d'épaississement de la paroi alvéolaire évoquant une hémangiomatose capillaire pulmonaire.

(Issue de [14])

Exposition professionnelle aux solvants organiques

L'exposition professionnelle représente également un facteur de risque de développer la MVOP. Dans une étude cas-témoins réalisée par Montani et al entre 2008 à 2010, l'association de la MVOP à l'exposition professionnelle aux solvants organiques (Trichloroéthylène (TCE), agent dégraissant, silice, kérozène, peinture, ...) a été mise en évidence. Et dans ce panel des solvants organiques associés, le trichloréthylène (ou TCE) constitue le principal agent impliqué dans cette association. Dans cette étude, 42% des patients atteints de MVOP présentent des antécédents d'exposition significative au TCE. Ce solvant agit en altérant l'endothélium et la fonction de la eNOS ou NOS3 engendrant l'altération de la prolifération par la voie de VEGF (vascular endothelium growth factor ou facteur de croissance endothélial vasculaire). La eNOS,

généralant le NO, joue un rôle important dans la prolifération des CE, et ce rôle est considéré comme étant essentiel dans la croissance et le développement de vaisseau sanguin et la vasodilatation. Le TCE agit donc en altérant la balance eNOS et l'ion peroxyde tout en favorisant la production des ions peroxyde au détriment de la eNOS. Ainsi, le TCE induit une DE. Par ailleurs, le TCE inhibe l'absorption et le métabolisme de la 5-HT au niveau de la circulation pulmonaire, particulièrement au niveau de CE et des capillaires. Ainsi, la diminution de la clearance de la 5-HT, relative à l'exposition au TCE, engendre une accumulation de cette substance vasoconstrictrice dans la circulation pulmonaire et aboutit à une vasoconstriction, un remodelage vasculaire et une thrombose. Enfin, les patients MVOP associés à l'exposition aux solvants organiques sont caractérisés par un âge plus avancé et une absence de mutations du gène *EIF2AK4* alors que ceux n'ayant pas d'antécédents d'exposition sont généralement plus jeunes (Figure 40 et 41).^{105,115,116}

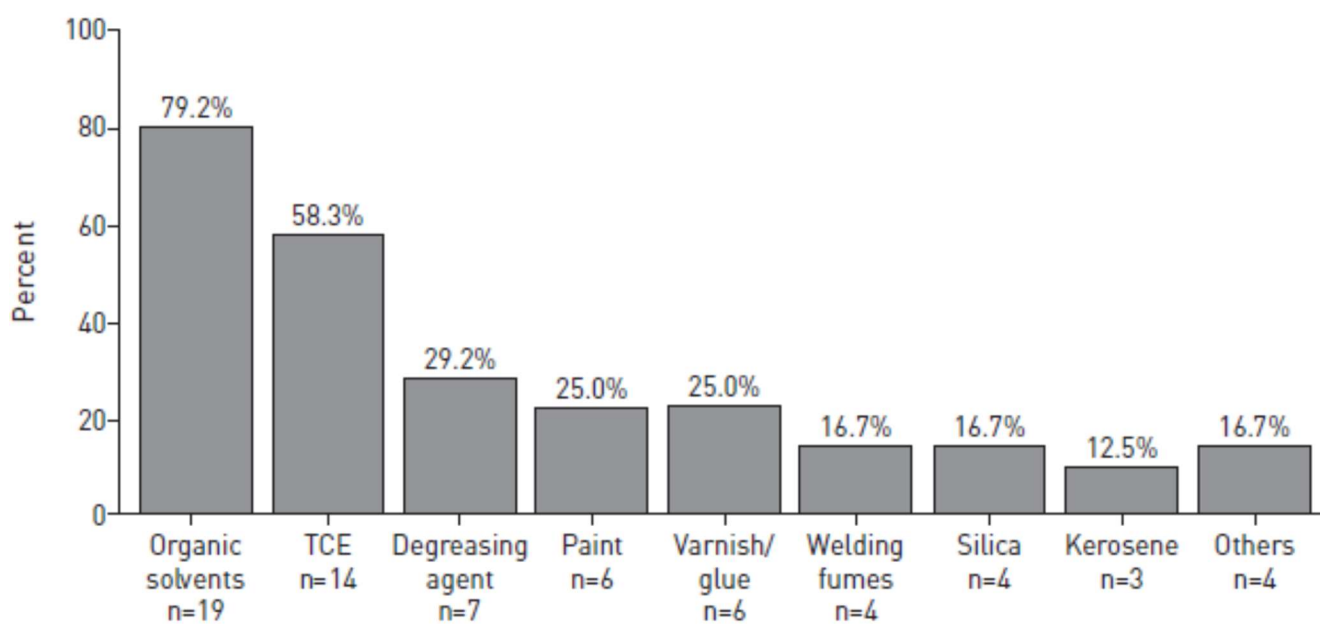


Figure 40. Principales expositions professionnelles identifiées par une évaluation consensuelle d'experts en aveugle chez des patients atteints de la MVOP (n=24). TCE : trichloroéthylène (issue de ¹¹⁵).

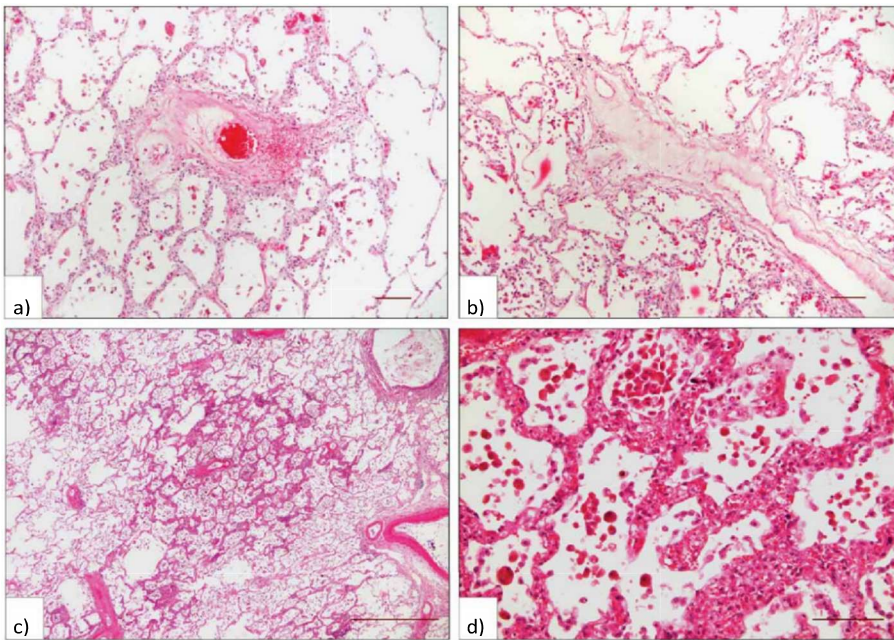


Figure 41. Histologie des poumons d'un patient atteint de MVOP avec des antécédents positifs d'exposition au TCE sans mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4*. a, b) Les veines septales et les veinules pré-septales sont oblitérées par une fibrose lâche riche en collagène ; le parenchyme est dépourvu de remodelage interstitiel important. c) Des foyers d'HCP sont présents sur la plupart des échantillons, fréquemment en association avec des vaisseaux et des microvaisseaux pulmonaires remodelés (centre). d) L'épaississement des parois alvéolaires est dû à une multiplication des capillaires ; il y a abondance de macrophages pigmentés (sidérophages) dans l'alvéole (issue de ¹¹⁵).

Exposition au tabac

La MVOP est caractérisée par un fort ratio homme/femme et une importante exposition au tabac. L'exposition cumulée au tabac est plus élevée dans la MVOP que dans l'HTAP idiopathique, un résultat indépendant du sexe. Dans l'étude démontrant le rôle des solvants organiques dans le développement de la MVOP, il a été signalé que tous les patients, présentant une exposition significative au TCE, avaient une exposition simultanée au tabac (exposition totale moyenne de 38 paquets-années). Ce qui suggérait un effet potentialisateur aussi bien des expositions au tabac qu'aux solvants dans le développement de la PVOD. L'exposition au tabac est connue pouvant entraîner une DE et elle peut directement induire un remodelage vasculaire pulmonaire dans les modèles animaux de l'HTP. Cependant, on ne sait pas encore la raison pour laquelle l'exposition au tabac semble être plus fortement associée à la PVOD qu'à l'HTAP. ^{105,117}

Auto-immunité et conditions inflammatoires

Une implication veineuse significative est de plus en plus connue et relativement courante dans l'HTAP associée à une maladie du tissu conjonctif, en particulier la sclérose systémique ; cette dernière est une maladie auto-immune qui se complique fréquemment d'une HTAP ou d'une MVOP. La MVOP est

également associée à d'autres troubles inflammatoires, tels que la sarcoïdose, la granulomatose à cellules de Langherans et la thyroïdite de Hashimoto. Mais ces associations sont limitées à des rapports de cas isolés ou à de petites séries. En effet, la véritable prévalence de la MVOP associée à une maladie du tissu conjonctif est inconnue car il n'existe pas de séries histologiques suffisamment importantes pour une évaluation systématique. Cependant, une étude a suggéré qu'environ deux tiers des patients présentant une HTP précapillaire due à une sclérose systémique peuvent présenter des signes radiologiques de MVOP sur la tomодensitométrie à haute résolution (HRCT) du thorax. Ceci est cohérent avec l'estimation de la proportion d'atteinte veineuse significative dans les séries d'HTAP associée à une maladie du tissu conjonctif.¹⁰⁵

Modèles animaux de la MVOP

La découverte des agents alkylants, en tant que facteurs de risque de développement de la MVOP, a permis le développement des modèles expérimentaux animaux de la cette pathologie. C'est le cas chez les rats qui, après une injection intrapéritonéale de mitomycine C, développent la MVOP. Lecathétérisme du cœur droit a permis d'identifier, chez ces animaux, la présence d'HTP avec un remodelage préférentiel des petites veines et veinules et une prolifération accrue des CE des capillaires. Des modèles de rats, souris et lapins, exposés à la cyclophosphamide, ont également développé l'HTP.¹⁰⁵ Ces modèles présentent une histologie caractérisée par un remodelage vasculaire pulmonaire, des lésions capillaires et veineux, une muscularisation des petits vaisseaux distaux et des focus d'œdème pulmonaire et un rétrécissement de la paroi des alvéolaires (HCP).¹¹⁴

6. L'HTAP induite par des médicaments

L'HTAP induite par les médicaments ou HTAP d'origine médicamenteuse est une forme d'HTP définie par une perte sévère de petits vaisseaux et une obstruction vasculaire entraînant une insuffisance cardiaque droite progressive et le décès du patient. Bien que cette forme d'HTAP présente une manifestation clinique, une pathologie et un profil hémodynamique similaires à ceux des autres formes d'HTAP, son évolution peut être imprévisible et dépend de l'arrêt du traitement médicamenteux dans une certaine mesure. Lors du 6^e symposium mondial sur l'HTP (SMHP) en 2018, les experts ont émis un consensus permettant de caractériser l'HTAP associée aux médicaments et aux toxines en deux sous-groupes.⁴² Le sous-groupe 1 représente l'HTAP avec une « association certaine » avec un médicament documenté par des bases de données des épidémies, des études épidémiologiques cas-témoins ou des grandes séries multicentriques ; ce sont les anorexigènes, l'huile de colza toxique, le benfluorex, la méthamphétamine et le dasatinib. Le

sous-groupe 2 concerne l'HTAP avec « une association possible » qui suggère les séries de cas multiples ou des cas liés aux médicaments ayant des mécanismes d'action similaires ; ce sont les amphétamines, la cocaïne, l'interféron-alpha, l'interféron-beta, la phénylpropanolamine, les agents alkylants, le bosutinib, les agents antiviraux du virus de l'hépatite C, le leflunomide, l'induribine, le L-thryptophane et le saint John'wort (Tableau 6). Cette caractérisation constitue un outil d'aide permettant d'identifier les médicaments nécessitant une surveillance spécifique.^{42,76}

Updated classification of drugs and toxins associated with PAH	
Definite	Possible
Aminorex	Cocaine
Fenfluramine	Phenylpropanolamine
Dexfenfluramine	L-tryptophan
Benfluorex	St John's wort
Méthamphétamines	Amphétamines
Dasatinib	Interferon- α and - β
Toxicrapeseedoil	Alkylating agents
	Bosutinib
	Direct-acting antiviral agents against the hepatitis C virus
	Leflunomide
	Indirubin (Herbes chinoises Qing-Dai)

Tableau 7: Mise à jour de la classification de l'HTAP induite par les médicaments et toxiques. (Issue de ⁴²)

Des études, réalisées par Zamanian et al, ont démontré une série de 90 cas associés à la métamphétamine. Ces cas représentaient moins de sexe féminin, présentaient des profils hémodynamiques anormaux au moment du diagnostic et une présentation clinique plus grave celle de l'HTAP. Ces données ont confirmé l'association entre le traitement métamphétamine et de l'HTAP.^{42,118} Il est à noter que des lésions caractéristiques de l'HTAP ont été identifiées chez ces patients notamment des lésions plexiformes angiomatoïdes. Quant au dasatinib, un inhibiteur des tyrosines kinases de seconde génération, des rapports ont montré l'estimation la plus basse d'HTAP incidente survenant chez des patients exposés à ce traitement était de 0,45%. Le Qing-Dai, un médicament chinois à base de plantes non approuvées et dont le principe actif est l'indirubin, est associé à l'HTAP selon des cas rapportés par le registre japonais de l'HTP ; ce traitement peut induire l'apoptose des CE pulmonaires in vitro.⁴² Le léflunomide, un agent antirhumatismal modificateur de la maladie, un immunosuppresseur, a été associé à plusieurs cas d'HTAP.⁴² D'autres agents du sous-groupe « association possible » comprennent l'interféron (utilisé dans le traitement des maladies

telles que l'hépatite B et la sclérose en plaques), la cocaïne ainsi que le St.John's Wort, le complément alimentaire à base de plantes très répandu.⁸⁴

1) HTAP induite par les amphétamines

L'amphétamine (AMPH) et son dérivé la méthamphétamine (METH) sont des stimulants synthétiques du SNC, qui agissent en accélérant l'activité de celui-ci. Leur mécanisme d'action est d'augmenter la concentration des catécholamines telles que la dopamine, la norépinéphrine, et favoriser la libération de neurotransmetteur, tel que la sérotonine, dans les SNC et périphérique. La METH est un médicament qui a été développé à l'origine pour le traitement des troubles neuropsychiatriques, mais elle crée une forte dépendance ou addiction (comme la cocaïne). Diverses études ont montré leurs effets néfastes sur la santé mentale et la neurotoxicité évalués par la dégénérescence des terminaux dopaminergiques et sérotoninergiques et l'activation des cellules astrogliales et microgliales dans le cerveau.^{83,84} Cependant l'AMPH et les anorexigènes sont des facteurs de risque connus d'HTAP. Une étude réalisée par le groupe de Ramon et al., a montré une association « certaine » entre la consommation de METH et l'HTAP. Le mécanisme reliant l'AMPH et les anorexigènes au développement de l'HTAP a été attribué à leur similitude pharmacologique avec la 5-HT. Les consommateurs d'AMPH/METH présentent un risque trois fois plus élevé de développer une HTAP, mais les mécanismes causant la susceptibilité individuelle restent peu clairs et les interactions environnementales éventuelles et / ou les facteurs génétiques probables n'ont pas été étudiées. En comparaison avec les patients HTAPi, les patients HTAP induite par la consommation de METH présentent un mauvais statut fonctionnel caractérisé par un dysfonctionnement du ventricule droit, des anomalies hémodynamiques sévères, une diminution de la qualité de vie et une tolérance à l'exercice plus faible. Malgré une prise en charge effective, la survie de ces patients est significativement plus faible que celle des patients HTAPi. Et des études génétiques suggèrent que des mutations perte de fonction des gènes codant des protéines impliquées dans la désintoxication des drogues peuvent augmenter la, susceptibilité de la METH aux lésions vasculaires (vasculopathie occlusive). Par ailleurs, il est bien connu que l'hypoxie est un puissant stimulus de la vasoconstriction pulmonaire et peut conduire au développement de l'HTAP. Or l'hypoxie agit en synergie avec la sérotonine pour aggraver les pathologies vasculaires pulmonaires. L'hypoxie peut également supprimer la réparation de l'ADN aboutissant à une instabilité génomique et des taux accrus de mutagène. L'AMPH seule ne cause pas de dommages de l'ADN dans les CE de l'AP mais amplifie considérablement les dommages de l'ADN dans les CE artérielles pulmonaires hypoxiques. Ainsi, l'AMPH/METH peut induire des lésions de l'ADN associées aux maladies vasculaires en subvertissant les réponses adaptatives au stress oxydatif.^{83,84,119}

2) HTAP induite par les inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI)

Les tyrosines kinases (TKs) sont des enzymes qui phosphorylent des résidus de tyrosine de certaines protéines provoquant l'activation ou l'inhibition de diverses fonctions cellulaires. Les facteurs de croissance, dont le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), activent leurs principales voies de transduction par l'intermédiaire des récepteurs tyrosine kinase transmembranaires. Le PDGF est exprimé à la fois au niveau des CEs et des CMLs-AP.¹²⁰ Les TKI sont utilisés dans le traitement du cancer. Dans le cas de leucémie myéloïde chronique (LMC) ; et les TKI disponibles sont l'imatinib, le dasatinib, le nilotinib, le bosutinib et le ponatinib. De plus, les TKI ont d'autres cibles dont la famille des Src, des récepteurs de PDGF et c-KIT;¹²¹ Cependant l'HTAP a été signalée comme une complication des TKI et principalement du dasatinib. Ce dernier est qualifié de cause ou « association possible » avec l'HTAP selon le dernier SMHP. Cependant, en plus de l'association bien décrite entre le dasatinib et l'HTAP, plusieurs autres TKI, bien que rarement, ont également été récemment signalés comme pouvant provoquer l'HTAP, notamment le bosutinib, le ponatinib et le lapatinib. Ainsi, l'HTAP est une complication rare mais importante de plusieurs TKI. Mais récemment un second facteur de risque est probablement nécessaire pour provoquer l'HTAP.¹²² Le dasatinib a été décrit provoquant une toxicité directe des cellules pulmonaires par la production de ROS mitochondrial et induisant une dysfonction des CE artérielles pulmonaires. Le dasatinib induit des épanchements pleuraux exsudatifs chez 25% des patients, liés probablement à la perméabilité endothéliale médiée par les ROS.¹²² Après l'arrêt du traitement TKI, les symptômes et les anomalies hémodynamiques disparaissent, mais l'HTAP persiste chez plus d'un tiers des patients et peut réapparaître lorsque d'autres TKI sont utilisés. Ainsi, dans ces circonstances, un traitement spécifique de l'HTAP est recommandé pour ces patients ayant une HTAP persistante après l'arrêt de TKI.¹²² Les TKI sont des molécules souvent non-sélectives d'un point de vue pharmacologique, qui peuvent affecter plusieurs voies cellulaires, y compris celle impliquant les inhibiteurs du facteur de croissance épidermique (EGF) ou celle des inhibiteurs du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).¹²³ Le dasatinib, en plus de son effet inhibiteur sur le BCR-ABL, il cible également les kinases de la famille Src qui sont impliquées dans la prolifération cellulaire et la régulation du tonus des CMLs-AP par l'intermédiaire du canal KCNK3. L'inhibition de Src conduit donc à la dépolarisation des CMLs-AP aboutissant à une vasoconstriction et une augmentation de la PAP. Ainsi, l'amélioration fréquente ou la réversibilité de l'HTAP, après l'arrêt du dasatinib, conduit à l'hypothèse selon laquelle les voies de signalisation Src seraient impliquées dans la pathogénèse de l'HTAP.¹²²(figure42)

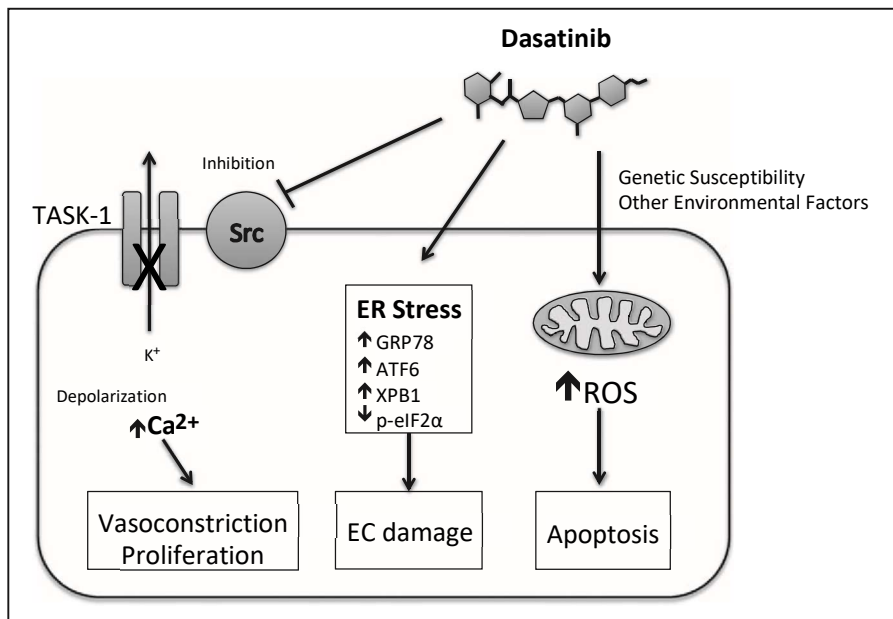


Figure 42. Mécanismes potentiels de la dysfonction endothéliale et de l'HTAP induits par le dasatinib. ER, réticulum endoplasmique ; EC, cellule endothéliale ; GRP78, protéine 78 régulée par le glucose ; ATF6, facteur 6 d'activation de la transcription ; XBP1, protéine 1 de liaison à la x-box ; p-eIF2 α , facteur 2a d'initiation eucaryote phosphorylé (issue de¹²²).

3) HTAP induites par d'autres médicaments

Les interférons (IFN) (alpha et beta) et médicaments connexes, les thérapies antivirales, les anticorps monoclonaux et les médicaments régulateurs immunitaires, les agents chimio-thérapeutiques et des médicaments divers sont également associés à l'HTAP.¹²⁴

Les IFN sont des cytokines libérées par de cellules immunomodulatrices en réponse aux infections et cancers. Ces molécules ont été développées comme des thérapies contre une variété de processus immunologiques et malignes notamment la sclérose en plaques, des hémopathies malignes et l'infection chronique par le virus de l'hépatite C. Il y a les IFN α 2a (Pegasys) et $-\beta$ (Pegintron). Cependant, au cours de ces dernières années, des rapports de cas ont établi un lien de causalité entre l'utilisation des IFN et le développement de l'HTAP. Selon la société européenne de cardiologie et la société respiratoire européenne de l'HTP, les IFN sont reconnus comme étant des facteurs de risque « possible » de l'HTAP.¹²⁴ Des études sur le mouton ont montré qu'IFN α peut stimuler la cascade de thromboxane, ce qui provoque l'HTAP transitoire. Bien que dans la plupart des cas, après l'arrêt du traitement IFN, les effets secondaires disparaissent, dans certains cas l'HTAP n'est pas réversible.¹²⁵

Les thérapies antivirales sont représentées par la sofosbuvir qui a été associé à des cas d'HTAP. Cependant ces patients présentent d'autres facteurs de risque provoquant l'HTAP.¹²³

Les anticorps monoclonaux et les traitements régulateurs immunitaires constituent aussi un facteur de risque de l'HTAP. Des rapports de cas ont signalé une association de certains anticorps monoclonaux et thérapies immunomodulatrices à l'HTAP. Il n'y a pas beaucoup d'études qui documentent une prévalence accrue de l'HTAP compliquant ces agents. Cependant le trastuzumademtansine, le rituximad, le bévacizumab, la cyclosporine et le léflunomide ont été impliqués dans des rapports de cas.¹²³

4) Le léflunomide

Le léflunomide (LEF) est un traitement médicamenteux identifié comme un facteur de risque « possible » de l'HTAP.⁴²Le LEF est un antirhumatismal synthétique modificateur de la maladie (DMARD) ; c'est un produit qui est utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde (PR) depuis plus de 20 ans. En clinique, il peut être prescrit en première intention dans le cas où le méthotrexate (MTX) est contre-indiqué ou comme traitement d'appoint si la maladie reste active.¹²⁶Un travail de l'unité UMRS 999 a montré une association de ce traitement à l'HTAP. Dans cette étude, il a été identifié, via le registre français de l'HTP et le programme de pharmacovigilance VIGIAPATH, que vingt et huit (28) patients, dont la grande majorité étaient traités par le LEF pour une PR, présentaient de l'HTP. Ce qui a permis de suspecter ce traitement comme cause de l'HTP. Cependant, un autre facteur de risque d'HTP a été identifié chez 82,1 % de cette population étudiée et seuls 17,9% étaient liés directement au traitement LEF.¹²⁶Ces seules données suggèrent un lien de causalité soit à faible risque soit fortuit. Toutefois, bien qu'il y ait un autre facteur de risque d'HTP chez la majorité des patients, mais l'hypothèse que le LEF induit une toxicité potentielle chez des patients présentant une maladie préexistante, ne pouvait pas être exclu. De plus, l'analyse du signal de disproportionnalité de la pharmacovigilance pour le LEF de vigibase était significative, suggérant une surreprésentation du LEF chez les patients atteints d'HTP.¹²⁶ Un autre point qui est venu appuyer ce lien de causalité est que l'arrêt du traitement LEF a induit une amélioration hémodynamique chez un sous-groupe de ces patients quoiqu'elle ne soit significative dans l'ensemble. De plus, les données issues de l'étude in vitro ont montré une toxicité directe du LEF au niveau CE des APs.¹²⁶Le LEF est aussi prescrit dans le traitement de l'arthrite psoriasique et d'autres maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique.¹²⁷

▪ Définition, structure et métabolisme

Le LEF est un médicament classé dans les DMARD et doté de propriétés immunomodulatrices. Le LEF est une prodrogue qui est rapidement métabolisée en un principe actif, le tériflunomide (TER) ou A77 1726 dans le tractus gastro-intestinal et dans le plasma. Son métabolite actif est à cycle isoxazole ouvert, le malononitrilamide, A77 1726 (2- cyano3-hydroxy-N-(4-trifluorométhylphényl) buténamide) (Figure 43)

¹²⁸. Des études ont montré que la conversion de LEF en TER est médiée par des enzymes cytochrome P450 (CYP) mais aussi par des réactions non enzymatiques qui ne sont pas encore élucidées.¹²⁹

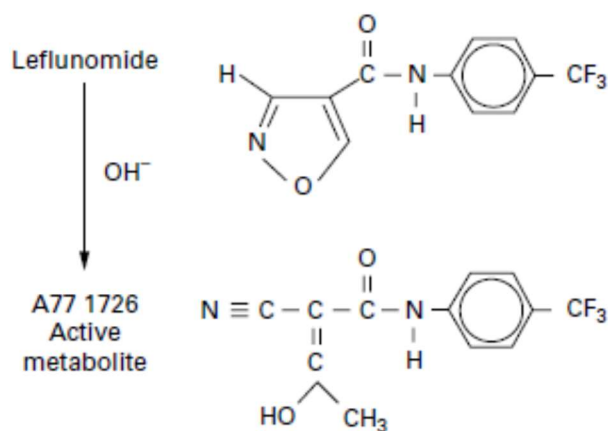


Figure 43. Structure chimique du LEF et son métabolite actif A77 1726(issue de¹²⁸)

- Mécanisme d'action

Le TER est un agent immunomodulateur et antiprolifératif qui a comme mécanisme d'action principal l'inhibition non compétitive d'une enzyme mitochondriale, le dihydroorotate déshydrogénase (DHODH) impliquée dans la synthèse de la pyrimidine (Pyr), composé nécessaire à l'élaboration des bases azotées et des acides nucléiques. TER inhibe d'une manière réversible le DHODH à des doses faibles et thérapeutiques limitant ainsi la vitesse de synthèse de novo des Pyr. Contrairement aux autres cellules, les lymphocytes (Lph) multiplient par huit (8) leurs réserves en Pyr au cours de la prolifération. Ainsi, l'inhibition de la DHODH par le TER permet d'empêcher les Lph d'accumuler suffisamment de Pyr pour permettre la synthèse d'ADN. TER régule ainsi la prolifération des Lph.

- Autres effets cellulaires et moléculaires

Des études ont montré que ce traitement inhibe la prostaglandine E2 par inhibition directe de la cyclooxygénase (COX). Les effets inhibiteurs des COX induits par le TER démontrent son effet anti-inflammatoire.¹³⁰ A des doses élevées, le TER inhibe les TK responsables de la signalisation des cellules T et des cellules B dans la phase Go/G1 du cycle cellulaire. Notons que les effets immuno-régulateurs de TER se produisent à des doses qui inhibent la DHODH et non les TK.

LEF induit des effets impliqués dans le stress du RE des cellules hépatiques HepG2, HepaRG et des hépatocytes humains en culture primaire. Il induit une cytotoxicité mesurée par le niveau d'ATP dans la cellule.¹³¹ Des études ont démontré que le LEF et son métabolite induisent une dysfonction mitochondriale

dans les cellules HepG2 en inhibant la phosphorylation oxydative mitochondriale en ciblant le complexe V (F1FO synthase). Notons que la dysfonction mitochondriale est révélatrice d'une cytotoxicité.¹²⁹ Des études ont montré des effets inhibiteurs du cycle cellulaire du LEF, via la voie PDK1 /Akt, dans les mastocytes humains ; et il induit l'apoptose de celles-ci.¹³² Des effets inhibiteurs d'angiogenèse relative à l'activité endothéliale ont été démontrés aussi pour cette drogue.¹³³ Par ailleurs, LEF aurait aussi des effets vasculoprotecteurs en inhibant les récepteurs TK de divers facteurs de croissance notamment PDGF, EGF et VEGF.¹³⁴ Des études, réalisées au niveau de l'artère basilaire située au niveau du cerveau, ont montré que cette drogue induit des effets réducteurs de vasospasme secondaire à l'hémorragie subarachnoïdienne.¹³⁵ LEF induit dans ce vaisseau une inhibition de la prolifération cellulaire en bloquant la synthèse et l'activation de TGF- β 1 entraînant une diminution du collagène de type I, II et III, et aussi de la fibronectine et protéoglycanes.

Des effets inhibiteurs de la réponse médiée par TNF- α dans les cellules T ont aussi été démontrés pour cette drogue.¹³⁵ Le TER inhibe également le facteur nucléaire Kb (NF-kB), un facteur de transcription activé par les cytokines pro-inflammatoires.¹³⁶ De plus, des études ont montré que LEF inhibe la migration Trans endothéliale des cellules sanguines notamment les mononucléaires.¹³⁶

Dans une étude, Rahman et al ont mis en évidence des effets inhibiteurs de LEF dans les canaux SOCE (Store-operated Ca²⁺ entry). La voie SOCE est connue étant une voie de régénération du Ca²⁺ cytosolique, une voie de signalisation qui est régulé par divers mécanismes biologiques.¹³⁷

Objectifs de l'étude

L'objectif principal de mon étude est d'identifier et de comprendre les conditions et les facteurs favorisant le développement de l'HTP, et plus particulièrement les mécanismes impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. Plus spécifiquement, mon premier projet était de caractériser la réactivité vasculaire des APs issues des rats dont le gène *Eif2ak4*, codant pour la protéine kinase GCN2, a été invalidé. Cette étude a été réalisée en collaboration avec l'équipe UMRS 1166. L'hypothèse de travail était que chez ces rats transgéniques, la voie du NO, une voie clé dans le tonus vasculaire pulmonaire, est altérée et participe au défaut de réactivité attendu dans le contexte de la dysfonction de GCN2. Il était question de montrer que GCN2 régule le tonus vasculaire pulmonaire via une régulation de l'activité et l'expression de l'enzyme eNOS au niveau vasculaire pulmonaire. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons procédé de la manière suivante.

- Dans un premier temps, j'ai comparé, à l'aide de méthode *ex vivo*, les valeurs de tensions isométriques des AP de ces rats mutés avec celles des AP des rats sauvages dénommés « WT ».

- Ensuite, toujours en *ex vivo*, j'ai étudié les effets de donneurs de NO et des inhibiteurs pharmacologiques de certains effecteurs de la voie du NO notamment la eNOS et la sGC, sur la réactivité des AP de ces rats mutés *Eif2ak4*^{-/-} versus WT.

- Dans un troisième temps, j'ai mesuré l'expression protéique de l'enzyme eNOS dans les poumons totaux issus de ces rats mutés versus WT, à l'état basal ou soumis à une condition de déprivation en acides aminés par une stimulation avec de l'asparaginase (ASNase).

Pour ce qui est de mon deuxième projet, l'objectif était d'étudier l'effet iatrogène du LEF, un médicament immunomodulateur, utilisé dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes. Selon des données cliniques et une étude réalisée dans notre laboratoire, une association possible de ce traitement avec l'HTAP a été identifiée. J'ai étudié les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de ce médicament et de son métabolite, susceptibles d'être associés à la pathogénèse de l'HTAP.

Nous nous sommes fixé les objectifs suivants.

- Premièrement, j'ai procédé à l'étude de la réactivité vasculaire des APs de rat Wistar en présence du LEF ou de son métabolite actif, le TER.

- Deuxièmement, j'ai procédé à l'étude de la viabilité, la prolifération et la migration des CMLs-AP traitées avec le LEF et / ou le TER.

- Troisièmement, j'ai étudié l'effet de ces agents au niveau de l'activité des kinases impliquées dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire (MLCK, ERK1/2, ROCK), mais aussi au niveau de kinases impliquées dans des voies de signalisation clés de l'HTAP (BMPRII, stress du RE).

***MATERIELS ET
METHODES***

1) Evaluation de la réactivité vasculaire par la technique du myographe

Cette technique consiste en un bain d'organes qui permet de mesurer la tension ou force isométrique (longueur du muscle constante) ou isotonique (charge constante) des segments artériels isolés. Le système isométrique permet de mimer ex vivo la tension physiologique à laquelle sont, normalement, soumis les vaisseaux. Cette technique est utilisée pour étudier les changements du tonus vasculaire en réponse à des substances pharmacologiques.

Modèle animal

Cette étude est conforme aux réglementations de l'UE énoncées dans le décret français n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques.

Pour l'étude portant sur la caractérisation des rats $KO^{+/}$, concernant le projet 1 intitulé « Rôle de GCN2 dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire », nous avons utilisé des rats déficients pour le gène *Eif2ak4* à l'état homozygote. Ces rats ont déjà été utilisés dans des études d'un laboratoire collaborateur, l'UMRS 1166, dans un article en cours de publication auquel j'ai activement participé (article en révision dans *l'American Journal of Physiology*) et dans une thèse déjà publiée (NNT : 2021SORUS381). Les rats ont été hébergés à l'animalerie de la Sorbonne-Université (SU). L'animalerie est agréée par le Ministère français de l'Agriculture (accord N°B751320). Cette étude a été approuvée par le Comité d'éthique pour l'expérimentation animale (autorisation N°APAFIS#20355-2019042316587189v5). Ces rats ont un fond génétique Sprague-Dawley, ils proviennent de chez Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) et ils sont modifiés génétiquement au niveau du gène *Eif2ak4* par la plateforme de Nantes (Genocell Edit) par la technique CrispR-Cas9. Pour se soustraire des effets *off-target*, trois lignées ont été créées, pour ces rats, par des délétions de différentes tailles. Il s'agit de trois lignées de rats KO *Eif2ak4* avec respectivement une délétion de 25 paires de base (pb), de 41pb et de 150pb. Comme décrit dans les travaux de Manaud et al., les rats âgés de trois semaines ont été génotypés à l'aide de l'ADN génomique obtenu à partir des poinçons d'oreille de l'animal. Ces rats mutés, dans cette présente étude, seront nommés « *KO Gcn2* ». Tous les soins

aux animaux et les procédures effectués dans cette étude sont conformes à la réglementation et ont été conduits de manière à minimiser les souffrances chez ces derniers. Les rats ont été hébergés dans un environnement contrôlé (Température 21 ± 1 ° C, cycle jour/ nuit de 12 h chacun). Des rats mâles et femelles, *Wild-type* ou WT et KO *Gcn2* sont étudiés à l'âge de 2 à 5 mois (200 à 600g).

Pour l'étude portant sur le LEF, le projet 2 intitulé « Physiopathologie des formes induites d'HTP, Cas d'un immunomodulateur le léflunomide », des rats standards males Wistar de six (6) à neuf (9) semaines (250 à 300g) ont été fournis par Janvier Labs. Ces rats ont été hébergés à la plateforme ANIMEX au sein de la faculté de pharmacie-Université Paris-Saclay de Châtenay-Malabry. Tous les efforts ont été faits pour minimiser les souffrances à toutes les étapes de l'élevage et du sacrifice des animaux.

Les rats sont sacrifiés par injection d'une dose létale de DOLETHAL® (Pentobarbital sodique 15 mg/100g, i.p). Les poumons et, dans certaines expériences, les intestins associés au réseau vasculaire mésentérique sont prélevés et placés dans une solution saline physiologique à 4 °C (KREBS, voir partie 5 : Solutions et drogues).

Isolement et préparation des tissus

- Prélèvement et utilisation de l'artère pulmonaire (AP) de rat

Un lobe pulmonaire (généralement le gauche) est monté dans une boîte à dissection tapissée de gel en silicone, face ventrale apparente. A l'aide d'une loupe-binoculaire, une incision est effectuée le long de la surface superficielle d'une bronche (bronche principale), passant d'une grande voie respiratoire proximale à une bronche distale ou bronchiole. L'AP sous-jacente, se ramifiant similairement à la voie aérienne dans le faisceau bronchovasculaire, est ensuite facilement identifiée immédiatement en profondeur de la paroi bronchique, qui est disséquée du vaisseau. L'AP principale est prélevée. Le tissu conjonctif investissant latéralement l'artère est délicatement séparé et cette dernière est soulevée. L'AP est ensuite bien débarrassée du tissu conjonctif parenchymateux pulmonaire adhérent, puis divisée en petits anneaux de 2mm de longueur environ, préférentiellement dans la partie la plus distale de l'artère.

Il est intéressant de noter que dans certaines expériences, l'endothélium est enlevé par une technique mécanique à l'aide d'une aiguille de seringue dont la paroi externe est striée manuellement. L'aiguille est introduite délicatement dans la lumière de l'AP et l'endothélium est ainsi lésé par 6 rotations consécutives. Une stimulation avec de l'ACH à $10^{-5}M$ permettra d'évaluer si l'endothélium est suffisamment dysfonctionnel. Cette concentration à $10^{-5}M$ d'ACH a été choisie à la base d'expériences antérieures, elle induit une relaxation optimale au niveau de l'AP de rat. Seules les APs avec un pourcentage de relaxation inférieur à 0,5% sont considérées comme ayant un endothélium quasi-absent.

D'autres expériences ex vivo sont réalisées avec des APs humaines.

- Prélèvement et utilisation de l'artère pulmonaire humaine

A l'issue des transplantations pulmonaires réalisées au sein du groupe hospitalier « Centre Chirurgical

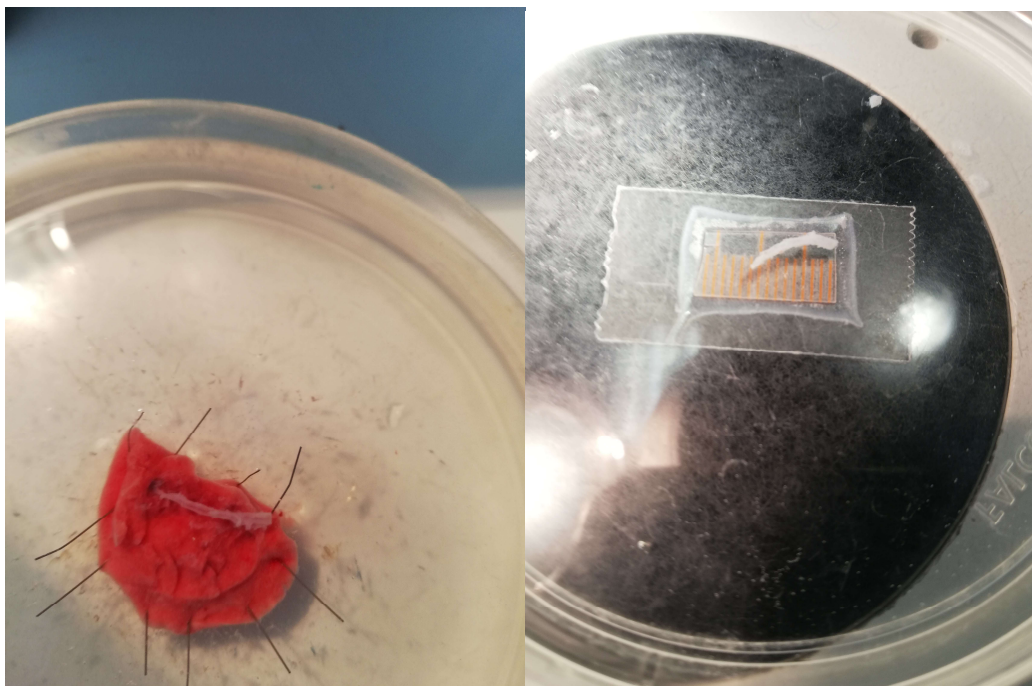


Figure 44. Dissection et prélèvement d'une artère pulmonaire de rat Wistar male.

Marie Lannelongue », nous avons pu récupérer, à partir des biopsies pulmonaires prélevées dans les parties plus distales de la tumeur, des artères pulmonaires humaines (hAPs).

L'accès à ces prélèvements biologiques est conforme à l'accord réglementaire du comité de la protection des personnes (CCP), en Ile de France, Paris, sous le numéro d'enregistrement, 2018-A01252-53. Une fois

prélevées, les hAPs sont mises tout de suite dans du milieu DMEM complet (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, 10% de sérum de veau fœtal) à 37°C pendant 24h. Après ce délai, nous avons utilisé ces hAPs dans l'étude de la réactivité vasculaire à l'aide du myographe.

- Prélèvement et utilisation de l'artère mésentériques (AM) de rat

L'artère mésentérique (AM) est prélevée à partir des petits intestins dans leur partie dorsale. L'artère superposée à la veine est prélevée dans sa première ramification (artère de 2e ordre).

Evaluation ex vivo de la vasoréactivité

Le principe du myographe isométrique « à fils » et les normalisations ont été décrits pour la première fois par Mulvany et Halpern.¹³⁸ Des anneaux (1,2 à 2,0 mm de longueur et 500 à 1200 µm de diamètre) d'AP et d'AM sont montés sur les supports d'un myographe à petits vaisseaux (Danish Myo Technology ; DMT, Aarhus, Danemark), placés dans une cuve à organe isolé remplie d'un bain. Le bain est composé de 5mL de solution de « KREBS » (Voir section5 : « Solutions et drogues »). Le bain est thermostaté à 37°C et gazé en continu avec 95% d'O₂/ 5% CO₂ (pH 7,4), à partir de l'étape de montage des anneaux. Plus précisément, chaque cuve contient deux supports. L'un est mobile, à position réglable par une vis micrométrique permettant de positionner le support suivant un axe orthogonal à l'axe du vaisseau. L'autre est fixe, mais connecté à un capteur de force (transducteur). En effet, la vis permet de contrôler l'écartement entre les deux supports au cours du montage et de la normalisation. Lors du montage, deux fils de tungstène (diamètre : 40µm) sont passés longitudinalement dans la lumière du vaisseau. L'anneau est maintenu en équilibre entre les deux supports maintenus de part et d'autre par les fils de tungstène, chacun fixé à l'un des supports sous une légère tension. Une fois la préparation montée, le support réglable est positionné de façon que les 2 fils se présentent en vis-à-vis, à la limite du contact, le vaisseau n'étant pas étiré. Le myographe permet d'accueillir 4 vaisseaux dans 4 cuves, pouvant être étudiés simultanément.

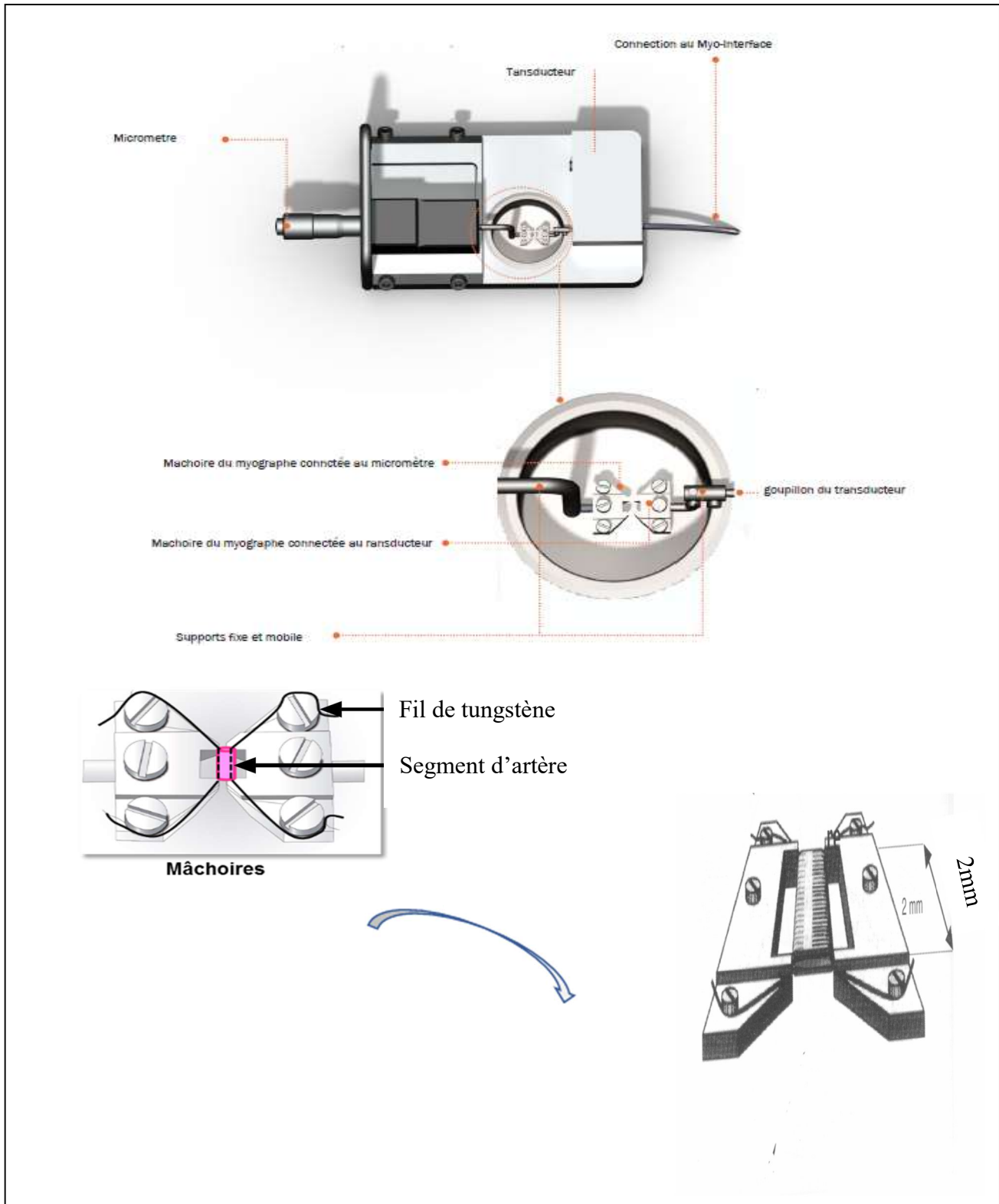


Figure 45. Schéma décrivant le montage d'une artère isolée sur un myographe

Le myographe est connecté à un système d'acquisition Powerlab 8/30 (AD Instruments, Paris, France), lui-même relié à un ordinateur. L'acquisition effectuée par le logiciel Lab chart7 (AD instruments). Le myographe est calibré, en moyenne, tous les mois.¹³⁸

Normalisation

Après avoir remis le myographe au niveau zéro, une force modérée de 0,5mN est tout d'abord appliquée à la préparation par manipulation de la vis micrométrique au support mobile. Ce dernier permet d'augmenter la distance séparant les deux fils de tungstène, et donc d'étirer les parois du vaisseau de manière transversale. L'écartement est ainsi augmenté progressivement par paliers de 30-200 μ m, à intervalles de 180secondes. Cette manipulation se poursuit jusqu'à ce que la tension mesurée franchisse la valeur théorique correspondant à une pression transmurale de 30 mm Hg (3,99 kPa) pour les artères pulmonaires et 100 mm Hg (13,33 kPa) pour les artères systémiques. Pour cela, le logiciel utilise la Loi de Laplace. En effet, l'équation de Laplace donne la relation entre la tension de la paroi dans un cylindre, son rayon et la pression intraluminale :

Pour l'anneau ou vaisseau au repos : $T = P \cdot r$

Avec : T : tension pariétale exprimée en N/m ; P : Pression artérielle théorique exprimée en Pa (N/mm²);
r : rayon interne du vaisseau exprimé en m.

Le périmètre, ou circonférence « C » théorique de la section du vaisseau est égal à $C = 2\pi r$. On a donc : $T = P \cdot C / (2\pi)$. Ainsi, pour une pression théorique donnée, il existe une relation linéaire entre la tension de la paroi et le diamètre du vaisseau. Le logiciel trace une isobare linéaire pour la pression requise (soit 30 ou 100 mm Hg) sur un graphique.

La tension réelle correspond à la tension de la paroi (force enregistrée par le transducteur, divisée par deux fois la longueur du segment en mm) : $T = F / 2 L$, et est placée sur le graphique en fonction de la circonférence déduite de l'étirement des deux supports. Les points obtenus aux paliers d'étirement successifs sont placés sur le même graphe, et dessinent une courbe exponentielle.

L'intersection entre cette courbe et la droite isobare indique la circonférence et la tension correspondant à cette pression pour le segment considéré. Les circonférences théoriques du vaisseau correspondant aux tensions cibles ainsi obtenues sont respectivement notées C_{100} ou C_{30} . La circonférence de travail C_1 est choisie à 90% de cette circonférence¹³⁸; elle peut être obtenue en rapprochant le support mobile du support fixe, suivant une valeur d'écartement des deux supports indiqués par le logiciel. Une fois la normalisation terminée, la préparation est laissée au repos pendant 30-60 min.

Solutions et drogues

- Le KREBS

KREBS est composé de, en mmol/L : 119 NaCl, 25 NaHCO₃ ; 1,18 KH₂PO₄ ; 1,17 MgSO₄ ; 4,7 KCl ; 11 Glucose ; 2,5 CaCl₂, le tout dissous dans de l'eau distillée (déionisée). Le KREBS est bullé en continu avec un mélange à 95% d'oxygène 5% de dioxyde de carbone.

- La solution de KREBS enrichie en Potassium (K⁺) (« KCl »)

Le KCl (K⁺) est préparé avec les mêmes composants que le KREBS à l'exception du NaCl qui est remplacé par du KCl. Le KCl est préparé à différentes concentrations notamment en mM : 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120.

Le tableau 7 présente les agents pharmacologiques utilisés.

- L'acétylcholine

L'acétylcholine (ACH) est préparée à partir de l'ACH en suspension et de l'eau distillée. Et à partir d'une concentration-mère, des dilutions en cascade sont préparées. Des concentrations croissantes et cumulatives (10⁻⁹M à 10⁻⁴ M) choisies, avec une échelle logarithmique bien définie, permettent d'établir une courbe ou sigmoïde caractéristique des concentrations-réponse (doses-réponse) à l'agoniste utilisé (Tableau 8).

- **L'U46619**

A partir d'une solution- mère, des solutions, de différentes concentrations : 10^{-3}M à 10^{-6}M , sont préparées. Ces solutions sont utilisées dans les concentrations-réponse à l'U46619 de l'ordre de 10^{-9}M à 10^{-6}M (Tableau 8).

Concentration de l'ACH dans la cuve (M) (C finale)	Volume dans la cuve (mL) (V,final)	Concentration initiale en ACH (M)(C initiale)	Volume d'ACH à ajouter dans la cuve (µL) (V initial)
10^{-9}	5	10^{-6}	5
$3. 10^{-9}$	5	10^{-6}	10
10^{-8}	5	10^{-5}	3,5
$3. 10^{-8}$	5	10^{-5}	10
10^{-7}	5	10^{-4}	3,5
$3. 10^{-7}$	5	10^{-4}	10
10^{-6}	5	10^{-3}	3,5
$3. 10^{-6}$	5	10^{-3}	10
10^{-5}	5	10^{-2}	3,5
$3. 10^{-5}$	5	10^{-2}	10
10^{-4}	5	10^{-2}	35

Tableau 8. Tableau présentant les concentrations croissantes utilisées dans les concentrations-réponses d'ACH (Colonne 1). Ces solutions de différentes concentrations sont préparées à partir d'une solution-mère (10^{-2}M) et des dilutions en cascade (colonne 3).

- **Le DEANO**

Des concentrations-réponse au DEANO, de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-4}M , sont utilisées (Tableau 8).

- **L'ODQ**

L'ODQ est préparé en dilution dans du DMSO. Une dose unique de $10\mu\text{M}$ est utilisée.

Agents pharmacologiques utilisés

Produit	Propriétés pharmacologiques	Concentrations utilisées	Références du Fournisseur
Acétylcholine chlorure (ACH)	Agoniste des R muscariniques	[10 ⁻⁹ M à 10 ⁻⁴ M]	Sigma-Aldrich Merck, France
U46619	Analogue de La thromboxane A2	[10 ⁻⁹ à 10 ⁻⁶ M]	Cayman(Interchim Montluçon, France)
LNAME (L-NG Nitroarginine Methyl Ester)	Inhibiteur de nOS	300 µM	Enzo life Science (Villeurbanne, France)
ODQ	Inhibiteur de la sGC	10 µM	TocrisBio-Techne (Noyal-Châtillon sur Seiche, France)
DEANO (diéthylamine nonoate)	Donneur de NO	[10 ⁻⁹ à 10 ⁻⁴ M]	Enzo life Science (Villeurbanne, France)
Phényléphrine	Agoniste α1 adrénergique	[10 ⁻⁹ M à 10 ⁻⁵ M]	Sigma(P-6126)
Leflunomide	Inhibiteur de DHODH	100 µM	Sigma aldrich (France) et Enzo life Science
Teriflunomide	Inhibiteur de DHODH	100 µM	Sigma aldrich
Acide bongkréique	Inhibiteur de l'ANT	10 µM	Sigma
Indométhacine	Inhibiteur de la cyclooxygénase (COX)	10 µM	Sigma
Nifédipine	Inhibiteur du canal Ca _v 1.2	1 µM	Sigma aldrich
CPA	Inhibiteur de la pompe SERCA	10 µM	Sigma
DMSO	Véhicule	V équivalent	Sigma aldrich

Tableau 9. Agents pharmacologiques utilisés dans l'évaluation ex vivo de la réactivité vasculaire des APs, hAPs et AM. DHODH, dihydroorotate dihydrogénase ; ANT, adénosine nucléotide translocase ; CPA, acide cyclopiazonique ; C, concentration ; DMSO, diméthylsulfoxyde.

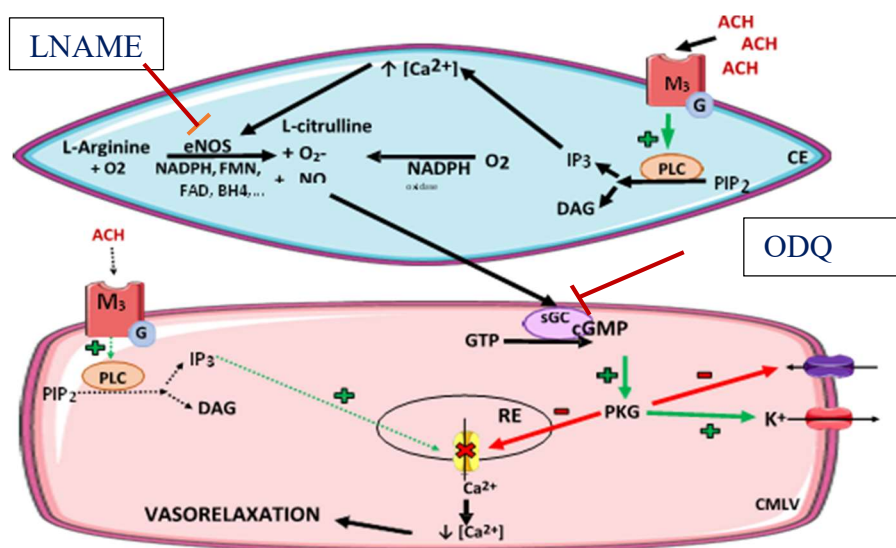


Figure 46 : Schéma illustrant les effets du LNAME et de l'ODQ sur la réponse vasorelaxante de l'ACH au niveau de l'AP de rat

Protocole expérimental utilisé

Le montage réalisé, la solution de KREBS est renouvelée et les anneaux sont équilibrés pendant 30-60 min. Le niveau de tension, au terme de cette période, définit le niveau basal de tension (en mN/mm). La viabilité de chaque anneau est évaluée en mesurant 2 fois la réponse à une solution de KREBS modifiée contenant 80 mM de K^+ (KCl 80 mM). En effet, dans des expériences précédentes, des études concentration-réponse (effet) au KCl ont été effectuées et la réponse contractile à 80 mM s'avère la plus grande. La réponse contractile est évaluée en mesurant l'amplitude induite en réponse à l'agoniste vasoconstricteur par rapport au tonus basal caractérisant le tonus du vaisseau au repos avant stimulation. Après la deuxième réponse contractile au KCl, une réponse à l'ACH à $10^{-5}M$ est mesurée afin d'évaluer la fonctionnalité de l'endothélium.

Enfin, un rinçage au KREBS est effectué jusqu'à retourner au niveau basal de tension.

- Pour le projet 1 : Rôle de GCN2 dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire

Des études de la relation concentration-effet à la suite de l'ajout d'agents vasoconstricteurs ont ensuite été réalisées avec des doses croissantes et cumulatives de KCl, et de U46619 (Tableau 8).

Pour l'étude des réponses vasorelaxantes, (ACH, DEA-NO), le vaisseau est d'abord pré-contracté avec de l'U46619 à une concentration submaximale correspondant à la CE₈₀ de la réponse contractile. La réponse vasorelaxante est évaluée en mesurant la diminution de tension par rapport au niveau de pré-contraction initial du vaisseau.

Lors de ces expériences, certains vaisseaux ont été pré-incubés avec des inhibiteurs notamment LNAME (inhibiteur de NOS), ODQ (inhibiteur de sGC) (Tableau 9) afin de mettre en évidence l'implication de ces enzymes dans les réponses observées.

- Pour le projet 2 : Physiopathologie des formes induites d'HTP : Cas du léflunomide

Des études ex vivo d'évaluation de vasoconstriction ont été réalisées avec des concentrations-réponse au KCl, à la phényléphrine (PE) et à l'U46619 (Tableau8), en présence de LEF et de son métabolite actif TER à 100µM. Cette concentration de 100µM est choisie à la base des données cliniques sur des relevés des concentrations plasmatiques des patients rapportés ayant développé l'HTAP après un traitement LEF.¹³⁹ Aussi, des concentrations-réponse au LEF et TER (10⁻⁹M-3 10⁻⁴M) sont également étudiées avec une artère préalablement pré-contractée avec de l'U46619 comme décrit précédemment.

Dans d'autres expériences, des inhibiteurs notamment l'acide bongkréique (inhibiteur de l'ANT), l'indométacine (inhibiteur de COX) en présence de TER et LEF, sont étudiés pour vérifier si les effets de ces drogues impliquent les voies explorées par ces inhibiteurs.

Analyses statistiques

Les données sont représentées par les moyennes et le sem. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données paramétriques sont analysées l'aide de test t de Student ou ANOVA one-way ou two-way selon le cas. Les concentrations (doses-réponse) sont exprimées en log₁₀ négatifs.

L'amplitude des réponses contractiles sont exprimées en mN/mm ou relativement à la réponse à une solution de KCl 80 mM (K80).

L'amplitude des réponses relaxantes est exprimée selon la contraction résiduelle, en % de la pré contraction obtenue avec l'agent vasoconstricteur.

Pour les expériences concentrations-effet, les courbes obtenues ont été analysées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9. Le logiciel effectue une régression non-linéaire en suivant l'équation de Hill :

$$Y = Basal + \frac{(Emax - Basal)}{1 + \left(\frac{CE50}{x}\right)^h}$$

Avec Y= valeur de la tension mesurée ; x=concentration de l'agoniste (M) et h=le coefficient de Hill.

A partir de ce modèle, les paramètres pharmacologiques suivants sont déterminés :

-Emax traduit l'efficacité de l'agoniste, il représente l'effet maximal obtenu ;

-CE50 traduit la puissance, elle est définie par la concentration qui permet d'obtenir 50% de l'effet maximal produit par l'agoniste.

Ces paramètres ont été déterminés dans chacun des groupes par des analyses statistiques One-way ANOVA ou two-way ANOVA avec des valeurs du P value représentées par des symboles «étoiles ou *» (***) :P < 0.001 ; ** : P < 0.0 ; * : P < 0.005)

2) Technique de Western blot

C'est une technique d'analyse et de quantification protéique. La technique du western blot est une des techniques semi-quantitatives les plus utilisées pour comparer l'expression protéique entre différents groupes d'échantillons.

Pour le projet 2, cette technique nous a permis de montrer l'expression protéiques de plusieurs facteurs ou protéines impliquées dans les voies de signalisation de la prolifération, de l'inflammation du stress du RE et de la voie BMP.

Les échantillons utilisés sont issus des extractions protéiques de cellules mises en culture (voir section Culture cellulaire) puis traitées selon différents protocoles. Les extractions protéiques sont effectuées à l'aide d'un tampon de lyse, le RIPA composé de 50 mM Tris HCl ; 150 mM NaCl ; 0,5% deoxycholate de sodium ; 0,1% SDS ; 1X inhibiteurs de protéases ; 1X EDTA.

Les échantillons, préparés avec de *Laemmli sample buffer* 6X et de β -mercaptoéthanol, sont déposées à une quantité de 20 μ g de protéines, sur un gel de polyacrylamide et soumis à un champ électrique. Les protéines migrent le long du gel selon le phénomène d'électrophorèse, puis transférées dans une membrane de nitrocellulose. La membrane est incubée dans une solution contenant un anticorps primaire, ensuite dans une solution contenant l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase. Ces anticorps s'agglutinent à la protéine d'intérêt pour permettre sa révélation selon son niveau d'expression.

Tampons utilisés

Tampon	Composition
TBS 10X	Tris HCl 100 mM ; NaCl 1,5M ; pH=8,0
TBS-T	TBS 10X ; Tween20 0,1%
TBS-A	TBS-T, BSA 1%
Tampon de migration	Tris base 50 mM ; SDS 0,1%
Tampon de transfert	Tris base 50 mM ; Ethanol 20%
Tampon déshybridation	deTris HCl 0,5M à p H=6,8 ; SDS 10% ; β -mercaptoéthanol

Tableau 10. Tampons utilisés dans la technique de western blot

Produits utilisés

Produit	Référence
SDS	Amersham
ECL Plus Western blotting Detection Reagent	Amersham
4-15% Bis-Tris gel	BioRad
Nitrocellulose 0.45 pore size	Amersham
Precision Plus Protein Standards	BioRad
Tris base	BioRad
Tween 20	BioRad
Ethanol absolu	Sigma
Rouge ponceau	BioRad
Papier whatman	Amersham

Tableau 11. Produits utilisés dans la technique de western blot

Anticorps utilisés

Prolifération CMLs-AP			
Anticorps	Reference	Dilution	MW
p-ERK1/2 MAPK	Cellsignaling	1/1000	44-42KDa
ERK1/2 MAPK	Cellsignaling	1/1000	44-42KDa
p-AKT	Cellsignaling	1/1000	60KDa
AKT	Cellsignaling	1/1000	60KDa
p-mTOR	Cellsignaling	1/500	289KDa
mTOR	Cellsignaling	1/1000	289KDa
p-DRP1	Cellsignaling	1/1000	82KDa
Propriétés contractiles des CMLs-AP			
Anticorps	Reference	Dilution	MW
p-PLCγ	Cellsignaling	1/1000	155KDa
p-CAMPKII	Cellsignaling	1/1000	50-60kDa
p-ERK1/2 MAPK	Cellsignaling	1/1000	44-42KDa
ERK1/2 MAPK	Cellsignaling	1/1000	44-42KDa
p-ROCK2*	Invitrogen	1/500	160kDa
ROCK2	Cellsignaling	1/1000	160kDa
ROCK1	Cellsignaling	1/1000	160kDa
p-MYPT1	Abcam	1/1000	140kDa
p-MLCK	Invitrogen	1/500	90kDa

MLCK***	Invitrogen	1.3000	90kDa
p-FAK	Cellsignaling	1/1000	125KDa
p-MLC***	Sigma	1/250	19kDa
MLC	Cellsignalling	1/1000	19kDa

Viabilité et apoptose, CMLs-AP			
Anticorps	Reference	Dilution	MW

BAX	Cellsignalling	1/1000	
BCL2	Abcam	1/1000	
P-Bad	Abcam	1/1000	23kDa
PCNA	Cellsignalling	1/1000	30KDa
RB(Senescence)	Abcam	1/1000	
P21	Cellsignalling	1/1000	
SURVIVIN	Cellsignalling	1/1000	16KDa
p-NFKB	Cellsignalling	1/1000	
IL1 β	Cellsignalling	1/1000	
IL18	Cellsignalling	1/1000	
IL6	Cellsignalling	1/1000	
IL10	Cellsignalling	1/1000	

SMAD Signaling			
Anticorps	Reference	Dilution	MW

p-Smad1/5/9	Cellsignaling	1/1000	60KDa
p-Smad1	Cellsignaling	1/1000	60KDa
Smad 1	Abcam	1/500	60KDa
smad6	Abcam	1/500	60KDa

STRESS du RE			
Anticorps	Reference	Dilution	MW

P-IRE1 α	Abcam	1/1000	
IRE1 α	Abcam	1/500	
XBP1S	Cellsignaling	1/1000	60KDa
GRP78	Abcam	1/1000	78KDa
ATF4	Invitrogen	1/1000	49-55KDA
GADD34	Cellsignaling	1/1000	110KDA

CALCIFICATION			
Anticorps	Reference	Dilution	MW

RUNX2	Cellsignaling	1/1000	60KDa
ALP	Abcam	1/500	78,9KDA
OPN	Abcam	1/500	60KDA 19KDA
OSTEOCALCIN	Abcam	1/500	

Tableau 12 : Anticorps utilisés dans la technique de western blot

Analyse statistique

Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données sont analysées l'aide des test ANOVA two-way

3) Evaluation in vitro de la viabilité et la prolifération cellulaire

Culture primaire de CMLs-AP

Des CMLs-AP issues de la banque de cellules du laboratoire Inserm U999, provenant des biopsies de poumons récupérés lors des transplantation pulmonaires, sont mises en culture dans du milieu DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) avec une supplémentation de sérum de veau foetal (SVF) à 10% et d'un mélange pénicilline et streptomycine, à 37°C dans un atmosphère humide de 5% de CO₂. Nous avons aussi utilisé des CMLs-AP commerciales de LONZA fournies avec le milieu de culture correspondant et des CMLs-AP de PROMOCELL à un niveau de passage 3. Ces cellules ont été utilisées aux passages 3 à 6 et avec une densité de 4.10^3 cellules par puit, dans des plaques de 96 puits à fond transparent.

Mesure de la viabilité cellulaire ou test MTS

La viabilité cellulaire est quantifiée à l'aide d'un test basé sur la réduction du tetrazolium. Le réactif utilisé est le Cell Titer 96 Aqueous Non-radioactive Cell Proliferation Assay, de Promega, France.

Les CMLs-AP sont placées dans des puits de plaque de 96 puits avec une densité de 4.10^3 cellules et volume de 200µL par puit. Après 24h, les cellules sont mises en milieu DMEM minimum ne contenant que 0,5% de SVF pendant 24h.

Les cellules sont ensuite traitées avec des différentes conditions de concentration du LEF et TER notamment 50µM, 100µM, 250µM, 500µM de LEF et TER. Une condition DMSO (0,1%) est utilisée pour servir de véhicule ou contrôle. Le test MTS est réalisé à différents « temps » ou « time point » : 1heure (h), 6h, 24h, 48h et 72h après le traitement au LEF et TER. Le réactif Cell Titer 96 Aqueous est ajouté dans

chaque puit à l'aide de pipettes numériques ou multicanaux. Ensuite, suit l'enregistrement de l'absorbance à 490 nm à l'aide d'un lecteur de plaque à 96 puits. La viabilité des cellules a été calculée en comparant l'absorbance à 490nm des cellules traitées avec celle des contrôles DMSO à 1% après 2 heures d'incubation avec du MTS.

Mesure de la prolifération cellulaire : test BrdU (5-bromodéoxyurique)

Le test BrdU est une méthode de mesure qui sert à évaluer la prolifération cellulaire. Repérer la phase S, M ou d'autres éléments spécifiques de la division cellulaire permet d'évaluer la prolifération cellulaire. Le kit test BrdU repose sur l'identification de la phase S de l'ADN en synthèse. La BrdU est excellent substitut de la thymidine dans la synthèse d'ADN. Ce test est effectué sur des cellules cultivées en monocouche, dans une plaque de 96 puits. Des analogues de la pyrimidine modifiée (BrdU) sont utilisés pour mesurer le nombre de cellules en phase S.

La méthode consiste donc à mesurer la luminescence des nucléotides modifiés par la BrdU. Le kit est accompagné d'anticorps monoclonaux qui sont dirigés contre la BrdU, un anticorps primaire et un anticorps secondaire. La détection est réalisée à l'aide d'un substrat soluble qui s'attache aux noyaux des cellules supposées être en synthèse.

Analyses statistiques

Les données sont représentées par les moyennes et le sem. Les analyses statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism. Les données paramétriques sont analysées l'aide des test ANOVA two-way.

4) Test enzymatique : MLCK Kinase assay

Description du test

Les systèmes enzymatiques de kinase comprennent une enzyme kinase recombinante, un substrat approprié pour l'enzyme, un tampon de réaction et des réactifs supplémentaires si nécessaire. Ensemble, les

ADP-Glo™ Assays + Kinase Enzyme Systems constituent une méthode pratique pour profiler l'effet des composés chimiques sur l'activité des kinases. Le test enzymatique MLCK Kinase assay ou « ADP-Glo™ kinase assay » est un kit fourni par Promega. C'est un test de détection de l'ADP luminescent qui fournit une méthode de criblage universelle, homogène et à haut débit pour mesurer l'activité kinase en quantifiant la quantité d'ADP produite au cours d'une réaction kinase. Le signal luminescent est en corrélation positive avec l'activité de la kinase. Ces tests sont bien adaptés pour mesurer les effets des composés chimiques sur l'activité d'une large gamme de kinases purifiées.

Principe du test

Il s'agit d'une mesure de l'activité kinase de l'enzyme MLCK, en quantifiant la quantité d'ADP produite pendant la réaction kinase (phosphorylation).

Le test se réalise en deux étapes :

- Après la phosphorylation ou la réaction kinase, un premier réactif est ajouté pour terminer la phosphorylation et épuiser l'ATP restant dans le milieu (Il ne reste que des molécules d'ADP)
- Ensuite, l'ADP est convertie en ATP avec l'ajout du réactif de détection. L'ATP est nouvellement synthétisée par luminescence à l'aide de la réaction luciférase/ luciférine.

La staurosporine est connue étant un puissant inhibiteur de l'enzyme MLCK. Elle est utilisée dans ce test en tant que témoin positif.

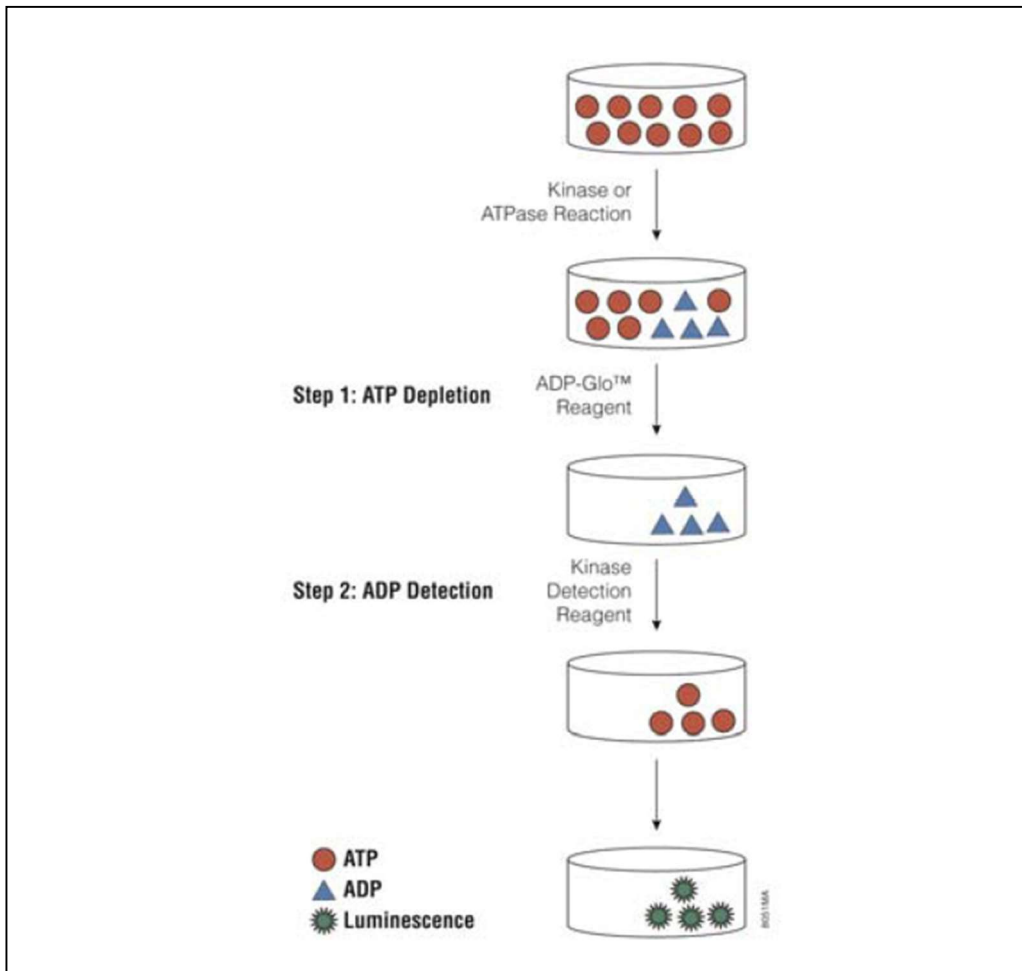


Figure 47 : Schéma illustrant le principe de l'essai enzymatique MLCK kinase

RESULTATS

Projet 1 : Rôle de GCN2 dans le contrôle du tonus vasculaire pulmonaire

Une partie de cette étude a été intégrée dans un article en révision favorable dans le *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* (Annexe 1)

Introduction

La protéine *General control nonderepressible 2* (GCN2) appartient à une famille de quatre sérine/thréonine kinases : PERK, HRI, PKR et GCN2 qui sont activées en réponse à divers stress cellulaires. PERK (protein kinase R (PKR) -like endoplasmic reticulum kinase) est spécifiquement activée par le stress du réticulum endoplasmique (RE). HRI (Heme-regulated eif2 α kinase) est activée par une carence en hème. PKR (Protein Kinase R) est activée par les ARN doubles brin et GCN2 activée par une carence en acides aminés.

Les cellules ont développé ce système de réponse aux différents stress métaboliques afin de répondre aux différents changements environnementaux et surtout maintenir l'homéostasie cellulaire. En réponse aux différents stress métaboliques précités, ces différentes kinases passent par un mécanisme commun qui est de phosphoryler la sous-unité α du facteur d'initiation de la traduction eif2 et déclenche l'*Integrated Stress Response* (ISR) ou la réponse intégrée au stress (RIS). Cette dernière est considérée comme étant l'une des voies les plus importantes dans la cellule eucaryote. La RIS joue un rôle fondamental dans l'adaptation de la cellule aux différents stress. En effet, la phosphorylation de eif2 α a pour but d'inhiber l'initiation de la formation du complexe d'initiation de la traduction, aboutissant à une forte réduction de la synthèse protéique générale. Ainsi, dans ces conditions, certains gènes dits « intégrés au stress » sont spécifiquement exprimés, c'est le cas du facteur de transcription ATF4. Grâce à une structure particulière au niveau de son domaine 5' non traduit, la traduction de l'ARN messager de ATF4 est augmentée. Ce dernier induit donc la transcription de gènes possédant dans leurs promoteurs des éléments de réponse au stress auquel la cellule fait face.

Les mécanismes physiopathologiques de la MVOP ne sont pas encore bien élucidés mais pourraient présenter des similarités à ceux de l'HTAP. Cependant, les études déjà effectuées concernant cette pathologie ont montré que le principal gène responsable de cette pathologie est le *EIF2AK4* codant pour la protéine GCN2 car des mutations bi-alléliques « perte de fonction » de ce gène ont été trouvées non seulement chez les formes héréditaires mais aussi chez des formes sporadiques de la maladie.¹⁰⁵

Par ailleurs, la réactivité vasculaire peut être altérée par un déséquilibre de la sécrétion de substances vasoactives, notamment par l'endothélium de l'AP. Ce sont les facteurs vasodilatateurs tels que le monoxyde d'azote (NO) et la prostacycline et les facteurs vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1. Ce

déséquilibre est caractérisé par une production accrue des facteurs vasoconstricteurs par rapports aux vasodilatateurs. Ainsi, l'hypothèse que nous avons émise est que la perte de fonction de GCN2 influencerait la voie du NO / GMPc qui est une voie prépondérante dans l'homéostasie vasculaire pulmonaire.

Objectifs spécifiques

Notre étude s'est ainsi portée sur le rôle de la protéine GCN2 au niveau du tonus vasculaire pulmonaire. Nous avons utilisé des modèles de rat invalidés pour le gène *Eif2ak4*, codant GCN2. Ces rats sont viables et ne présentent pas de phénotype différent de celui de leurs congénères de génotype sauvage (NNT : 2021S0RUS381). Cette observation prouve que l'invalidation seule de la protéine GCN2 n'est pas suffisante pour induire un phénotype de la MVOP chez le murin dans les conditions basales de laboratoire.

De plus, la pénétrance de la mutation est quasi-totale chez l'homme. Les patients qui présentent cette mutation sont d'âge hétérogène au moment du diagnostic. Cette hétérogénéité nous amène à envisager qu'un facteur supplémentaire est nécessaire pour déclencher la MVOP chez l'humain. Toutefois, les résultats obtenus dans ce projet sont réalisés avec des rats transgéniques soumis aux conditions basales du laboratoire.

Résultats

Evaluation de la réactivité vasculaire des artères pulmonaires des rats KO *Gcn2*

Dans l'optique de vérifier si la perte de fonction de la protéine GCN2 induite par les mutations bi-alléliques de *EIF2AK4* provoque une dysfonction endothéliale en altérant plus particulièrement la voie du NO, des mesures de la vasomotricité des AP ont été effectuées. En effet, il était question d'explorer la voie de NO à l'aide de différents stimuli vasoconstricteurs, vasorelaxants (ACH, et donneur de NO, DEANO) en présence ou non de modulateurs pharmacologiques notamment des inhibiteurs de la NOS, de la guanylate cyclase soluble (sGC) afin de mettre en évidence l'altération de ces voies enzymatiques de la voie de signalisation de NO.

Nous avons réalisé ces études sur quatre groupes expérimentaux : des rats WT mâles et femelles et des rats KO *Gcn2* mâles et femelles, soumises à des conditions normales d'élevage.

La capacité contractile des APs en réponse à la stimulation d'une dose de K^+ de 80mM a été évaluée (Figure 48a). Aucune différence significative n'a été observée entre les 4 groupes. Les APs se sont contractées d'une façon similaire en termes d'intensité par rapport au tonus basal.

Une évaluation de l'état de l'endothélium des APs, dans le but de vérifier si l'endothélium n'est pas lésé au cours du montage de l'anneau, avec une mesure de la réponse relaxante à l'ACH (10 μ M), a été réalisée et tous les vaisseaux de différents groupes avaient l'endothélium fonctionnel (Figure 48b).

Ensuite, les réponses contractiles concentration-dépendantes aux agents vasoconstricteurs, U46619 et la solution dépolarisante enrichie en K^+ (K80), n'ont pas montré de différence significative entre les différents groupes. De plus, ces données montrent l'absence d'un « effet sexe » dans la régulation de GCN2 au niveau artériel pulmonaire sur ces réponses (Figure 49).

L'exploration de voies vasodilatatrices a été effectuée en commençant par la stimulation des récepteurs muscariniques des APs isolées. Les résultats obtenus après une première série d'expériences suggéraient que la réponse à l'ACH était plus efficace dans les APs du groupe femelle KO, comparé au groupe femelle WT (figure 50). Cependant, après une première série d'expériences de « prise en main », le protocole a été amendé avec l'ajout d'une concentration supplémentaire d'ACH (10^{-4} M). La figure 51 présente uniquement les individus testés avec une gamme de concentration complète (10^{-9} M- 10^{-4} M). Sur cette série, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence, ni entre les sexes, ni entre les génotypes WT et KO.

Dans la deuxième série, les quatre groupes (WT male, KO male, WT femelle et KO femelle) sont caractérisés par des valeurs de la CE_{50} et de l'effet maximal (E_{max}) qui ne présentent pas de différence significative (Figure 51).

Dans les APs, l'inhibition de la eNOS par le LNAME (300 μ M) abolit la réponse à l'ACH. La relaxation résiduelle dans ces vaisseaux pulmonaires est similaire chez les deux groupes « poolés » c'est-à-dire les rats mâles et femelles confondus en un groupe, entre les rats mutés et les WT (Figure 52a). Aussi, nous avons vérifié que la réponse vasodilatatrice à un donneur de NO, le DEANO (en présence de L-NAME), ne présente pas de différence significative entre les rats WT et mutés. Cela semble prouver que la perte de GCN2 n'altère pas la voie en aval de NO endothélium-dépendante (Figure 52b). L'inhibition de la sGC par l'ODQ a réduit considérablement la vasodilatation induite par le DEANO aussi bien chez les rats WT que les rats mutés KO GCN2 (Figure 52c). La relaxation résiduelle est identique dans les deux génotypes. Ainsi, l'absence de GCN2 semble ne pas altérer la voie de NO endothélium-indépendante ou la voie de GMPc.

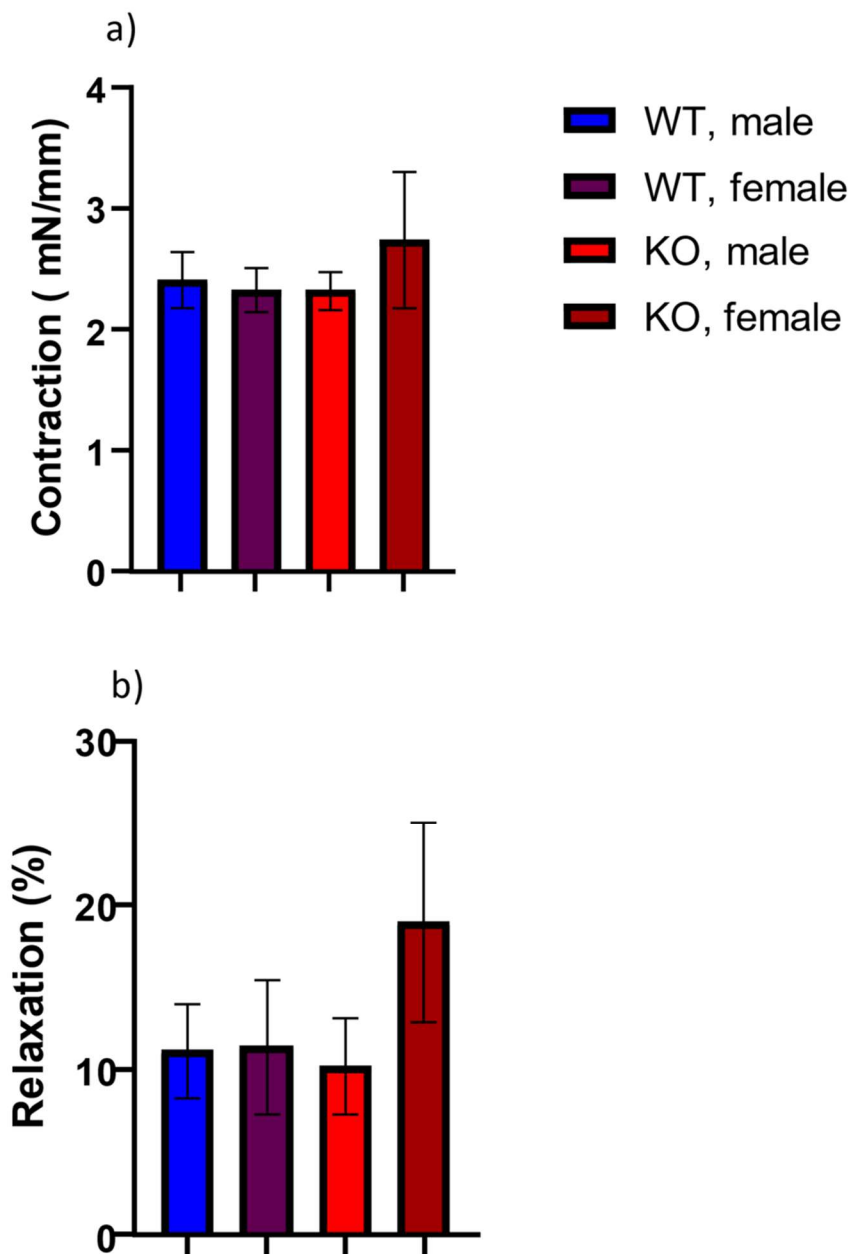


Figure 48 : Evaluation de la capacité contractile et de la réponse à une stimulation par l'ACH (10 μ M), des AP de rats « Wild type » (WT) et KO *Gcn2*, mâles et femelles. a) Réponse contractile des AP de différents groupes à la suite d'une stimulation par une dose de 80 mM de K^+ (N=8-11) ; b) Réponse à la stimulation par l'ACH (10 μ M) des AP des différents groupes étudiés (7-8) ; (%), % relatif à la pré-contraction au K80.

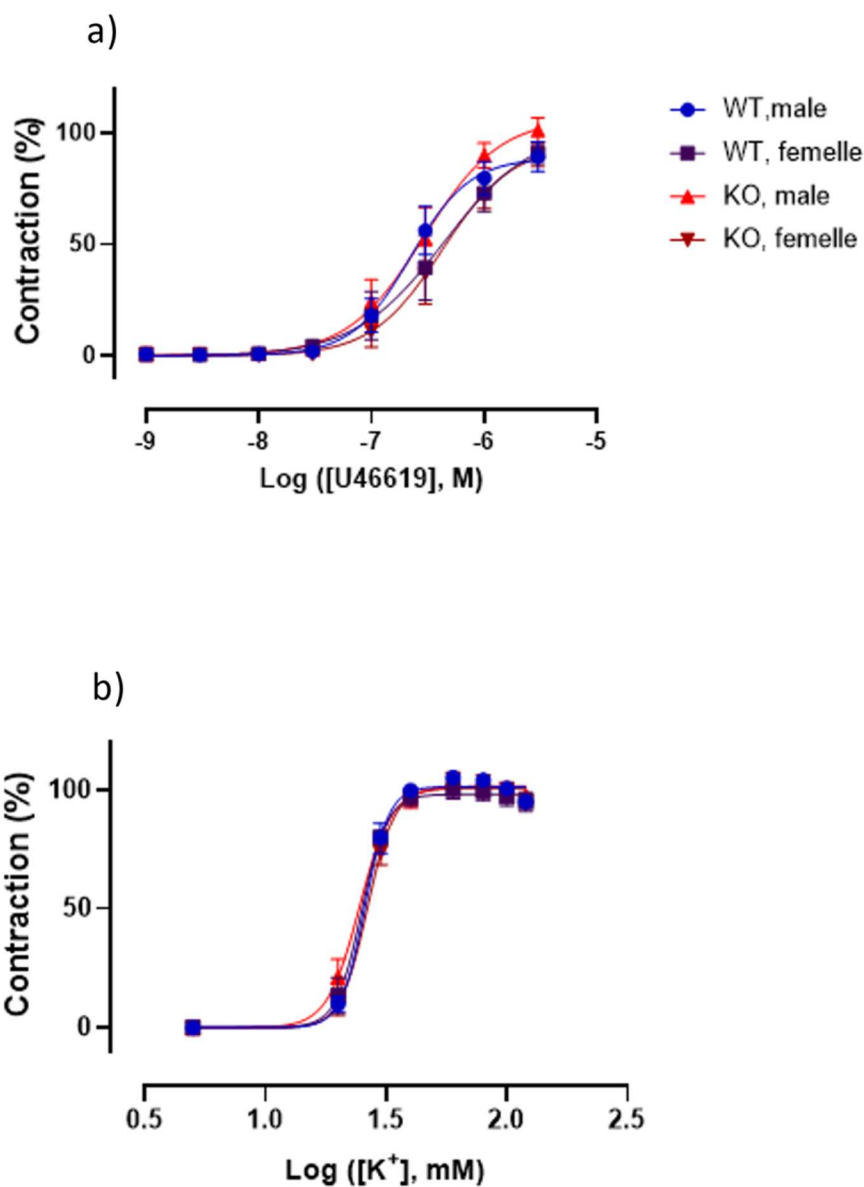


Figure 49 : Etude de concentrations-réponse des agents vasoconstricteurs sur les AP de rats transgéniques KO *Gcn2* et WT. a) Réponse contractile induite par l'U46619 dans l'AP (N=5-7) ; b) Réponse contractile aux concentrations croissantes en ions K⁺ (N=4-6) ; (%), % relatif à la réponse au K80.

L'amplitude des réponses contractiles sont exprimées en mN/mm ou relativement à la réponse à une solution de KCl 80 mM (K80).

L'amplitude des réponses relaxantes est exprimée selon la contraction résiduelle, en % de la pré-contraction obtenue avec l'agent vasoconstricteur.

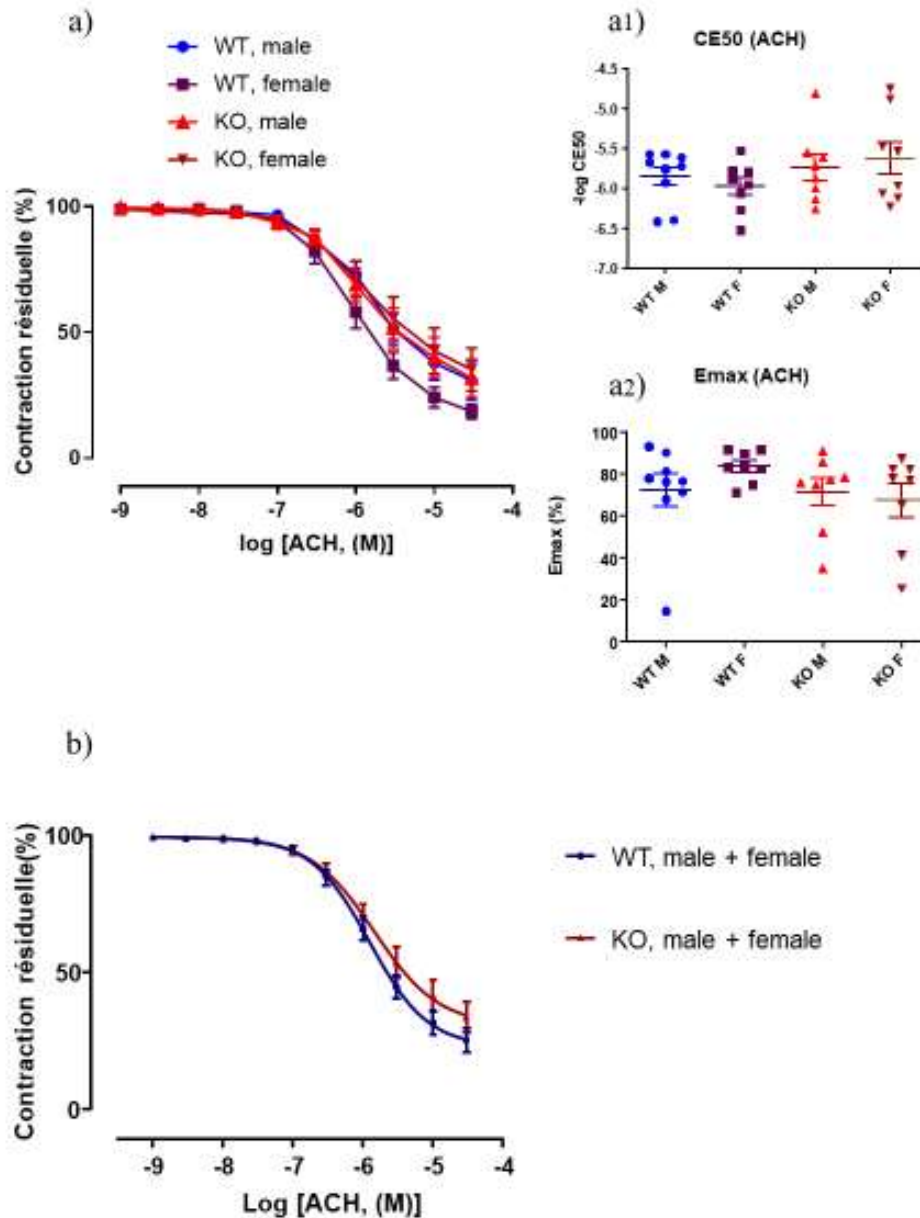


Figure 50 : Réponse vasodilatatrice de l'ACH (10^{-9} M- 3.10^{-5} M) au niveau artériel pulmonaire chez les rats transgéniques *KO $Gen2$* et WT. a) et b) L'ACH induit une réponse vasodilatatrice dans les différents groupes. On note une tendance de différence mais qui est statistiquement non significative entre le groupe de WT femelle et celui de KO femelle ; a1) et a2) respectivement représentent la CE_{50} et l' E_{max} de la réponse vasorelaxante induite par l'ACH (N= (7-9)).

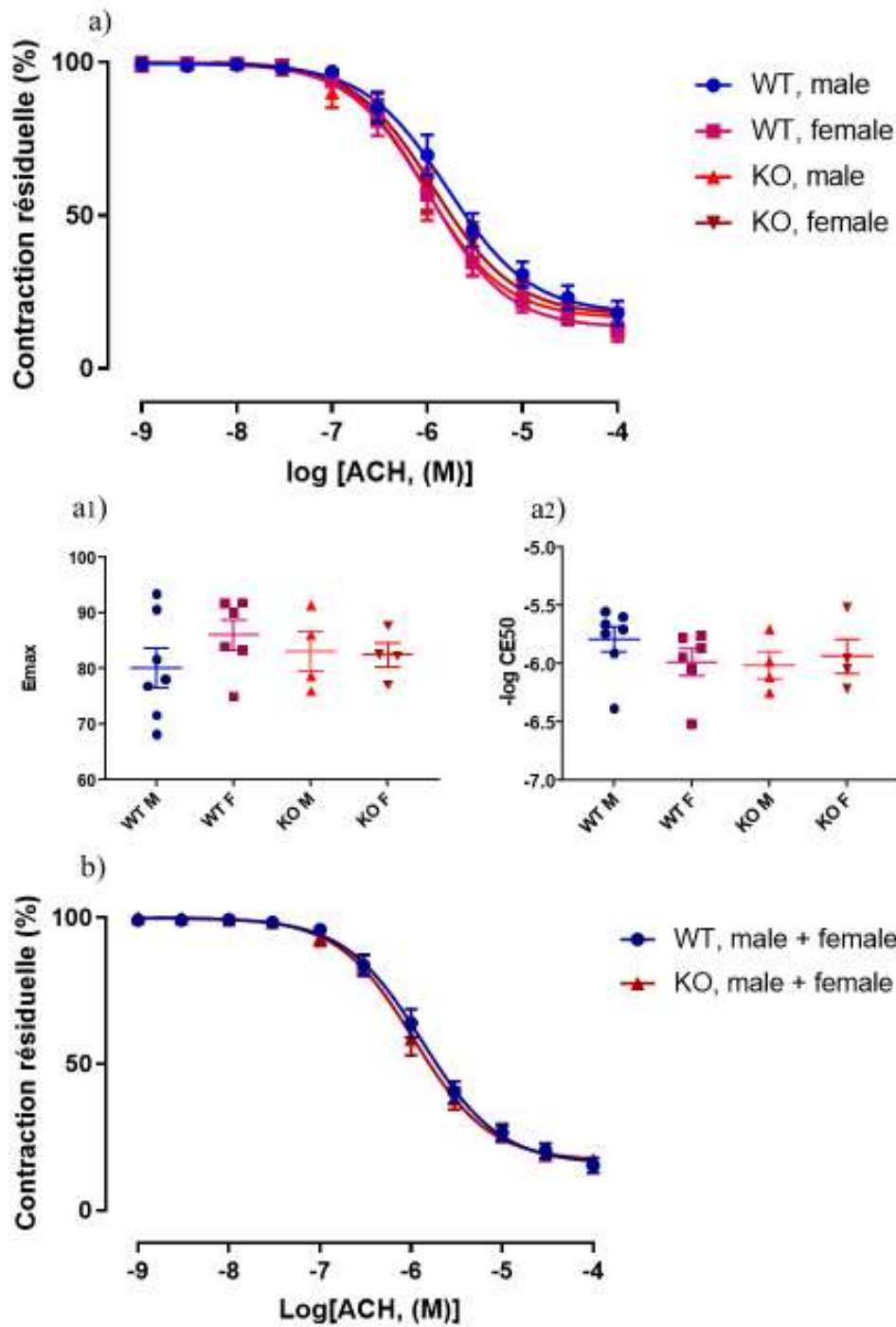


Figure 51. Réponse vasodilatatrice de l'ACH ($10^{-9}M$ - $10^{-4}M$) au niveau artériel pulmonaire chez les rats transgéniques *KOGcn2* et WT. a) et b) L'ACH induit une réponse vasodilatatrice dans les différents groupes. a1) et a2) respectivement représentent la CE_{50} et l' E_{max} de la réponse vasorelaxante induite par l'ACH (N= 4-7). (%), % de relaxation relatif à la pré-contraction l'U46619.

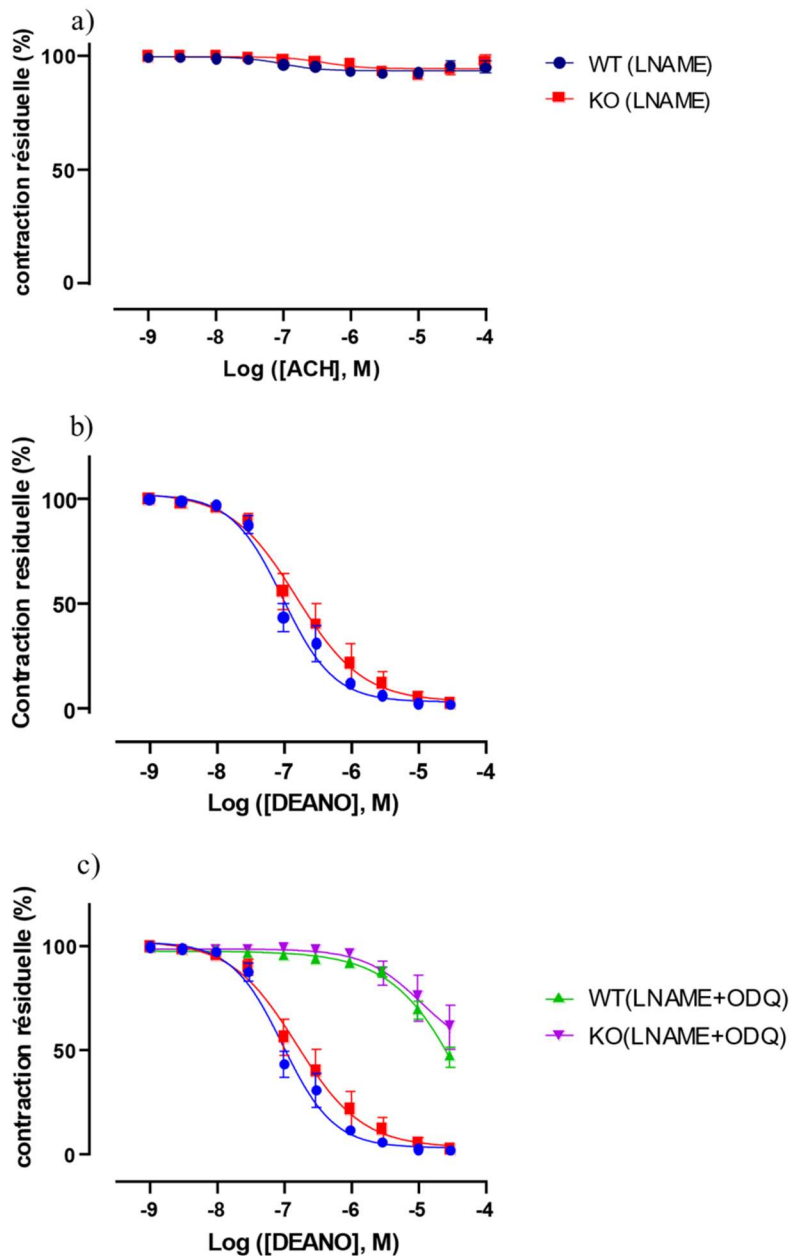


Figure 52. La réponse vasodilatatrice induite par l'ACH ou un donneur de NO, DEANO en présence de LNAME et celle induite par un donneur de NO en présence de LNAME et de l'ODQ chez les rats WT et KO *Gcn2*. **a)** Réponse vasorelaxante de l'ACH en présence de LNAME (N=7-9) ; **b)** Réponse vasorelaxante de DEANO en présence de LNAME (N=6) ; **c)** Réponse vasorelaxante de DEANO en présence de LNAME et de l'ODQ au niveau artériel pulmonaire (N=6). (%), % relatif à la pré-contraction à l'U46619 ; DEANO, Diéthylamine nonoate, LNAME, inhibiteur de la eNOS ; ODQ, inhibiteur de la sGC.

Evaluation de l'expression de l'enzyme eNOS dans les APs de rats KO *Gcn2*

La technique du Western Blot nous a permis d'examiner l'expression protéique de la NOS endothéliale (eNOS) pour étudier si GCN2 régule l'expression de cette enzyme eNOS. Les échantillons utilisés sont issus des extractions de protéines effectuées à partir de tissus pulmonaires de rats transgéniques WT et KO *Gcn2* âgés de 8 à 12 semaines. Certains de ces animaux ont reçu, par voie intramusculaire, une injection unique d'asparaginase (ASNase) de l'ordre de 75 unités par kilogramme de poids corporel de l'animal (75 U/Kg^{animal}). Le rationnel du traitement par l'ASNase est de provoquer une déplétion en acides aminés, et une réponse intégrée au stress. Dans l'optique de servir de contrôles négatifs, d'autres animaux ont reçu une solution véhicule constituée de sérum physiologique (NaCl 0,09%). Après sacrifice et prélèvement des poumons, l'expression protéique de la eNOS a été effectuée dans les extraits pulmonaires de ces animaux. Ces résultats sont aussi inclus dans la thèse de J Bignard (NNT : 2021S0RUS381).

A partir des extractions protéiques de poumon total, nous avons observé que la perte de GCN2 n'induit pas une différence significative de l'expression protéique de la eNOS chez les rats mutés comparé aux rats WT en condition basale. En revanche, chez les rats transgéniques stimulés à l'aide de l'ASNase, une réduction significative de l'expression protéique de la eNOS a été identifiée chez les rats mutés KO*Gcn2* en comparaison avec les WT (Figure 53).

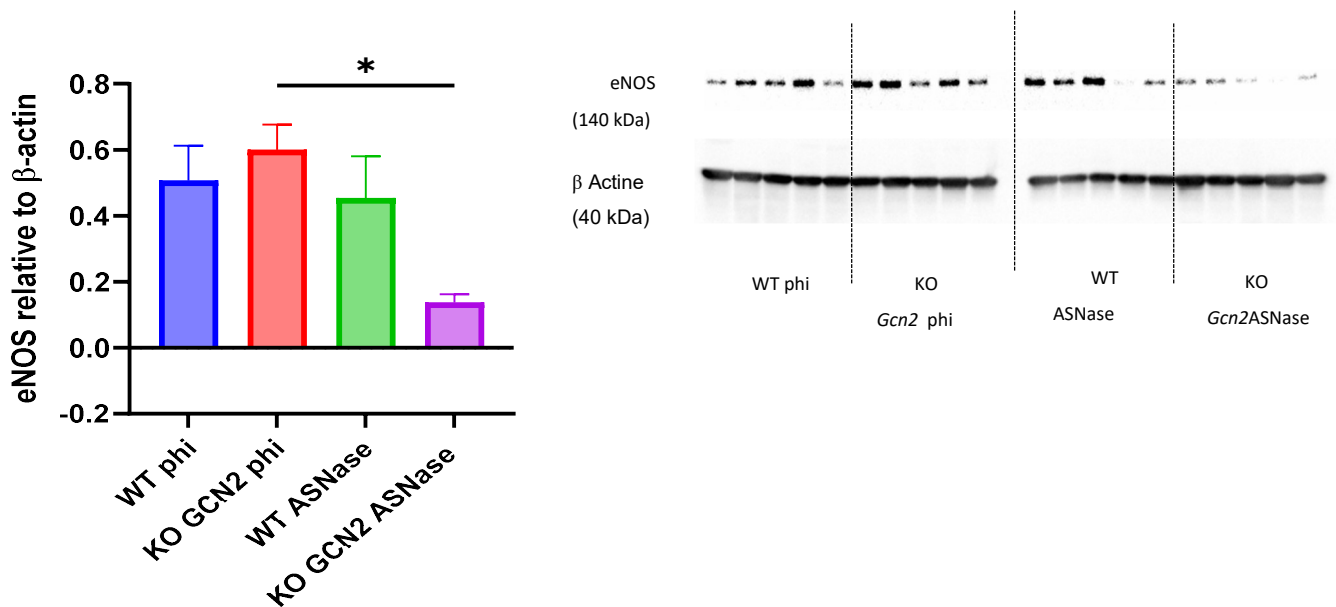


Figure 53 : Expression protéique de la eNOS dans le poumon total de rats WT et KO *Gcn2* (N=3). ASNase, asparaginase ; phi, dose unique de solution physiologique de NaCl à 0,09% à volume équivalent.

Discussion

A l'issue des résultats obtenus dans l'évaluation de la réactivité vasculaire des APs des rats transgéniques invalidés pour le gène *Eif2ak4*, nous avons constaté que ces animaux ont présenté des données similaires. Bien que les APs de rats mutés femelles semblaient présenter un niveau de contraction plus élevé en réponse à la stimulation au K80, aucune différence statistiquement significative entre les différents groupes n'a été notée (Figure 48). La réponse vasoconstrictrice, induite par des concentrations-réponse aux agonistes vasoconstricteurs notamment l'U46619 et la solution dépolarisante de forte concentration en ions K^+ , au niveau artériel pulmonaire, est similaire aussi bien chez les WT que les KO *Gcn2*. (Figure 49). D'autre part, la réponse vasorelaxante des APs à l'ACH, un agoniste vasodilatateur, a été étudiée dans deux séries d'expériences. Dans la première série testant une gamme de concentrations en ACH de 10^{-9} M à $3 \cdot 10^{-5}$ M, nous avons observé une diminution statistiquement significative dans la réponse vasorelaxante induite par l'ACH des APs des rats femelles KO *Gcn2* par rapport à celle des femelles WT (Figure 50a). En revanche, en « poolant » les mâles et les femelles dans les deux groupes WT et KO *Gcn2*, on n'observe pas de

différence significative entre les deux groupes (Figure 50b). Dans une deuxième série d'expériences, nous avons effectué des concentrations-réponse situées entre 10^{-9} M et 10^{-4} M pour mieux définir l' E_{max} de la réponse à l'ACH des APs, étant donné que les vaisseaux n'avaient pas atteint une relaxation maximale lors de la première série d'expériences. Ces résultats nous démontrent une absence de différence statistiquement significative entre tous les groupes, ce qui contraste avec les données préliminaires de ma première série d'expériences (Figure 51). Cette discordance pourrait s'expliquer par des biais techniques pour la première série d'expériences (lors du montage des anneaux pour un débutant de la technique). La réponse vasorelaxante induite par le donneur de NO n'est pas non-plus altérée chez ces modèles expérimentaux mutés (Figure 51b et 52b).

En résumé, nous n'avons mis en évidence aucune différence significative entre les propriétés vasoactives étudiées des APs de rats KO *Gcn2* et celles des APs de leurs congénères WT. L'hypothèse selon laquelle la réactivité vasculaire des APs, caractérisée par une vasoconstriction pathologique et /ou une vasodilatation insuffisante conditionnant le développement de l'HTP plus particulièrement la MVOP, n'a pas été identifiée chez ce modèle expérimental de rat déficient en GCN2. Ces données vont dans le même sens que le profil hémodynamique, de ces modèles expérimentaux, qui ne présente pas un phénotype de la maladie MVOP. Il peut être supposé qu'une stimulation induisant une carence métabolique serait nécessaire pour déclencher une action directe au niveau vasculaire et induire la maladie. En effet, le traitement aigu à l'asparaginase (ASNase) de ces rats a permis d'obtenir un phénotype avec une perte de poids au bout de quelques heures et une mortalité dans les cinq (5) jours. Le phénotype obtenu est inflammatoire avec la formations de diverses populations de cellules inflammatoires (NNT : 2021S0RUS381). L'étude de la réactivité vasculaire des APs ou vaisseaux issus de ces rats transgéniques stimulés à l'ASNase présenteraient potentiellement une augmentation de la vasoconstriction et/ou une diminution de vasodilatation des APs des KO en comparaison aux WT.

Nous n'avons pas pu caractériser aussi la vasoréactivité des veines de ces animaux, ce qui aurait pu être pertinente vu que la MVOP est aussi une maladie affectant davantage les veines et veinules que les autres

compartiments vasculaires pulmonaires. Néanmoins, le profil hémodynamique de la MVOP est similaire à celui de l'HTAP. Ainsi, l'étude de la réactivité vasculaire des APs est pertinente pour caractériser la maladie.

Pour vérifier si la protéine GCN2 régule l'activité de l'enzyme eNOS ou NOS3, la voie du NO a été largement explorée. La voie du NO est une composante de la réactivité vasculaire pulmonaire qui induit une vasorelaxation des CMLs-AP. L'activité de la eNOS entraîne une synthèse de la L-Citrulline et du NO à partir de la L-arginine (L-ARG). De ce fait, l'activité de la eNOS entraîne une hydrolyse de la L-ARG et donc un épuisement possible de sa quantité. Or la protéine GCN2 est connue comme étant un senseur d'une carence en acides aminés. Ainsi, la déplétion de la L-ARG provoquerait une activation de GCN2supposé moduler l'activité de la eNOS (feedback négatif).

Nous avons vérifié qu'en inhibant la eNOS avec le LNAME, la réponse vasorelaxante induite par l'ACH, est fortement diminuée (- à 90%). Cette inhibition est similaire dans les APs des rats WT KO *Gcn2*(Figure 52a). La perte de GCN2 ne semble ainsi pas affecter la voie de NO, principal médiateur impliqué dans la réponse relaxante à l'ACH dans l'AP.

La réponse relaxante à l'ajout direct d'un donneur de NO est fortement inhibée par l'ODQ, inhibiteur de la GCs, indiquant l'importance de la synthèse du GMPc. La réponse au NO n'est pas affectée par le génotype, indiquant que cette voie du muscle lisse fonctionne normalement en l'absence de GCN2.

En présence d'ODQ, la réponse résiduelle au DEA-NO est similaire dans les APs des rats WT et celles des KO *Gcn2*(Figure 52b). En conclusion, les rats KO *Gcn2*ne présentent pas un phénotype MVOP du point de vue réactivité vasculaire pulmonaire.

Pour ce qui est de l'expression protéique de la eNOS, aucune différence statistiquement significative n'a été notée entre les poumons des rats mutés et ceux des rats WT, en condition basale. En revanche, les poumons de rats mutés traités à l'ASNase présentent une diminution statistiquement significative de l'expression de la eNOS en comparaison avec les rats KO*Gcn2*en condition basale (Figure 53).Ainsi, la

protéine GCN2 semble réguler l'expression de l'enzyme eNOS suite à l'induction d'une déplétion en acides aminés.

Il reste donc à explorer ou à vérifier si cette diminution d'expression de la eNOS provoque une dysfonction endothéliale au niveau fonctionnel, un des mécanismes caractéristiques de la MVOP. Ceci pourrait donc être exploré dans ce modèle expérimental de rats KO *Gcn2* traités à l'ASNase.

Conclusion

Les modèles murins de KO *Gcn2* ne présentent pas un phénotype MVOP en condition basale de laboratoire. Les résultats que nous avons obtenus dans la caractérisation de la réactivité vasculaire des rats mutés KO *Gcn2* ne semblent pas surprenant vu que ces modèles expérimentaux ne sont pas caractérisés par un profil hémodynamique HTP. Ces données indiquent donc la nécessité d'un facteur déclenchant chez ces animaux pour provoquer la maladie. Chez l'humain, la maladie apparaît à des âges hétérogènes, ce qui va toujours dans le même sens que la mutation du gène GCN2 ne suffit pas pour déclencher la maladie, mais un facteur déclenchant intervient pour déclencher la maladie. Bien qu'un modèle murin MVOP ait été créé chez l'équipe de l'UMR S 1166, mais un modèle de la maladie à court, moyen ou à long terme serait pertinent pour une faciliter l'étude de la physiopathologie de cette pathologie non encore bien élucidée.

Projet 2 : Physiopathologie des formes induites d'hypertension pulmonaire ; cas d'un immunomodulateur leflunomide

Cette étude fait l'objet d'un article en préparation.

Introduction

Le leflunomide (LEF) est un immunomodulateur utilisé principalement dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde. Son métabolite actif, le teriflunomide (TER) a comme mécanisme d'action d'inhiber une enzyme mitochondriale, la dihydroorolate déshydrogénase (DHDHO), une protéine impliquée dans la synthèse de novo de la pyrimidine. Cependant son action inhibitrice de la prolifération s'étend également sur d'autres types cellulaires notamment les CML du cerveau, des cellules cancéreuses. Des études ont démontré que cette drogue induit le stress du RE, la dysfonction mitochondriale où elle provoque une cytotoxicité des hépatocytes. En plus de ses effets antiprolifératifs, le LEF a des effets inhibiteurs de la migration trans endothéliales des cellules sanguines notamment les mononucléaires. Des effets systémiques sont aussi connus pour le LEF qui induirait une hypertension artérielle systémique.¹⁴⁰ Cependant, selon une étude effectuée dans notre laboratoire, une association entre ce traitement immunomodulateur et le développement de l'HTAP a été démontrée.¹²⁶ Cette étude s'était appuyée sur des données cliniques de registre français de l'HTP via le programme de pharmacovigilance VIGIAPATH. Ces données concernent des cas fortuits de patients HTP traités par le LEF entre septembre 1999 et 2019. De plus cette étude a mis en évidence des effets toxiques dose dépendants du LEF sur les CE pulmonaires humaines.

Objectifs spécifiques

L'objectif de cette étude était d'approfondir l'investigation de l'association de cette drogue à l'HTAP en se focalisant d'abord sur la caractérisation de la vasoréactivité des artères pulmonaires de rat et humaines, en présence de LEF et de son métabolite actif le TER.

Nous avons ensuite entrepris l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de ces traitements et possiblement impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP. Des artères isolées d'un lit vasculaire systémique, les artères mésentériques, ont aussi été étudiées afin de démontrer une éventuelle sélectivité de l'effet sur la circulation pulmonaire.

Dans nos expériences, nous avons d'abord effectué des études utilisant une dose unique de 100 μ M de LEF ou TER qui, selon les données cliniques¹²⁶, constitue la concentration pertinente plasmatique chez un nombre important de patients traités avec cette drogue LEF. Par ailleurs, des études concentration-réponse du LEF et son métabolite TER ont été conduites dans les vaisseaux dans des APs de rats et des APs humaines pour étudier leurs effets dose-dépendants sur le tonus vasculaire.

Résultats

Evaluation de la réactivité des APs, des hAPs et des AMs en présence de LEF et TER

Nous avons effectué, en ex vivo, des expériences de concentrations-réponse de divers agonistes pour étudier les effets du LEF et de son métabolite actif TER sur la contraction des APs de rats en réponse à plusieurs stimuli.

Tout d'abord, le LEF, utilisé à une concentration de 100 μ M, a fortement inhibé la réponse vasocontractile au K^+ , à la phényléphrine (PE) et à l'U46619 dans l'AP de rat. Quelques expériences préliminaires non représentées suggèrent également une inhibition de la contraction produite par l'endotholine-1 (non présenté car le nombre (n) est non représentatif). Le LEF a réduit l' E_{max} de la PE de 77 % et a multiplié par deux la CE_{50} par rapport au véhicule ($P < 0,001$) (Figure 54 a). Chez l'humain, le LEF induit également une inhibition de la réponse vasocontractile induite par l'agoniste adrénergique PE (Figure (54b)).

Des effets similaires ont été observés dans l'AM de rat (Figure 55a).

L'effet du LEF n'a pas été affecté par la destruction mécanique préalable de l'endothélium, indiquant que le LEF est impliqué dans un effet endothélium-indépendant (Figure 55c). De plus, il est important de

noter que la réponse à la PE a été rétablie après le rinçage ou « *washout* » du LEF avec la solution physiologique de KREBS (Figure 54 c).

L'indométacine (INDO, 10 μM)¹³⁰, un inhibiteur de la cyclo-oxygénase, et l'acide bongkrélique (BA) (10 μM), un inhibiteur de l'adénine nucléotide translocase, n'ont pas altéré l'effet du LEF (Figures 56 c et 54 d). L'INDO a permis de démontrer les effets inflammatoires du LEF avec comme cible la COX-2 au niveau des cellules J774.2 (macrophages de modèle murin) et d'une lignée de cellules cancéreuses, A549. Le BA est inhibiteur de la phosphorylation oxydative et il est utilisé, ici, pour caractériser l'effet du LEF sur la dysfonction mitochondriale. Dans une étude, le BA a permis de démontrer un mécanisme d'action sur une lignée d'hépatocytes, HepG2.¹²⁹

D'une manière étonnante, le LEF n'a aucun effet apparent sur la réponse contractile de l'U466619 chez l'humain (Figure 56 b). En revanche, l'Emax de l'U46619 est réduit 3 fois par le LEF chez le rat (Figure 56 a1).

De plus, le LEF inhibe considérablement aussi l'Emax de la solution dépolarisante de potassium à plus de 70% et multiplie par 2 la CE₅₀ en comparaison au véhicule ($P < 0,001$) (Figure 57 a). L'étude sur l'AP humaine (hAP) a donné des effets similaires pour l'Emax (Figure (57 b1)). Des effets similaires sont observés avec l'AM (Figure 58 a) et l'effet du LEF est réversible sur ces vaisseaux, la réponse contractile revenant à la normale après lavage (Figure 58 b).

L'étude de l'effet de l'ajout de concentration croissantes et cumulatives de LEF et TER a permis de montrer que des concentrations supérieures ou égales à 10 μM de LEF ont produit une relaxation dose-dépendante de l'AP pré-contractée avec l'U46619 à une concentration de 0,8 μM (Figure 58 c) et un effet similaire est observé dans l'hAP à plus forte concentration ($\geq 100\mu\text{M}$, Figure 58 d).

Le TER a un effet intermédiaire sur la réponse du potassium dans l'AP et l'AM (Figures 57 a et 58 a). Le TER a induit une inhibition similaire à celle du LEF sur la contraction provoquée par la PE dans l'AM (Figure 55 a) mais son effet est plus faible dans l'AP. Dans l'AP, le TER a réduit l'Emax de la PE à 50% et mais n'a pas augmenté significativement la CE50 (Figures 54 a1 et a2). En revanche, le TER n'a pas

réduit significativement l'E_{max} mais a augmenté la CE₅₀ dans l'AM (Figure 55 a1 et a2). L'effet du LEF est réversible au niveau de l'AM (Figure 55 b).

En résumé, les réponses contractiles induites par le K⁺ ou des agonistes sont inhibées par le LEF et le TER dans les APs de rat et humaines. Seule la réponse à l'U46619 des APs humaines semble moins sensible aux inhibiteurs.

Nous avons ensuite entrepris de déterminer les mécanismes responsables de cet effet d'inhibition de la contraction artérielle.

Etant donné que l'influx calcique est un mécanisme important de la contraction du muscle lisse vasculaire, nous avons avancé l'hypothèse selon laquelle l'effet inhibiteur du LEF passerait par l'inhibition de l'influx calcique. Pour cela, nous avons réalisé des expériences de réactivité vasculaire en testant des modulateurs des mouvements calciques pour évaluer, d'une façon indirecte, comment le LEF pourrait les impacter. Pour cela, nous avons supprimé le Ca²⁺ extracellulaire ou inhibé l'influx calcique via les canaux calciques de type L avec la nifédipine (Figure 59). Dans ces conditions, l'effet inhibiteur du LEF sur la contraction par la PE a persisté, suggérant que celui-ci n'implique pas l'inhibition de l'influx de Ca²⁺. La solution « zéro calcium ou la suppression du Ca²⁺ extracellulaire permet la déplétion des stocks calciques conduisant à une moindre contraction du muscle lisse vasculaire. Ensuite, nous avons utilisé l'acide cyclopiazonique ou CPA, un inhibiteur des pompes calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA), à 10 μM. Il s'agit d'un moyen classique de déplétion des stocks intracellulaires de Ca²⁺, capable d'induire une contraction. De plus, cette déplétion est capable de mobiliser les « SOCE (*store-operated Ca²⁺ entry*). Il s'agit d'un influx capacitif de Ca²⁺ via ces canaux ioniques. L'ajout de CPA suivi de la réintroduction du Ca²⁺ permettra de stimuler le mouvement SOCE et induire une contraction supplémentaire. Dans ces conditions, le CPA a bien provoqué une contraction partielle, avec ou sans la présence de Ca²⁺ extracellulaire. L'effet inhibiteur du LEF a persisté (Figure 59C). En résumé, la modulation des mouvements du Ca²⁺ n'affecte pas l'effet inhibiteur du leflunomide sur la contraction.

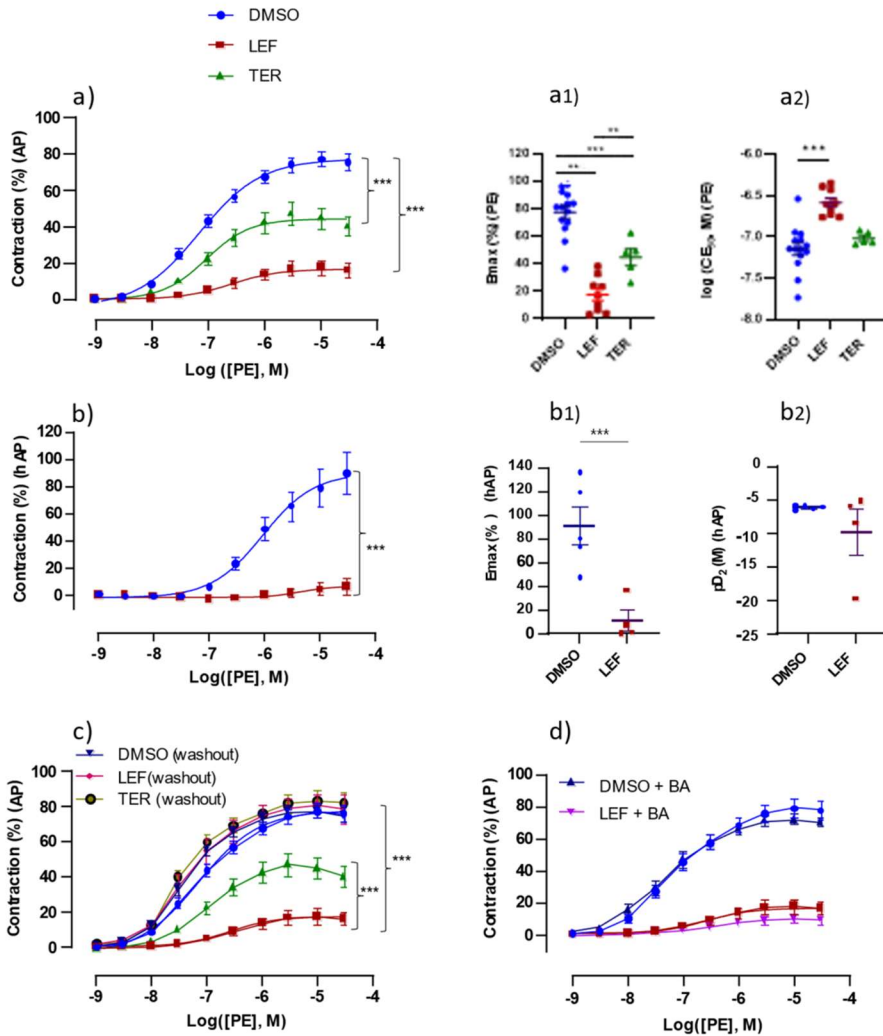


Figure 54. Effet du LEF ou du TER ou du véhicule DMSO dans la réponse contractile des concentrations-réponse de la phényléphrine (PE) dans l'artère pulmonaire de rat (AP) ou humaine (hAP). **a)** Effet de LEF (100 μ M), TER(100 μ M) dans la réponse contractile de l'AP induite par la PE (N= 5-14); **a1)** Evaluation de l'Emax de la réponse contractile de PE dans l'AP ; **a2)** CE₅₀ de la réponse contractile de PE dans l'AP; **b)** Effet de LEF (100 μ M), TER(100 μ M) dans la réponse contractile de l'hAP à la PE(N=5); **b1)** Emax de la réponse contractile de la PE pour l'hAP ; **b2)** pD₂ de la réponse contractile de la PE pour l'hAP ; **c)** Réversibilité de l'effet du LEF/TER dans l'AP (N=5-14). Les légendes (couleurs) correspondant aux différents traitements (LEF, TER et DMSO) sont similaires au a). **d)** Effet de LEF sur la réponse contractile à la PE en présence de l'acide bongkrélique (BA) dans l'AP (N=7-9). (%): les contractions sont exprimées en % relatif à la réponse contractile de la solution K80 obtenue en l'absence de traitement ; DMSO, diméthylsulfoxyde ; Emax, effet maximal ; pD₂, log de CE₅₀; CE₅₀, concentration efficace à 50% ***: P < 0.001, two-way Anova avec la correction de Geisser-Greenhouse pour les doses-réponse ; one-way Anova avec le test de Tukey pour l'Emax et le test de Brown-Forsythe and Welch pour la CE₅₀ ; **: P < 0.05, one-way Anova avec le test de Tukey.

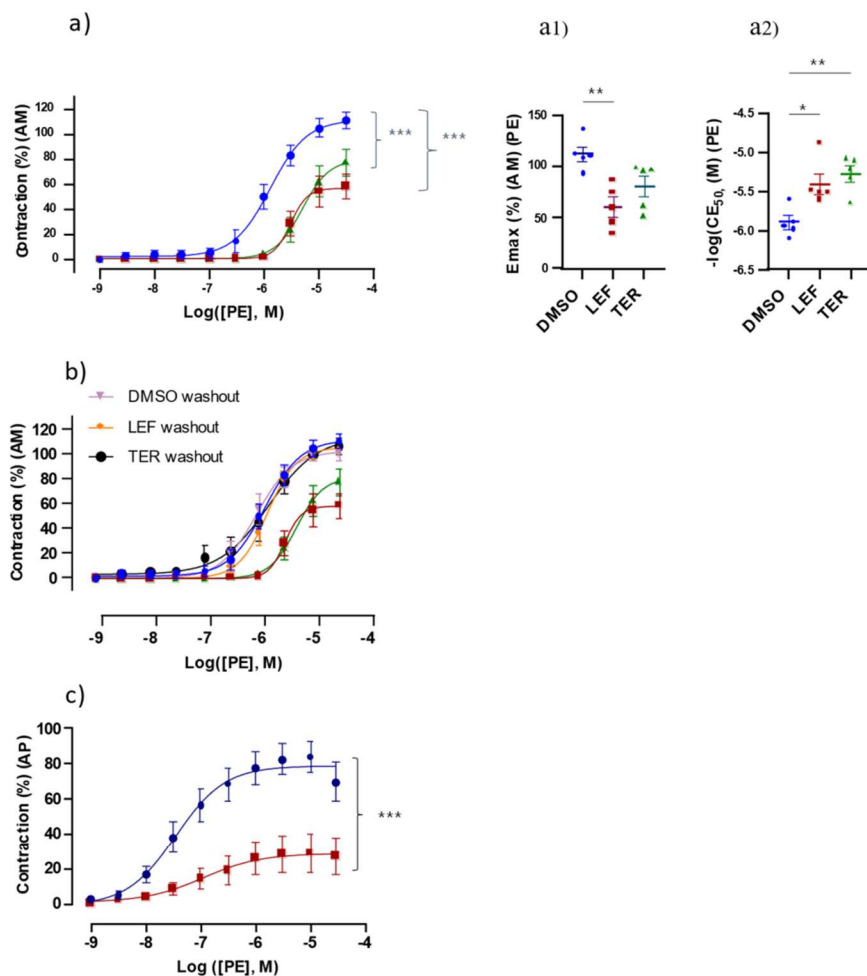


Figure 55. Effet de LEF ou TER dans l'effet contractile des concentrations-réponse de la PE dans l'artère méésentérique de rat(AM). Effet du LEF dans les AP à endo (-).a) Effet de LEF(100 μ M) ou TER(100 μ M) dans la réponse contractile de la PE dans l'AM (N=5); a1) Evaluation de l'Emax de l'effet de LEF(100 μ M), TER(100 μ M) dans la réponse contractile de la PE dans l'AM; a2) CE_{50} de l'effet de LEF(100 μ M), TER(100 μ M) dans la contractile de la PE dans l'AM ; b) Réversibilité de l'effet de LEF(100 μ M) ou TER(100 μ M) dans l'AM (N=5).c) Effet de LEF dans la réponse contractile de la PE dans les AP dont l'endothélium a été mécaniquement lésé (N=4-5). Endo (-), endothélium lésé ; (%), % relatif à la réponse au K80 ; DMSO, dimethylsulfoxyde ; Emax, effet maximal ; CE_{50} , concentration efficace à 50% ; Washout, rinçage ;

***: $P < 0.001$, two-way ANOVA avec le test de Tukey pour l'AM de rat, two-way ANOVA ordinaire pour l'AP ; **: $P < 0.01$, one - way ANOVA avec le test Dunnett; *: $P < 0.05$, one - way ANOVA avec le test de Dunnett.

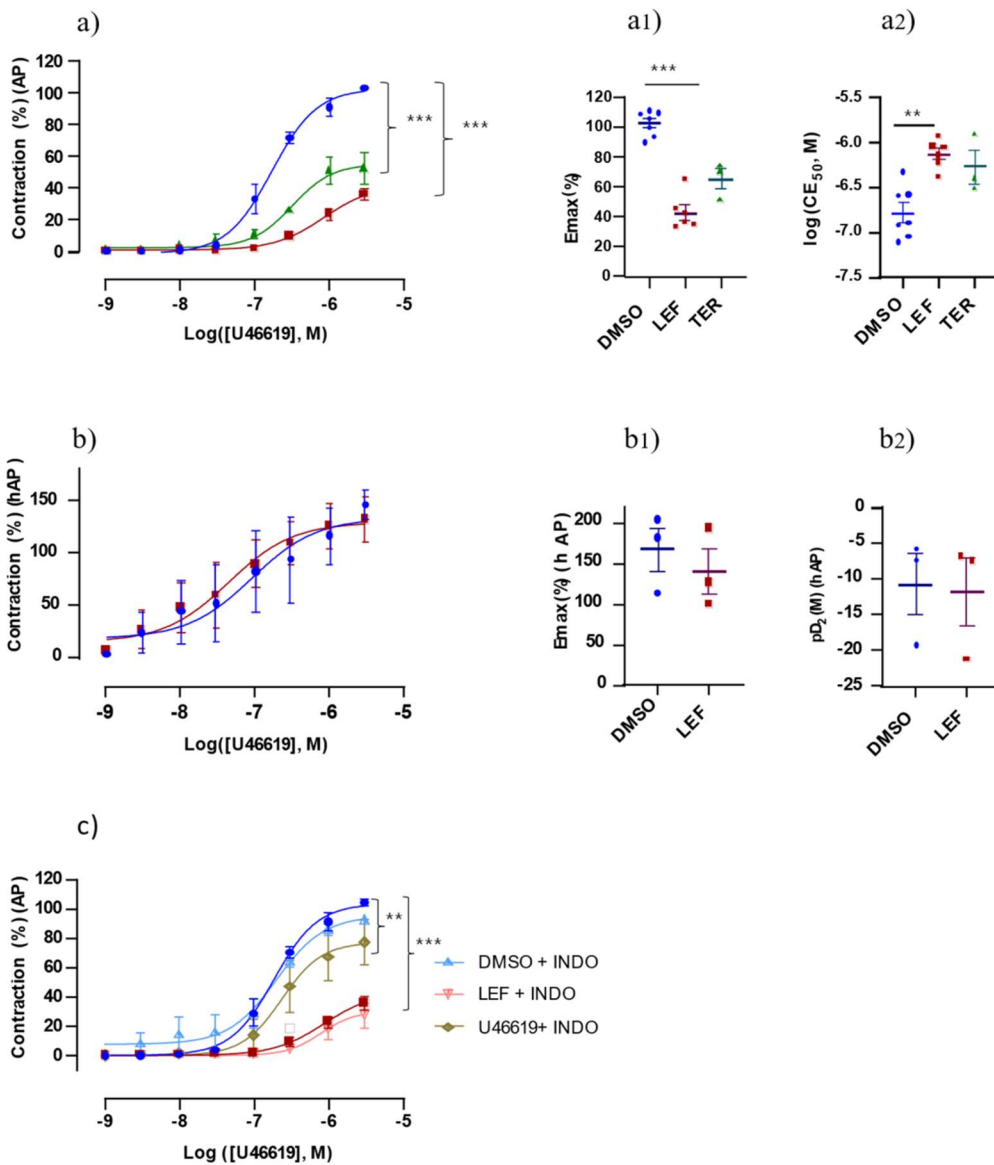


Figure 56. Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile des concentrations-réponse de l'U46619 dans l'AP du rat (AP) ou humaine (hAP). a) Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile de l'U46619 dans l'AP (N=3-7) ; **a1- a2)** Emax et pD₂ de l'Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile de l'U46619 dans l'AP (N=5-6).

b) Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile de l'U46619 dans l'hAP (N=3) ; **c)** Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile de l'U46619 dans l'AP (N= 3-6). (%) : % relatif à la réponse au K80, U46619, mimétique de la thromboxane A₂ ; Emax, effet maximal ; pD₂, log de CE₅₀.

***: P < 0.001, two-way ANOVA avec le test de Dunnett, one-way ANOVA avec le test de Brown- Forsythe et Welch ; **: P < 0.01 two-way-ANOVA, one-way ANOVA pour la CE₅₀.

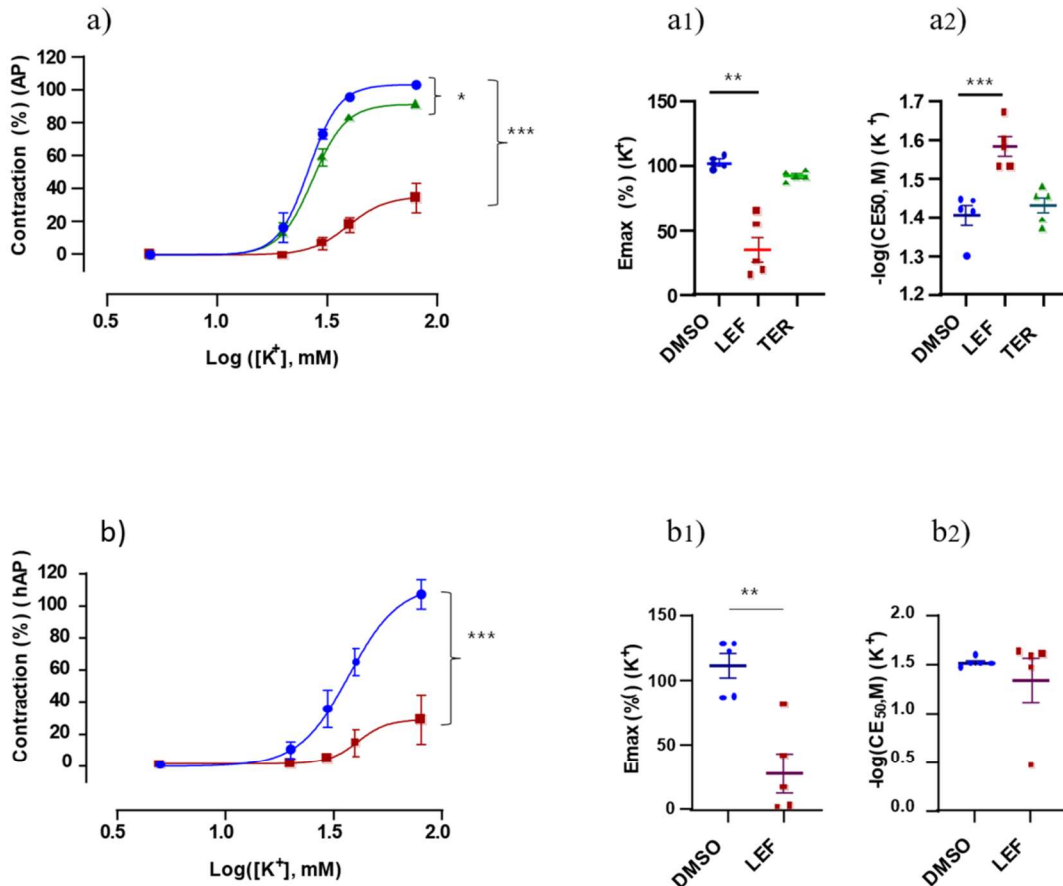


Figure 57. Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile des concentrations-réponse du potassium (K^+) dans l'AP et dans l'hAP. a) Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse contractile induite par le K^+ dans l'AP (N=5); a1-a2) Evaluation de l'Emax et de la CE₅₀ respectivement, de la réponse de K^+ dans l'AP; b) Effet de LEF (100 μ M) ou TER (100 μ M) dans la réponse dépolarisante du K^+ dans l'hAP (N=5); b1-b2) Evaluation de l'Emax et la CE₅₀ respectivement, de la réponse de K^+ dans l'hAP. (%) : % relatif à la réponse au K80 ; [K⁺], solution dépolarisante de potassium ; Emax, effet maximal ; CE₅₀, concentration efficace à 50% ;

***: $P < 0.001$, two-way ANOVA avec le test de Geisser-Greenhouse pour les doses-réponse ou one-way ANOVA avec le test de Tukey pour l'Emax ; **: $P < 0.01$ one-way ANOVA avec le test de Kruskal-Wallis; *: $P < 0.05$, two-way ANOVA avec le test de Geisser-Greenhouse.

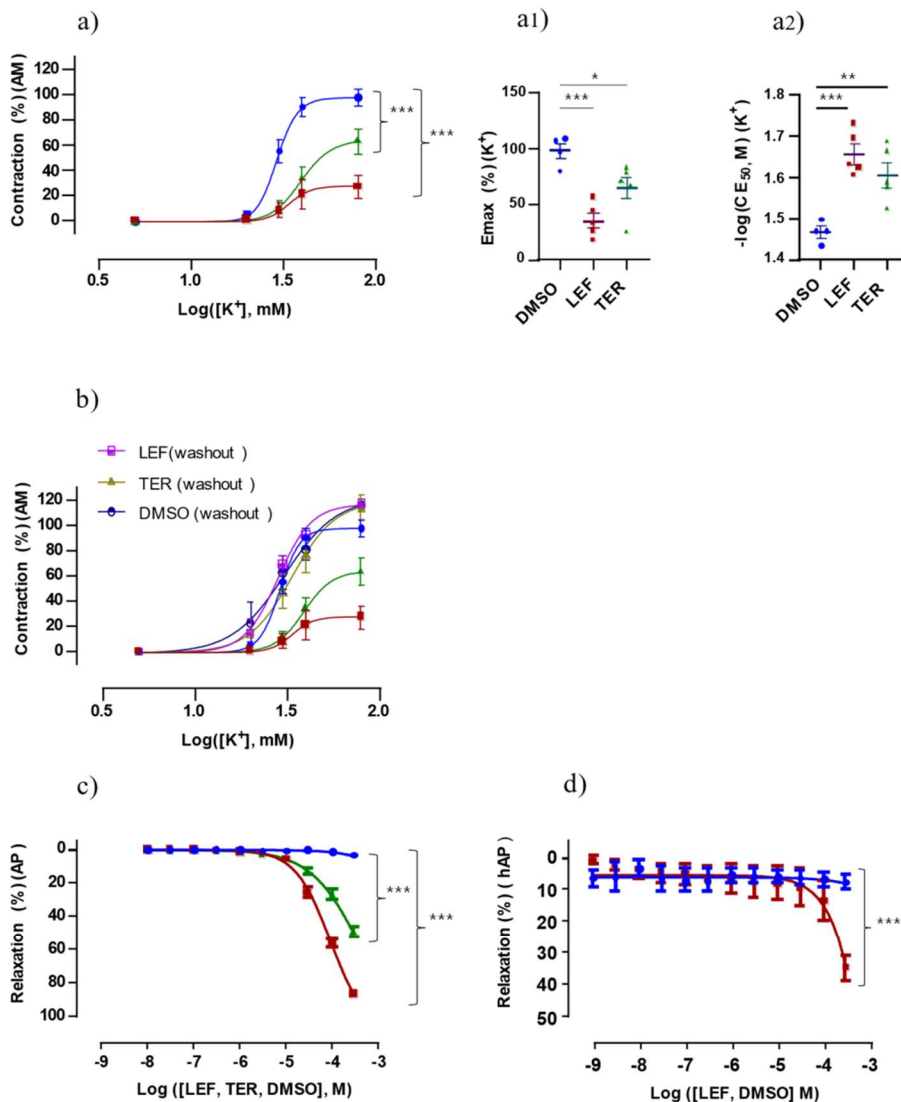


Figure 58. Effet de LEF ou TER dans la réponse contractile des concentrations-réponse au potassium (K⁺) dans l'AM. Effet relaxant du LEF ou TER dans l'AP pré-contractée à l'U46619 dans l'AP et l'hAP. a) Effet de LEF (100 μM) ou TER (100 μM) dans la réponse dépolarisante du K⁺ dans l'AM (N=4-5) ; a1-a2) Evaluation de l'Emax et de la CE₅₀ respectivement, de la réponse de K⁺ dans l'AM (N=4-5). b) Réversibilité de l'effet de LEF (100 μM) ou TER (100 μM) dans la réponse contractile au K⁺ dans l'AM (N=3-5) ; c) Relaxation induite par les concentrations-réponse de LEF/TER dans l'AP (N=6-7) ; d) Effet relaxant induit par des doses-réponse de LEF dans l'hAP (N=3-5).(%): % relatif à la réponse au K80 pour les contractions,% relatif à la pré-contraction à l'U46619 pour les relaxations ; washout, rinçage ;

***: P < 0.001, two-way ANOVA avec le test de Geisser-Greenhouse ; pour les concentrations-réponse, one-way ANOVA avec le test de Dunnett pour l'Emax et le test de Sidak pour la CE₅₀ ; **: P < 0.01, one-way ANOVA avec le test de Sidak ; *: P < 0.05, one-way ANOVA avec le test de Dunnett ou le test de Sidak.

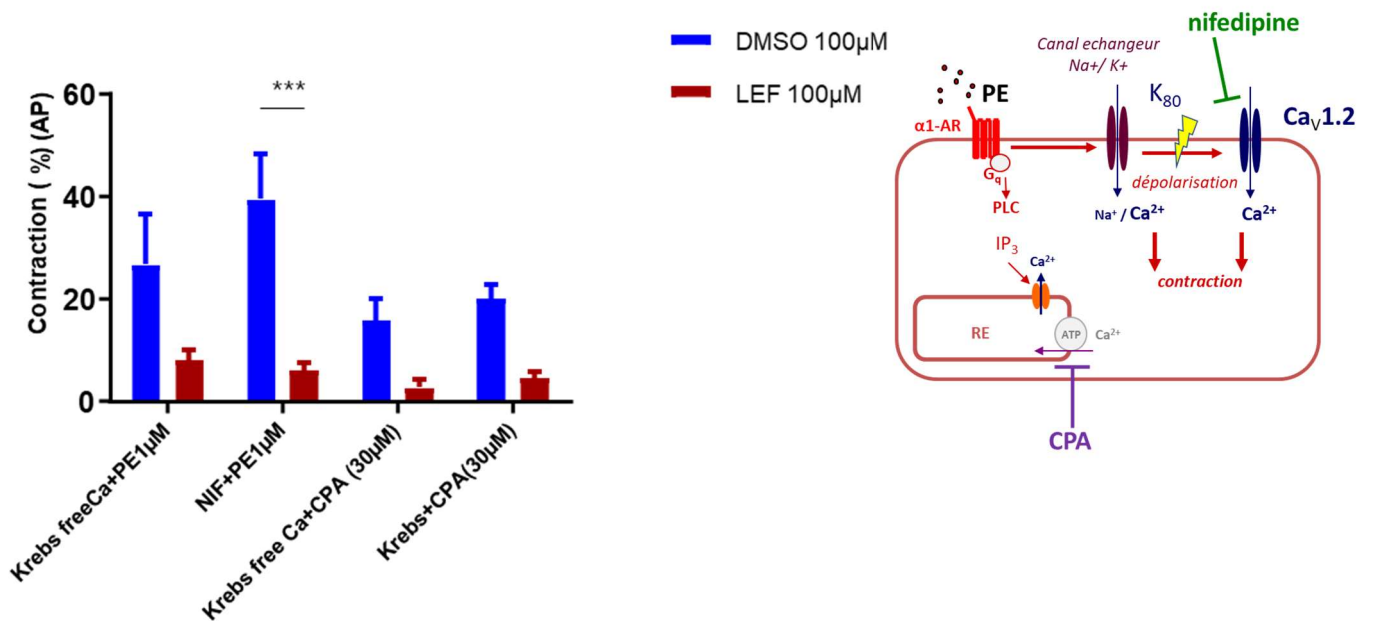


Figure 59. Evaluation de l'effet du LEF sur les mouvements de calcium à l'aide des modulateurs calciques dans l'AP. Contraction induite par la PE (1 µM) ou le CPA (10 µM) en présence de LEF (100 µM) (N=8), avec ou sans calcium extracellulaire, ou en présence de nifédipine (1 µM). CPA, acide cyclopiazonique; NIF, nifédipine; Ca²⁺, calcium ; KREBS free Ca, KREBS à zéro calcium ; **: P < 0.01 test de student.

***: P < 0.001, one-way ANOVA

Ces expériences sont réalisées avec des cellules humaines en culture primaire provenant des APs des biopsies de poumons issues de transplantation. Nous avons opté pour des différentes concentrations croissantes et surtout avoisinant la concentration pertinente de 100 µM. Les absorbances ont été lues à différents temps bien spécifiés. Nous avons constaté que le LEF, à forte concentration, induit une inhibition de la viabilité des CMLs-AP à partir d'une heure de traitement. Nous constatons une inhibition dose dépendante de la viabilité des cellules par le LEF. Ces observations sont aussi similaires avec le TER mais surtout à une durée prolongée, à partir de 24h. (Figure 60).

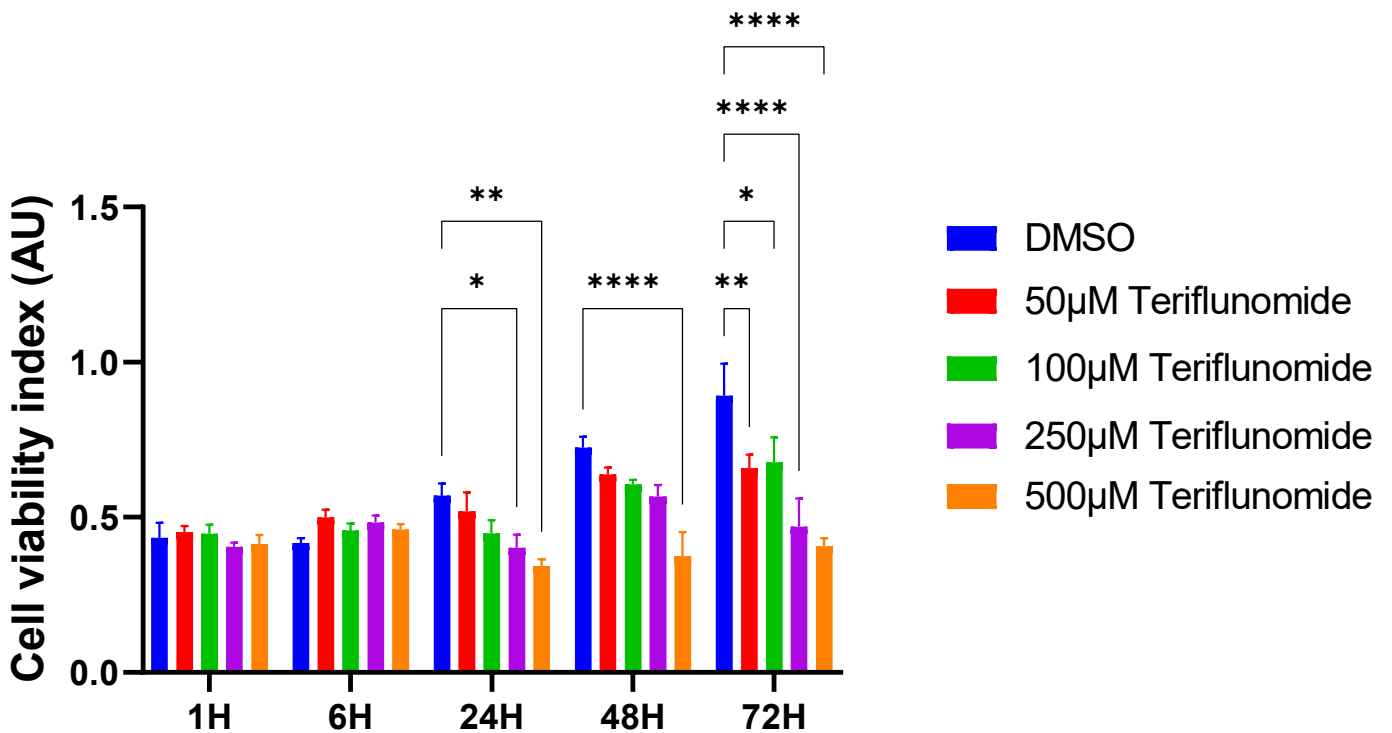
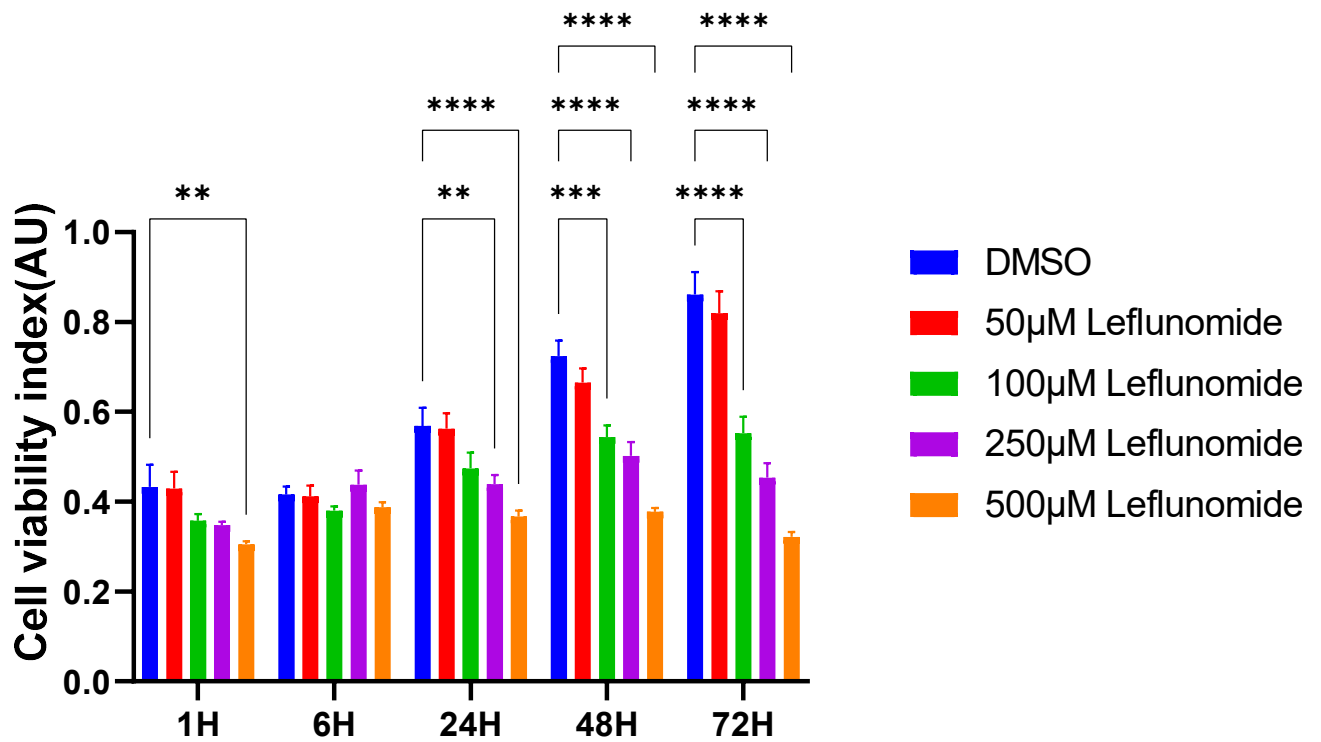


Figure 60. Evaluation de l'effet du LEF, TER sur la viabilité des CMLs-AP par le test de viabilité cellulaire MTS (N=5). a) Test MTS réalisé avec des CMLs-AP traitées avec le LEF ; b) Test MTS réalisé avec des CMLs-AP traitées avec le TER ; ****: $P < 0.001$, two-way ANOVA avec le test de Tukey; **: $P < 0.01$, one-way ANOVA avec le test de Tukey; *: $P < 0.05$, two-way ANOVA avec le test de Tukey.

Evaluation de l'activité proliférative des CMLs-AP en présence de LEF et TER

Nous savons que l'HTAP est principalement caractérisée par la vasoconstriction et le remodelage progressif des artères de petit calibre ou artères de résistance. Le remodelage est induit par la prolifération des CEs, des CMLs-AP et des fibroblastes. Dans ce test BrdU, nous nous sommes concentrés sur les CMLs-AP étant donné que les expériences ex vivo nous ont démontré que l'inhibition du tonus vasculaire induite n'implique pas les CEs ou ne dépend pas de ces dernières.

En effet, ce test nous a permis d'étudier l'effet de LEF sur le profil prolifératif des CMLs-AP traitées avec le LEF et TER. Nous avons observé une diminution dose-dépendante de l'activité proliférative des CMLs-AP traitées avec la prodrogue LEF ou son métabolite actif (Figure 61). Cet effet va dans le même sens que l'inhibition de la contraction et surtout de la viabilité observée précédemment. Le comptage manuel des cellules a permis également de confirmer l'inhibition de la prolifération par le LEF d'une manière dose-dépendante (Figures62).

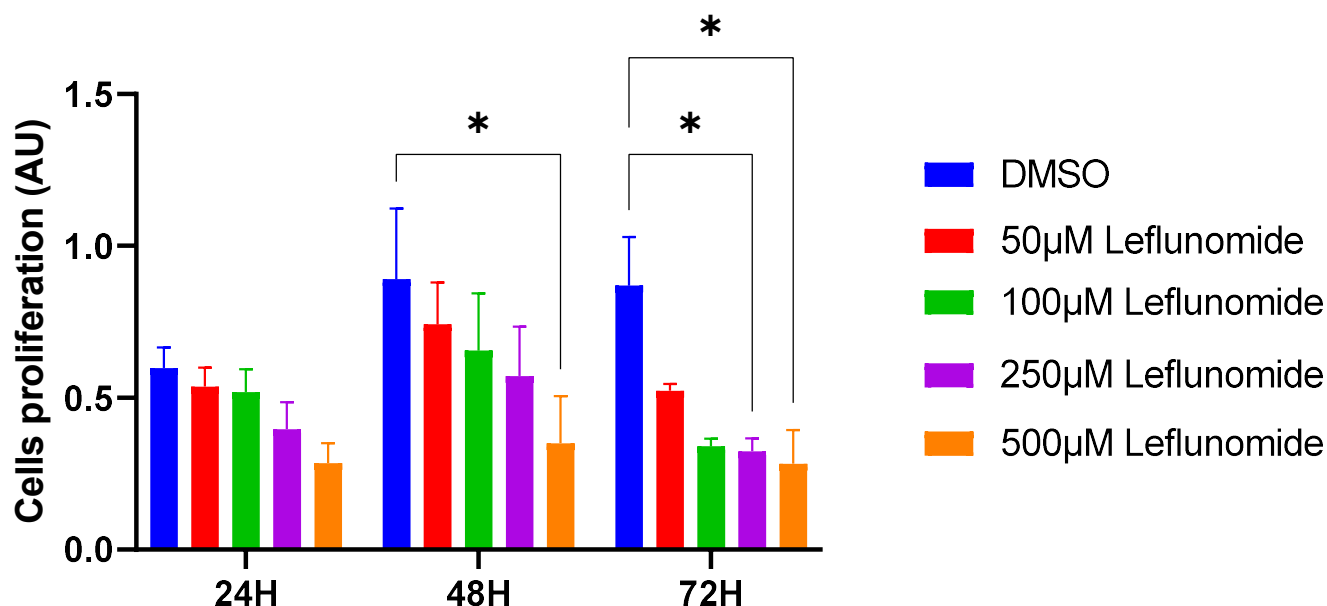


Figure 61 : Effet de LEF sur le profil prolifératif des CMLs-AP évalué avec le test BrdU (N=3)

*: P < 0.05 two-way ANOVA avec le test de Tukey.

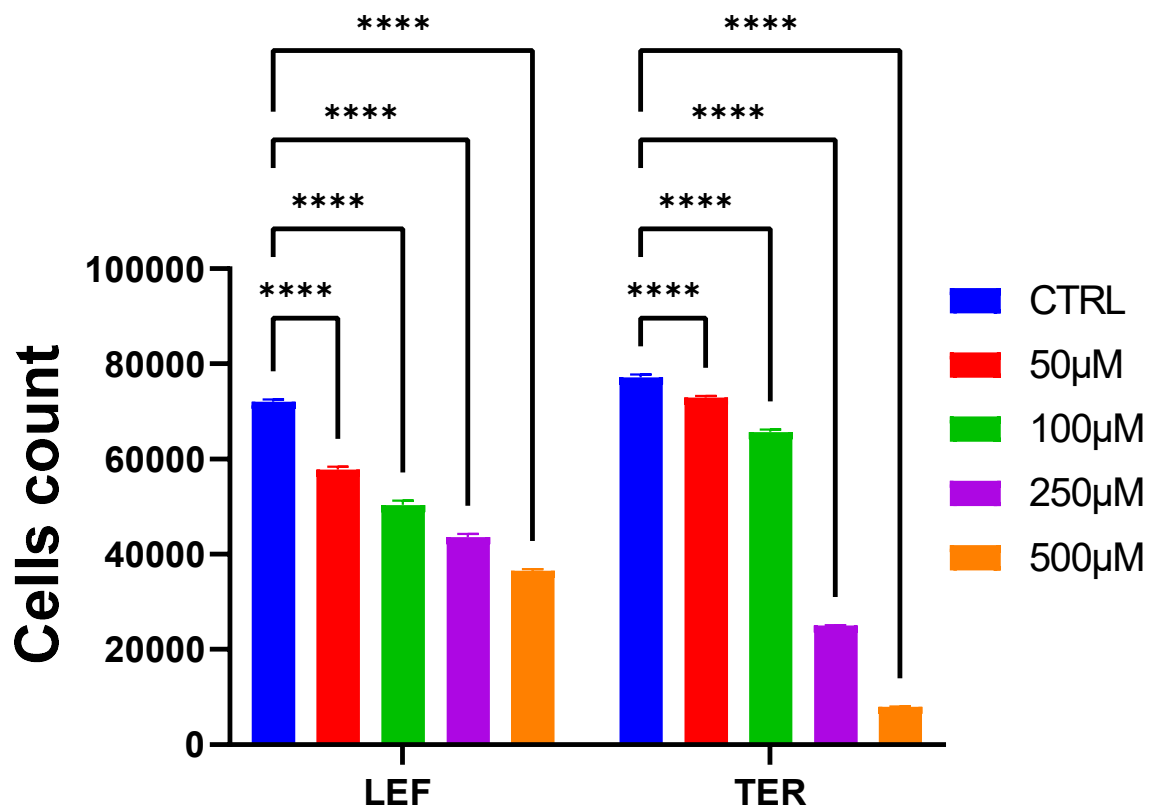


Figure 62 : Evaluation de l'effet de LEF ou TER dans la capacité de prolifération des CMLs-AP par la technique de comptage cellulaire (N=3).

*** : $P < 0.001$ two-way ANOVA avec le test de Sidak

Evaluation de l'effet du LEF sur l'activité kinase de la MLCK

Après avoir testé l'effet de LEF sur l'influx calcique, nous avons poussé l'investigation en regardant les voies sous-jacentes, dépendantes du calcium, impliquées dans le mécanisme de contraction musculaire. Ces expériences sont réalisées en collaboration avec la plateforme CIBLOT située au sein de la faculté de pharmacie à Châtenay-Malabry (IPSIT Université-Paris-Saclay, US31 Inserm, UAR3679 CNRS, D. Courrilleau). Nous nous sommes basés sur l'hypothèse selon laquelle l'effet inhibiteur de la contraction vasculaire pulmonaire pourrait impliquer l'activité de la MLCK, une kinase dont la phosphorylation conditionne la contraction du muscle lisse. Cette kinase joue un rôle central dans la contraction du MLV. Selon nos données, le TER inhibe fortement la MLCK avec une CI_{50} égale à $58,3\mu\text{M}$ (Figure 63). Il est

important de noter que dans ce système enzymatique *in vitro*, le LEF ne présente qu'une faible activité inhibitrice de la MLCK (Figure 63). Cela est conforme avec le fait que, dans ce système acellulaire, le LEF ne peut pas être métabolisé en TER. L'inhibition de la MLCK par le TER, à des concentrations correspondant à celles induisant un effet vasorelaxant au niveau des APs, montre donc une cohérence avec les données obtenues en *ex vivo*.

Dans la même dynamique, nous avons étudié également les effets des inhibiteurs des tyrosines kinases (TKI): imatinib, dasatinib et bosutinib, sur la MLCK. En effet, des études ont montré une association du dasatinib et le bosutinib avec l'HTAP. Nous avons également étudié l'effet d'un autre TKI, qui n'induit pas l'HTAP, l'imatinib sur cette kinase. C'est le bosutinib qui inhibe le plus puissamment l'activité de la MLCK avec une CI_{50} de $0,24\mu\text{M}$ (Figure 64).

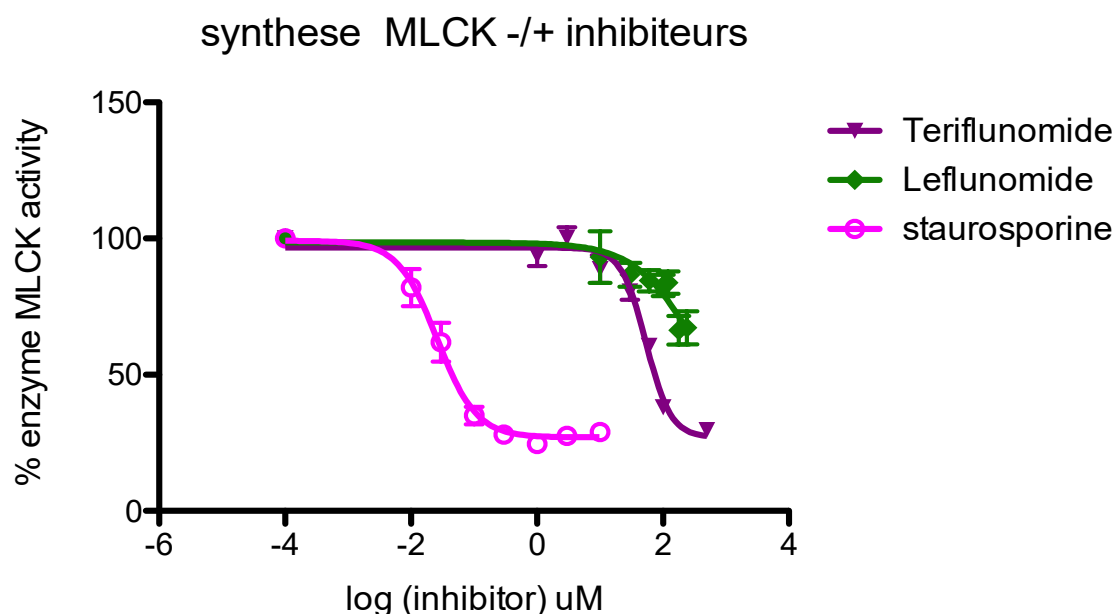


Figure 63. Evaluation de l'effet de LEF ou TER dans l'activité kinase de la protéine MLCK (N=6).

La staurosporine est utilisée comme témoin positif.

CI_{50} (stauro) : $0,02605\ \mu\text{M}$; CI_{50} (LEF) : $306,7\ \mu\text{M}$; CI_{50} (TER) : $53,81\ \mu\text{M}$

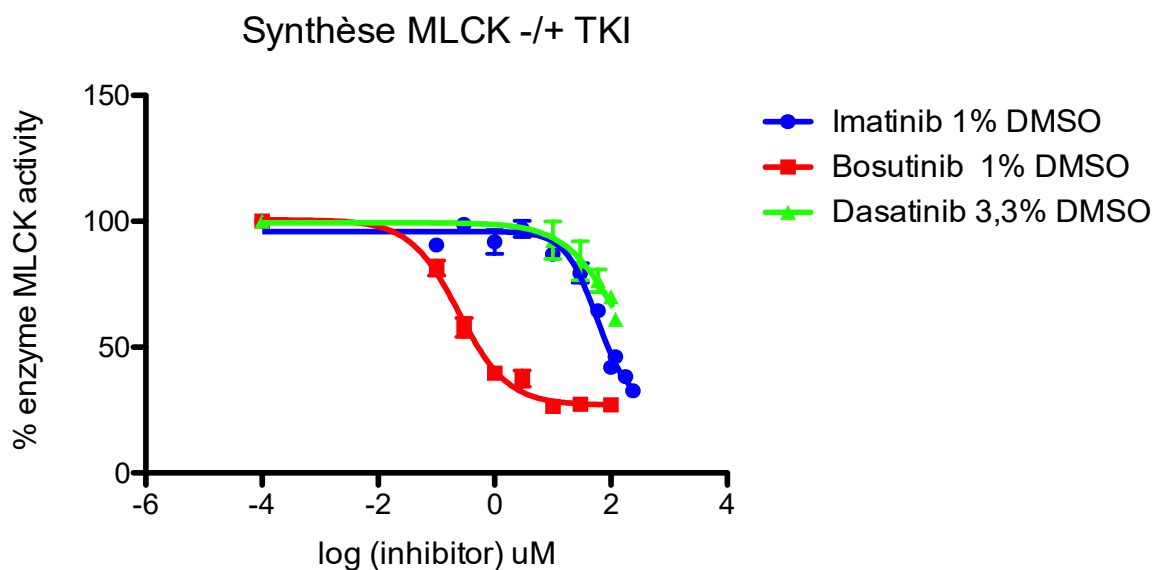


Figure 64 : Synthèse de l'effet des différents inhibiteurs de TKI imatinib, bosutinib et dasatinib sur l'activité kinase de la MLCK. (N=3)

CI₅₀ (Imatinib) : 57,60 μM ; CI₅₀ (Bosutinib) : 0,2432 μM ; CI₅₀ (Dasatinib) : 125,5 μM

Discussion

Cette étude fait suite à une étude réalisée dans notre laboratoire qui s'est appuyée sur des données du réseau français de l'HTP et du programme de pharmacovigilance (VIGIAPATH) et qui avait comme but d'investiguer l'association du traitement immunomodulateur par le LEF, au développement de l'HTAP.

A l'issue des expériences ex vivo de l'évaluation de la réactivité vasculaire pulmonaire d'hAP, d'AP et d'AM de rat, nous avons identifié une inhibition des réponses vaso-contractiles induites par tous les agonistes vasoconstricteurs testés - notamment la phényléphrine (PE), un agoniste alpha-adrénergique, l'U46619, un mimétique du thromboxane A₂, la solution dépolarisante enrichie en K⁺, en présence de la prodrogue LEF, ou de son métabolite actif le TER, utilisés à 100 μM, en comparaison au véhicule qui est le DMSO utilisé en volume équivalent. Nous avons réalisé ces expériences avec des anneaux d'AP humaine et de rat, et d'AM de rat. L'inhibition de la vasoconstriction par la prodrogue LEF et son métabolite constitue un résultat paradoxal par rapport à l'architecture classique de l'HTAP. Dans la littérature relative

à l'HTAP, cette pathologie est décrite comme étant multifactorielle, et les mécanismes impliqués dans sa physiopathologie sont multiples. L'HTAP est caractérisée par, entre autres, une vasoconstriction des APs, particulièrement les APs distales ; une prolifération des cellules vasculaires pulmonaires : CMLs-AP, les CEs et les fibroblastes ; une migration des CMLs-AP et des CEs vers les tuniques vasculaires sous-jacentes et l'infiltration des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire pulmonaire. L'ensemble de ces mécanismes conduit au remodelage vasculaire pulmonaire. Dans certaines études, il a été démontré que ces anomalies peuvent induire une calcification au niveau des vaisseaux pulmonaires caractérisée par un dépôt de phosphate de calcium dans les zones périvasculaires¹⁴¹. Dans notre étude, nous avons obtenus des données paradoxales en ce qui concerne la pathogénèse de l'HTAP. Les données concernant la réactivité vasculaire des APs et des hAPs contredisent les effets classiques de l'HTAP au niveau du tonus vasculaire pulmonaire. L'inhibition de la contraction des vaisseaux pulmonaires par le LEF ne semble pas impliquer une dysfonction endothéliale (DE) (Figures 54,56 et 57). Or nous savons que la DE constitue l'un des mécanismes clés de la pathogénèse de l'HTAP. Nous avons, de ce fait, exploré les voies de signalisation relatives à la contractilité de la CMLs-AP, notamment la voie MLCK/MLC₂₀ et nous avons constaté que cette voie est inhibée in vitro par le TER, métabolite actif du LEF, à des concentrations proches de celle utilisée dans les expériences ex vivo sur vaisseau isolé (100µM). Ceci nous a confirmé que ce traitement immunosuppresseur altère les voies de signalisation impliquées dans la contractilité des cellules vasculaires pulmonaires.

Cet effet iatrogène du LEF dans l'HTAP est cependant contradictoire par rapport à la physiopathologie connue de cette pathologie rare et sévère. Pour comprendre cet effet inhibiteur de la contraction vasculaire pulmonaire qui, classiquement, n'est pas impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP, nous avons poussé notre investigation en étudiant l'effet du traitement LEF sur une voie clé de la contraction vasculaire pulmonaire, l'influx calcique ou les mouvements calciques en général. Le calcium (Ca²⁺) constitue, en effet, une voie de signalisation importante dans la contractilité de tous les vaisseaux notamment les APs.¹⁴² La contraction des APs est aussi inhibée en par l'effet de LEF quel que soit le modulateur calcique utilisé (mobilisation du

calcium intracellulaire, SOCE, inhibiteur des canaux calciques de type L) (Figure 59). Nous n'avons pas eu l'occasion d'étudier les effets du LEF et son métabolite sur la dynamique de la concentration intracellulaire de Ca^{2+} . Cela pourrait être envisagé en utilisant une sonde fluorescente sensible au Ca^{2+} telle que le Fura2, chargée au préalable dans des CMLs-AP en culture. Les variations de fluorescence observées au microscope traduisent alors les variations de concentration cytosolique de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Cette approche permettrait ainsi de visualiser et mesurer directement si le traitement par le LEF et le TER diminue l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ produite par des agonistes vasoconstricteurs. De manière intéressante, il a été rapporté que le LEF et le TER inhibent l'entrée de Ca^{2+} de type SOCE dans un autre modèle cellulaire¹³⁷. Néanmoins, nos mesures, certes indirectes, via la contractilité, indiquent que l'effet inhibiteur du LEF persiste en l'absence de Ca^{2+} extracellulaire ou en présence de nifédipine, une dihydropyridine inhibitrice des canaux calciques de type L. Ce résultat nous permettrait d'affirmer que, même s'il existait un effet inhibiteur du LEF sur ces canaux ou même sur l'influx calcique causé par les SOCE, celui-ci ne serait pas indispensable à l'effet inhibiteur de la contraction (Figure 59). De plus, l'activité des kinases, impliquées dans la contraction du muscle lisse, calcium-dépendante notamment MLCK / MLC₂₀, et calcium-indépendante, ROCK et ERK, est significativement inhibée par cette drogue LEF. Bien que, dans certaines expériences, ces kinases soient étudiées dans un système acellulaire (enzymatique) l'effet du TER est bien apparent avec CI_{50} égale à 5 nM (Collaboration Eurofins) (CI_{50} égale à 53,81 nM, collaboration CIBLOT Figure 63).

Le LEF, via son métabolite actif TER, est connu pour ses effets thérapeutiques impliqués dans le blocage de l'enzyme DHODH. Cela lui confère une action inhibitrice de la prolifération des lymphocytes dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde et d'autres maladies auto-immunes. Ses effets inhibiteurs de la prolifération cellulaire semblent ne pas se limiter seulement sur ces cellules immunitaires, mais ils se propagent sur d'autres types cellulaires.¹³⁵ Nous avons observé les mêmes effets inhibiteurs dans les CMLs-AP (Figures 61, 62). Le LEF inhibe la prolifération induite par le PDGF avec une régulation en baisse de la voie ERK/ MAPK et Akt /m TOR (résultats non présentés dans ce manuscrit, se référer à

l'article associé). En revanche la voie Smad 1/5/8 est surexprimée en présence de LEF. Ces résultats ne mettent pas en lumière non plus l'association de ce traitement à l'HTAP ; l'HTAP induit une prolifération excessive des cellules vasculaires pulmonaires. Des voies de signalisations de la prolifération des CMLs-AP sont significativement inhibées. Des effets cytotoxiques concentration-dépendants sont observés pour ce traitement aussi bien au niveau des CEs¹²⁶ que des CMLs-AP. Ces effets cytotoxiques ont été démontrés dans différents types de cellules hépatiques dont HepG2 traitées avec LEF et TER.¹²⁹

Le LEF induit des effets inhibiteurs du profil migratoire des CMLs-AP ; la migration cellulaire qui est un des mécanismes caractéristiques de l'HTAP (résultats non présentés dans ce manuscrit, se référer à l'article associé). Cet effet inhibiteur de la migration cellulaire a été mise en évidence avec d'autres types cellulaires notamment les cellules sanguines où LEF inhibe la migration trans-endothéliale de ces dernières.¹³⁶ Le LEF inhibe la fonction de protéine BMPRII. La voie BMPRII est une des voies bien connues impliquées dans la pathogénèse de l'HTAP. Des mutations du gène *BMPRII* ont été identifiées dans 75% des formes héréditaires et 25% des HTAPi.⁸⁶ Ces mutations *BMPRII*, perte de fonction du récepteur BMPRII, sont régulées en baisse dans l'HTAP. Bien que la pénétrance soit incomplète, les formes héréditaires d'HTAP avec les mutations de ces gènes sont bien représentées. Dans le système acellulaire, le TER, à des doses thérapeutiques, inhibe la protéine BMPRII (Collaboration avec Eurofins). Ce résultat est cohérent avec l'association de ce traitement à l'HTAP (résultats non présentés dans ce manuscrit, se référer à l'article associé).

L'inflammation constitue également un mécanisme impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP. Les données que nous avons obtenues dans les CMLs-AP, traitées avec le LEF et le TNF- α , démontrent un effet inhibiteur en présence du facteur de transcription impliqué dans l'inflammation NF- κ B, et en présence des cytokines pro-inflammatoires, IL1 β , IL6. Ainsi, le LEF a présenté des effets inhibiteurs dans la signalisation de protéines impliquées dans la réponse inflammatoire, des effets qui n'expliquent pas l'association de ce traitement à l'HTAP. Nos données montrent que le LEF n'induit pas une apoptose caspase-dépendante non plus.

A fortes doses, le LEF induit des effets inhibiteurs de tyrosines kinases (TKI) notamment celles présentes au niveau des récepteurs de facteur de croissance PDGF (platelet derived growth factor). Or récemment, les travaux de Guinabert et al, ont montré que le dasatinib, un médicament utilisé dans le traitement de la leucémie myéloïde chronique, avec des effets TKI, est associé au développement de l'HTAP. Parmi les effets de cette drogue impliqués dans l'HTAP, l'augmentation de la perméabilité de la barrière endothéliale a été identifiée.¹⁴³ L'endothélium, non seulement joue un rôle de régulateur en sécrétant des facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs impliqués dans la réactivité vasculaire et l'équilibre de la fonction endothéliale, mais aussi constitue une véritable barrière aux cellules inflammatoires qui pourraient s'infiltrer dans la paroi vasculaire et perturber son homéostasie. Ainsi, l'ouverture de la barrière endothéliale, soit par l'apoptose des CE ou par la perte des jonctions inter-CE, est aussi un mécanisme impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP. Le LEF n'aurait pas un effet sur la perméabilité de la barrière endothéliale.

Par ailleurs, les effets inhibiteurs de l'activité kinase de MLCK ne sont pas observés avec tous les TKI. Le dasatinib ne semble pas avoir d'effet sur la MLCK. En revanche, le bosutinib inhibe d'une manière très puissante l'activité kinase de la MLCK avec une CI_{50} égale à 0,2432 nM (Figure 64).

Nous avons aussi mis en évidence un effet de stress du RE induit par le LEF dans les CMLs-AP; des études ont montré un effet de stress du RE induit par cette drogue au niveau des hépatocytes.¹³¹ La voie de IRE 1α -ATF4 est régulée à la hausse par le LEF, à une concentration de 100 μ M, qui représente la concentration pertinente, mesurée dans les taux plasmatiques des patients traités avec cette drogue.

Selon des études réalisées par Ruffenach et al, la prolifération excessive des CMLs-AP caractéristiques de l'HTAP s'accompagne d'une sous expression du microARN, Mir-204. Or, au niveau systémique, la régulation en baisse de la Mir-204 promeut une biominéralisation vasculaire par une surexpression du facteur de transcription RUNX2 (Runt-related transcription factor 2). Ainsi la surexpression de RUNX2 dans les cellules et tissus vasculaires pulmonaires indiquerait une signature d'HTAP bien que les mécanismes impliqués restent à élucider. Les données obtenues ont démontré un dépôt de phosphate de

Ca²⁺ au niveau périvasculaire à l'aide d'un marqueur, l'alkaline phosphatase (marquage au trichrome de Masson), dans une analyse immunohistochimique des tissus vasculaires.¹⁴¹ Nous avons envisagé des études pour explorer ces mécanismes chez des modèles de souris traités au LEF ou TER.

DISCUSSION GENERALE

Durant ma thèse, nous avons étudié la physiopathologie de deux formes d'HTP, notamment une forme héritable, la MVOP et une forme induite par une drogue, le LEF. Ces deux formes d'HTP, présentent des étiologies différentes de l'HTP. L'HTAP héritable est plus fréquente que l'HTAP induite par les drogues. C'est en 2014 que les mutations bialléliques perte de fonction de *EIF2AK4*^{-/-} sont identifiées en tant que cause héritable de la MVOP. Cette maladie a une pénétrance quasi-complète et autosomale récessive. La détection de ces mutations permet d'établir un diagnostic précis de la MVOP sans pour autant avoir recours aux biopsies pulmonaires trop risquées pour le patient. Les mécanismes physiopathologiques pour cette pathologies sont moins connus et sont à élucider. Le modèle expérimental KO *Gcn2* constitue une piste pour mieux explorer les mécanismes impliqués dans la MVOP. Cependant, les modèles KO *Gcn2* qui sont disponibles ne développent pas spontanément la maladie dans les conditions basales du laboratoire. Cette contrainte a constitué une limite dans notre étude qui consistait à explorer le rôle de la protéine GCN2 dans le tonus vasculaire pulmonaire en se focalisant à la voie de NO-GMPc chez ces rats transgéniques. Ces animaux mutés, ne développant pas de phénotype MVOP, n'ont pas présenté une différence significative dans la réactivité vasculaire pulmonaire en comparaison aux WT. Cependant, une diminution de l'expression de l'enzyme eNOS a été identifiée chez les rats KO *Gcn2* stimulés avec l'ASNase, un inducteur de carence en acides aminés. Il a fallu « challenger » plusieurs options (déprivation de différents acides aminés, utilisation d'adénovirus) pour aboutir à la carence en asparagine et glutamine par la stimulation à l'aide de l'ASNase et obtenir un phénotype de ces rats mutés caractérisé par une perte significative de poids dans les trois (3) jours et une mortalité dans les cinq (5) jours. Les animaux perdent du poids et expriment des marqueurs de l'inflammation et de l'apoptose et s'ensuit le décès de l'animal 5 jours après l'injection de la PEG ASNase à l'animal. La création d'un modèle de la maladie à moyen et long terme permettra de mieux sonder les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la MVOP héritable voire sporadique. Les patients atteints de MVOP sporadique présentent, dans 25% de cas, des mutations bi- alléliques de *EIF2AK4*^{-/-}. Les mutations bialléliques perte de fonction du gène *EIF2AK4* jouent un rôle critique dans la pathogénèse de la MVOP.

Les données issues du projet 1 concernant la caractérisation des rats KO *Gcn2*, en condition basale du laboratoire, démontrent non seulement la complexité des mécanismes impliqués dans la pathogénèse de l'HTP mais aussi le côté multifactoriel de cette pathologie. L'absence de phénotype chez ces rats mutés en condition basale renforce l'hypothèse multi-hits de la maladie. Les patients MVOP héréditaires sont plus jeunes au moment du diagnostic (26,7 ans en comparaison avec 44,3 ans pour les HTAPh¹⁴⁴), avec une pénétrance quasi-totale, ce qui n'est pas le cas chez le modèle animal auquel la mutation de *Eif2ak4* ne suffit pas pour développer la maladie. Selon les données du laboratoire U1166 avec lequel nous avons mené cette étude en étroite collaboration, une population de lymphocytes T exprimant TLAG3 a été trouvée présente uniquement chez les rats KO *Eif2ak4* en condition basale. Ce qui montre que la signature inflammatoire est présente avant même que ces rats mutés soient soumis à la stimulation à l'ASNase. La déprivation en acides aminés, induit par l'ASNase représente un « second'hit » permettant le phénotype inflammatoire avec l'expression de gènes et des protéines impliqués dans les mécanismes clés de l'inflammation périvasculaire notamment les neutrophiles, monocytes et plasmocytes et les molécules sécrétées par ces acteurs de l'inflammation comme la calprotectine et l'expression des gènes associés. Ces données nous mènent à penser que l'absence de GCN2 favorise une réaction inflammatoire exagérée lors d'un stress métabolique et peut-être dans d'autres conditions comme l'infection que nous n'avons pas encore étudié. Ce second hit inflammatoire pourrait être le facteur déclenchant l'HTP dans le contexte de déficience en GCN2.

En ce qui concerne, la forme d'HTP induite par un médicament, le LEF, un immunomodulateur prescrit principalement dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde, notre étude a abouti à beaucoup de données paradoxales par rapport à l'architecture physiopathologique classique de l'HTP ayant été élucidée jusqu'à ce jour. Les effets inhibiteurs du LEF ou son métabolite sur l'activité des kinases MLCK, ROCK pourraient expliquer les propriétés inhibitrices de ce traitement au niveau de la contraction vasculaire des artères isolées. Les effets de cette prodrogue sur le Ca²⁺ intracellulaire restent à déterminer bien que nous ayons réalisé des expériences avec des modulateurs des mouvements calciques au niveau cytosolique qui n'ont

pas présenté une différence statistiquement significative des APs traitées avec du LEF/TER en comparaison avec les APs pré-incubées dans le véhicule DMSO.

Le LEF induit des effets contradictoires quant aux composants connus et bien étudiés de la physiopathologie de l'HTAP notamment la contractilité des CMLs-AP, la prolifération excessive des cellules vasculaires (CE, CMLs-AP), la migration des cellules vasculaires et l'infiltration des cellules inflammatoires dans la paroi vasculaire induisant une inflammation périvasculaire.

Cependant, le LEF induit une inhibition de l'activité de la protéine BMPRII. Or nous savons que les mutations du gène *BMPRII*, entraînent une réduction de la protéine BMPRII. Or 70 à 80% de cas d'HTAP héritable et 10 à 20% des cas d'HTAPi portent des mutations perte de fonction de du gène *BMPRII*. Ainsi, nous pouvons suggérer que l'effet inhibiteur de la fonction de BMPRII induit par le LEF, via son métabolite actif TER, donne une explication à l'association de ce traitement au développement de l'HTAP.

Par ailleurs, dans les données fournies par le registre français de l'HTAP, associant le LEF à l'HTAP, seuls 20% de cas reportés dans l'étude et ne présentant pas d'autres facteurs de risque d'HTAP, ont présenté une diminution des RVP à l'arrêt du traitement LEF. Ce qui pourrait suggérer à une prédisposition génétique ou un facteur intrinsèque ou un stress environnemental qui serait favorable au développement de l'HTAP chez les patients avec un traitement LEF. Bien que le pourcentage de patients atteints d'HTAP par l'effet iatrogène de ce traitement paraît plus faible, mais la toxicité induite par cette thérapie est bien démontrée. Ce qui suggère des investigations beaucoup plus approfondies pour comprendre les mécanismes impliqués afin de permettre aux cliniciens d'élargir leur champ de diagnostic dans la prise en charge de ces patients atteints de polyarthrite rhumatoïde et aussi des patients atteints d'HTAP.

Limites de l'étude

Durant ma thèse, j'ai réalisé des travaux de recherche qui étaient plus axés sur l'étude de la réactivité vasculaire pulmonaire et sur l'étude de la mécanistique et des voies de signalisation associées.

La technique du myographe est une approche adaptée pour l'étude de la réactivité vasculaire. Les réponses observées constituent une intégration de plusieurs mécanismes actifs dans les cellules musculaires lisses vasculaires, mais aussi dans les cellules endothéliales. Cette méthode *ex vivo* est adaptée pour la mise en évidence des propriétés intrinsèques des tissus vasculaires et l'étude du rôle de l'endothélium (via la possibilité de dénudation endothéliale). Cependant, ce système présente aussi des limites par rapport aux conditions expérimentales notamment :

- La difficulté d'étudier les artères de petit calibre ; plus le vaisseau est petit, plus il est difficile de l'exploiter car son montage délicat peut aboutir à une détérioration fonctionnelle de l'endothélium, voire de muscle lisse. Or l'HTAP implique surtout les vaisseaux de résistance de petit calibre $\leq 500\mu\text{m}$.¹⁴⁵

-En utilisant cette méthode *ex vivo*, nous avons entrepris d'étudier les mouvements calciques afin d'examiner si les effets du LEF et du TER sont dépendants du Ca^{2+} extra et intracellulaire, un facteur clé de la vasoconstriction. Cependant, cette approche ne permet qu'une évaluation indirecte du rôle du calcium. Un examen plus précis pourrait être conduit par l'observation des concentrations intracellulaires de calcium par mesure de la fluorescence de sondes calciques telles que le Fura-2, ou bien par l'activité des canaux calciques par la technique du patch-clamp sur cellules musculaires lisses isolées. Ainsi, l'influence des médicaments sur les mouvements calciques pourrait être démontrée plus directement. Nous avons entrepris de réaliser des expériences de mesure du signal calcique sur des CML humaines en plaque 96 puits, avec la plateforme CIBLOT de l'IPSIT (Université Paris-Saclay), mais nous n'avons pas réussi à optimiser la technique.

- La tension de maintien utilisée dans les conditions expérimentales (30 mm Hg, correspondant à une condition « pathologique ») ne correspond pas aux paramètres hémodynamiques physiologiques normaux. Il est effectivement possible d'utiliser une tension de 15 mm Hg¹⁴⁵(physiologique) pour induire une force stimulante au niveau des anneaux. Il a cependant été rapporté que la réponse contractile des APs est optimale à 30 mmHg. Comme nous avons travaillé à une circonférence « C1 » de 90% de la circonférence

C₃₀ mmHg, la tension était donc intermédiaire. Ces conditions étaient les mêmes que celles utilisées dans de précédents travaux réalisés au laboratoire. ¹⁴⁶

- Les conditions expérimentales de gazéification des cuves (95% O₂ et 5% CO₂) sont contraires aux conditions de ventilation tissulaire normales. Cependant, la solution physiologique de KREBS utilisée contient du tampon bicarbonate (HCO₃⁻) qui réagit avec l'excès de gaz carbonique, permettant d'ajuster la solution de KREBS à un pH physiologique (pH=7,4). L'oxygène maintenu à 95% permet d'assurer une non-privation d'O₂ aux vaisseaux durant l'expérience.

CONCLUSION

Au terme de trois années de thèse, nous avons pu étudier deux projets qui concernent, principalement, l'étude de la réactivité vasculaire des vaisseaux pulmonaires particulièrement les APs. Le premier projet est axé à la MVOP, une forme rare et héritable de l'HTP et le deuxième concerne une étude d'une association d'un traitement immunomodulateur, le LEF, au développement de l'HTAP. Pour le projet 1, nous n'avons pas pu pousser les travaux de recherche vu que les données obtenues, sur la réactivité vasculaire, n'ont pas donné des résultats statistiquement significatifs. Seules les données de la biologie moléculaire obtenues nous ont confirmés une partie de notre hypothèse qui est que GCN2 régule l'expression de l'enzyme endothéliale, eNOS. Cette hypothèse a été vérifiée à l'aide de modèles expérimentaux ayant développé la maladie d'une façon aigue avec une stimulation à l'ASNase. La création des modèles à moyen et long terme facilitera la recherche en vue d'une élucidation des mécanismes liés à la physiopathologie de la MVOP héritable.

Le projet 2 a donné des résultats paradoxaux par rapport à l'étiologie connue de l'HTP, notamment sur la contractilité des vaisseaux pulmonaires, le profil pro-prolifératif des cellules vasculaires pulmonaires, leur capacité à migrer vers les différentes tuniques vasculaires pulmonaires et l'inflammation. Ces résultats restent contradictoires quant à la pathogénèse de l'HTAP, quoique certaines données relatives à ce projet nous ont fournis des réponses à la question posée dans l'hypothèse de l'étude. Ce projet ouvre la voie à d'autres recherches afin de mieux comprendre les effets de LEF impliqués directement à l'HTAP.

PERSPECTIVES

La MVOP est caractérisée par un remodelage vasculaire pulmonaire qui est causé par des mutations du gène *EIF2AK4* pour les formes héritables. Cette maladie rare présente un pronostic sombre ; or les mécanismes impliqués dans sa physiopathologie restent, pour la plupart, inconnus. Pour une mise en lumière des mécanismes impliqués dans l'évolution de cette maladie, des modèles expérimentaux pertinents ouvriraient la porte à une meilleure compréhension de sa physiopathologie.

Dans notre étude de caractérisation des rats KO *Eif2ak4* en condition stimulée par l'ASNase, non seulement un phénotype a été obtenu avec l'expression différentielle de divers médiateurs ou marqueurs de l'inflammation, mais aussi nous avons confirmé l'une de nos hypothèses initiales. La protéine GCN2 régule l'expression de l'enzyme eNOS qui est un effecteur incontournable de la voie de NO. Comme perspectives, il faudrait vérifier la réactivité vasculaire des artères pulmonaires voire des veines pulmonaires issues des rats mutés exposés à l'ASNase. Il serait plus pertinent aussi d'étudier aussi la réactivité vasculaire des artères et veines pulmonaires issues des biopsies des patients MVOP ayant bénéficié d'une transplantation pulmonaire.

Pour pousser l'investigation concernant le lien de causalité entre traitement immunomodulateur LEF et l'HTAP, il faudrait continuer surtout avec des expériences in vivo pour caractériser la réactivité vasculaire des artères issues des rats traités de façon chronique au LEF. Les résultats que nous avons présentés, sont obtenus d'une manière aigue (30 min de pré-incubation des APs).

Il sera intéressant d'examiner les effets aigus de l'administration de LEF ou de TER in vivo, afin d'évaluer la capacité de ces agents à modifier les pressions artérielles pulmonaires et systémiques. De ces expériences in vivo, nous pourrions déterminer l'effet de cette prodrogue au niveau des paramètres hémodynamiques, notamment les RVP systolique et l'index de Fulton et réaliser des analyses immunohistologiques des tissus pulmonaires. Ces résultats devraient nous confirmer des effets vasodilatateurs et probablement hypotensifs, au niveau vasculaire et systémique, qui seraient probablement compensés par le système sympathique ou le système renine-angiotensine.

REFERENCES

1. Suresh, K. & Shimoda, L. A. Lung Circulation. *ComprPhysiol***6**, 897–943 (2016).
2. Widrich, J. & Shetty, M. Physiology, Pulmonary Vascular Resistance. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, 2021).
3. Holmes, A. P., Ray, C. J., Kumar, P. & Coney, A. M. A student practical to conceptualize the importance of Poiseuille's law and flow control in the cardiovascular system. *Advances in Physiology Education***44**, 436–443 (2020).
4. Clark, A. & Tawhai, M. Pulmonary Vascular Dynamics. in *Comprehensive Physiology* 1081–1100 (John Wiley & Sons, Ltd, 2019). doi:10.1002/cphy.c180033.
5. Townsley, M. I. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries and veins. *ComprPhysiol***2**, 675–709 (2012).
6. Tu, L. Innovation thérapeutique dans la dysfonction endothéliale associée à l'hypertension artérielle pulmonaire. *undefined* (2012).
7. Zeller, M. Système cardiovasculaire: les vaisseaux. 28.
8. Kohler - Le tissu musculaire.pdf.
9. Fattoum, A. Régulation de la contraction du muscle lisse. *Med Sci (Paris)***13**, 777 (1997).
10. Sweeney, H. L. & Hammers, D. W. Muscle Contraction. *Cold Spring Harb Perspect Biol***10**, a023200 (2018).
11. Hirashima, M. & Suda, T. Differentiation of Arterial and Venous Endothelial Cells and Vascular Morphogenesis. *Endothelium***13**, 137–145 (2006).
12. Earley, S. & Brayden, J. E. Transient Receptor Potential Channels in the Vasculature. *Physiol Rev***95**, 645–690 (2015).
13. Meyrelles, S. S., Peotta, V. A., Pereira, T. M. & Vasquez, E. C. Endothelial Dysfunction in the Apolipoprotein E-deficient Mouse: insights into the influence of diet, gender and aging. *Lipids Health Dis***10**, 211 (2011).
14. Vanhoutte, P. M., Shimokawa, H., Feletou, M. & Tang, E. H. C. Endothelial dysfunction and vascular disease - a 30th anniversary update. *Acta Physiol***219**, 22–96 (2017).

15. El Dirani, Z. Figure 11 : Les différentes étapes du couplage excitation-contraction... *ResearchGate* https://www.researchgate.net/figure/Les-differentes-etapes-du-couplage-excitation-contraction-dans-les-muscles-stries_fig10_332961044.
16. Colpaert, E. E., Levent, A. & Lefebvre, R. A. Nitric oxide relaxes circular smooth muscle of rat distal colon through RhoA/Rho-kinase independent Ca²⁺ desensitisation. *Br J Pharmacol***144**, 588–594 (2005).
17. Chegg.com. <https://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/happen-activity-mlck-gi-agonist-applied-smooth-muscle-cells-cat-l-type-ca-channel-sr-ca-go-q58367020>.
18. Kohler, D. C. Le tissu musculaire. 14.
19. Michiels, C. Endothelial cell functions. *Journal of Cellular Physiology***196**, 430–443 (2003).
20. Stenmark, K. R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E. & Das, M. Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling. *Physiology***21**, 134–145 (2006).
21. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. & Flores, S. Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clin Chest Med***28**, 23–vii (2007).
22. ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0735109709001429?token=0C2EA16E852DC384A7970095041702012FA4CCC8D41A2A1A235EA54C05E53B653F4E2BCED3C0DC6AB1782FC6023A302F&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220108164839> doi:10.1016/j.jacc.2009.01.004.
23. Humbert, M. *et al.* Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J***53**, 1801887 (2019).
24. Vito, R. P. & Dixon, S. A. Blood Vessel Constitutive Models—1995–2002. *Annual Review of Biomedical Engineering***5**, 413–439 (2003).
25. Mónica, F. Z., Bian, K. & Murad, F. Chapter One - The Endothelium-Dependent Nitric Oxide–cGMP Pathway. in *Advances in Pharmacology* (ed. Khalil, R. A.) vol. 77 1–27 (Academic Press, 2016).
26. Tucker, W. D., Arora, Y. & Mahajan, K. *Anatomy, Blood Vessels. StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, 2021).

27. Tsihlis, N. D. *et al.* Nitric Oxide Inhibits Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation and Neointimal Hyperplasia by Increasing the Ubiquitination and Degradation of UbcH10. *Cell BiochemBiophys***60**, 89–97 (2011).
28. Campbell, W. B. Arachidonic Acid Metabolites as Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factors. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/01.HYP.0000255173.50317.fc>.
29. Manoury, B., Idres, S., Leblais, V. & Fischmeister, R. Ion channels as effectors of cyclic nucleotide pathways: Functional relevance for arterial tone regulation. *Pharmacology & Therapeutics***209**, 107499 (2020).
30. Santos-Ribeiro, D. Pulmonary arterial hypertension: Basic knowledge for clinicians | Elsevier Enhanced Reader. <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S1875213616301358?token=A95BCB5B2404436E060B2928D9DE5C9A04683425A1E64D8D515E87FEDC3CCAF21DD265580B7A8CF6BF2C347429C86537&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220108215751> doi:10.1016/j.acvd.2016.03.004.
31. 04introduction.pdf.
32. Bohm, F. & Pernow, J. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease. *Cardiovascular Research***76**, 8–18 (2007).
33. Konukoglu, D. & Uzun, H. Endothelial Dysfunction and Hypertension. in *Hypertension: from basic research to clinical practice* (ed. Islam, Md. S.) vol. 956 511–540 (Springer International Publishing, 2016).
34. Weir, E. K., Hong, Z. & Varghese, A. The Serotonin Transporter. *Circulation Research***94**, 1152–1154 (2004).
35. Vanhoutte, P. M. Serotonin and the vascular wall. *International Journal of Cardiology***14**, 189–203 (1987).
36. MacLean, M. (Mandy) R. The serotonin hypothesis in pulmonary hypertension revisited: targets for novel therapies (2017 Grover Conference Series). *PulmCirc***8**, 2045894018759125 (2018).
37. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis***8**, 97 (2013).
38. David, D. J. & Gardier, A. M. Les bases de pharmacologie fondamentale du système sérotoninergique : application à la réponse antidépressive. *L'Encéphale***42**, 255–263 (2016).

39. Eddahibi, S. *et al.* Cross Talk Between Endothelial and Smooth Muscle Cells in Pulmonary Hypertension. *Circulation***113**, 1857–1864 (2006).
40. Vanhoutte, P. M. Endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J***18 Suppl E**, E19-29 (1997).
41. Rucker, D. & Dhamoon, A. S. *Physiology, Thromboxane A2. StatPearls [Internet]* (StatPearls Publishing, 2021).
42. Simonneau, G. *et al.* Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur Respir J***53**, 1801913 (2019).
43. Azzola, A. Hypertension pulmonaire pour le généraliste en 2018. *Revue Medicale Suisse* <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2018/revue-medicale-suisse-591/hypertension-pulmonaire-pour-le-generaliste-en-2018>.
44. Deborah Jo Levine, M., FCCP. Pulmonary Arterial Hypertension: Updates in Epidemiology and Evaluation of Patients. *Supplements and Featured Publications***27**, (2021).
45. Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S. & Humbert, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardio***14**, 603–614 (2017).
46. Peacock, A. J., Murphy, N. F., McMurray, J. J. V., Caballero, L. & Stewart, S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal***30**, 104–109 (2007).
47. Bonderman, D. *et al.* A noninvasive algorithm to exclude pre-capillary pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal***37**, 1096–1103 (2011).
48. Lai, Y.-C., Potoka, K. C., Champion, H. C., Mora, A. L. & Gladwin, M. T. Pulmonary Arterial Hypertension: The Clinical Syndrome. *Circ Res***115**, 115–130 (2014).
49. Rubin, L. J. Endothelin receptor antagonists for the treatment of pulmonary artery hypertension. *Life Sciences***91**, 517–521 (2012).
50. Wilkins, M. R., Wharton, J., Grimminger, F. & Ghofrani, H. A. Phosphodiesterase inhibitors for the treatment of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal***32**, 198–209 (2008).
51. Sitbon, O. *et al.* Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation***111**, 3105–3111 (2005).

52. Montani, D. *et al.* Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Heart Journal***31**, 1898–1907 (2010).
53. Humbert, M. *et al.* Sotatercept for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *New England Journal of Medicine* (2021) doi:10.1056/NEJMoa2024277.
54. Bjornsson, J. & Edwards, W. D. Primary Pulmonary Hypertension: A Histopathologic Study of 80 Cases. *Mayo Clinic Proceedings***60**, 16–25 (1985).
55. Meyrick, B. THE PATHOLOGY OF PULMONARY ARTERY HYPERTENSION. *Clinics in Chest Medicine***22**, 393–404 (2001).
56. Tu, L. *et al.* Vers de nouvelles cibles pour le traitement de l’hypertension artérielle pulmonaire : Importance des communications cellulaires. *Biologie Aujourd’hui***210**, 65–78 (2016).
57. Wilkins, M. R. Pulmonary hypertension: the science behind the disease spectrum. *European Respiratory Review***21**, 19–26 (2012).
58. Gaine, S. P. & Rubin, L. J. Primary pulmonary hypertension. *The Lancet***352**, 719–725 (1998).
59. Morrell, N. W. *et al.* Cellular and Molecular Basis of Pulmonary Arterial Hypertension. *J Am Coll Cardiol***54**, S20–S31 (2009).
60. Iglarz, M. & Clozel, M. Mechanisms of ET-1-induced Endothelial Dysfunction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology***50**, 621–628 (2007).
61. Leopold, J. A. & Maron, B. A. Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci***17**, 761 (2016).
62. Price, L. C. *et al.* Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest***141**, 210–221 (2012).
63. Savai, R. *et al.* Immune and Inflammatory Cell Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***186**, 897–908 (2012).
64. Parpaleix, A. *et al.* Role of interleukin-1 receptor 1/MyD88 signalling in the development and progression of pulmonary hypertension. *Eur Respir J***48**, 470–483 (2016).
65. Hurst, L. A. *et al.* TNF α drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. *Nat Commun***8**, 14079 (2017).
66. Tamura, Y. *et al.* Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest***128**, 1956–1970 (2008).

67. Kimura, H. *et al.* Plasma Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Pulmonary Vascular Resistance in Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***164**, 319–324 (2001).
68. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal***22**, 358–363 (2003).
69. Beppu, H. BMP Type II Receptor Is Required for Gastrulation and Early Development of Mouse Embryos | Elsevier Enhanced Reader. *Academic press*
<https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0012160600996702?token=40F4B028936B9001FD06838F1B3566E72E7D1C6F90C77E9644122AC2819AD08237371A1AC1608E78F861561B9EA8920A&originRegion=eu-west-1&originCreation=20220221143120> (2000) doi:10.1006/dbio.2000.9670.
70. Li, C. *et al.* Immune cells and autoantibodies in pulmonary arterial hypertension. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica***49**, 1047–1057 (2017).
71. Trayhurn, P. & Wood, I. S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *British Journal of Nutrition***92**, 347–355 (2004).
72. Dela Cruz, C. S. & Matthay, R. A. Role of Obesity in Cardiomyopathy and Pulmonary Hypertension. *Clinics in Chest Medicine***30**, 509–523 (2009).
73. Giaid, A. *et al.* Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199306173282402>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199306173282402> (2010)
doi:10.1056/NEJM199306173282402.
74. Sitbon, O. & Morrell, N. Pathways in pulmonary arterial hypertension: the future is here. *European Respiratory Review***21**, 321–327 (2012).
75. Hervé, P. *et al.* Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *The American Journal of Medicine***99**, 249–254 (1995).
76. Perros, F. & Humbert, M. Physiopathologie de l’hypertension artérielle pulmonaire. *La Presse Médicale***34**, 232–242 (2005).
77. Giaid, A. & Saleh, D. Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199507273330403>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199507273330403> (2009)
doi:10.1056/NEJM199507273330403.

78. Bowers, R. *et al.* Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***169**, 764–769 (2004).
79. Zakrzewicz, D. & Eickelberg, O. From arginine methylation to ADMA: A novel mechanism with therapeutic potential in chronic lung diseases. *BMC Pulm Med***9**, 5 (2009).
80. Christman, B. W. *et al.* An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199207093270202>
<https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM199207093270202> (2010)
doi:10.1056/NEJM199207093270202.
81. Tuder, R. M. *et al.* Prostacyclin Synthase Expression Is Decreased in Lungs from Patients with Severe Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***159**, 1925–1932 (1999).
82. Pullamsetti, S. S., Perros, F., Chelladurai, P., Yuan, J. & Stenmark, K. Transcription factors, transcriptional coregulators, and epigenetic modulation in the control of pulmonary vascular cell phenotype: therapeutic implications for pulmonary hypertension (2015 Grover Conference series). *Pulm Circ***6**, 448–464 (2016).
83. Gladwin, M. T. Hypertension artérielle pulmonaire - Troubles pulmonaires. *Édition professionnelle du Manuel MSD* <https://www.msdmanuals.com/fr/professional/troubles-pulmonaires/hypertension-art%C3%A9rielle-pulmonaire/hypertension-art%C3%A9rielle-pulmonaire> (2020).
84. Ramirez, R. L., De Jesus Perez, V. & Zamanian, R. T. Methamphetamine and the risk of pulmonary arterial hypertension. *Curr Opin Pulm Med***24**, 416–424 (2018).
85. Thompson, A. A. R. & Lawrie, A. Targeting Vascular Remodeling to Treat Pulmonary Arterial Hypertension. *Trends in Molecular Medicine***23**, 31–45 (2017).
86. Morrell, N. W. *et al.* Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J***53**, 1801899 (2019).
87. Austin, E. D., John A Phillips, I. I. I. & Loyd, J. E. *Heritable Pulmonary Arterial Hypertension Overview*. *GeneReviews® [Internet]* (University of Washington, Seattle, 2020).
88. Tielemans, B., Delcroix, M., Belge, C. & Quarck, R. TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Drug Discovery Today***24**, 703–716 (2019).

89. Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E. & Bloch, K. D. Bone Morphogenetic Protein (BMP) Type II Receptor Deletion Reveals BMP Ligand-specific Gain of Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Journal of Biological Chemistry***280**, 24443–24450 (2005).
90. Upton, P. D. & Morrell, N. W. The transforming growth factor- β -bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease. *Experimental Physiology***98**, 1262–1266 (2013).
91. Kim, M.-J. *et al.* Clinical significance linked to functional defects in bone morphogenetic protein type 2 receptor, BMPR2. *BMB Rep***50**, 308–317 (2017).
92. Beederman, M. *et al.* BMP signaling in mesenchymal stem cell differentiation and bone formation. *Journal of Biomedical Science and Engineering***06**, 32–52 (2013).
93. Fan, R. Genetics and its Associated Pathways of Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Respir Pulm Med***2**, (2015).
94. Pfarr, N. *et al.* Hemodynamic and clinical onset in patients with hereditary pulmonary arterial hypertension and BMPR2 mutations. *Respir Res***12**, 99 (2011).
95. Pousada, G., Balóira, A., Vilariño, C., Cifrián, J. M. & Valverde, D. Novel Mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 Genes and Hemodynamic Parameters in Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *PLoS One***9**, e100261 (2014).
96. Chew, J. D., Loyd, J. E. & Austin, E. D. Genetics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Semin Respir Crit Care Med***38**, 585–595 (2017).
97. West, J. D. *et al.* KCNK3 Mutation Causes Altered Immune Function in Pulmonary Arterial Hypertension Patients and Mouse Models. *Int J Mol Sci***22**, 5014 (2021).
98. Girerd, B., Weatherald, J., Montani, D. & Humbert, M. Heritable pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur Respir Rev***26**, 170037 (2017).
99. Swietlik, E. M. *et al.* Bayesian Inference Associates Rare KDR Variants With Specific Phenotypes in Pulmonary Arterial Hypertension. *CircGenom Precis Med***14**, e003155 (2020).
100. Cong, B., Zhang, Q. & Cao, X. The function and regulation of TET2 in innate immunity and inflammation. *Protein Cell***12**, 165–173 (2021).
101. Potus, F. *et al.* Novel mutations and decreased expression of the epigenetic regulator TET2 in pulmonary arterial hypertension. *Circulation***141**, 1986–2000 (2020).

102. Irie, N. *et al.* SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate. *Cell***160**, 253–268 (2015).
103. Wu, Y. *et al.* The pathophysiological role of novel pulmonary arterial hypertension gene SOX17. *European Respiratory Journal***58**, (2021).
104. Fazal, S., Bissierier, M. & Hadri, L. Molecular and Genetic Profiling for Precision Medicines in Pulmonary Arterial Hypertension. *Cells***10**, 638 (2021).
105. Montani, D. *et al.* Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J***47**, 1518–1534 (2016).
106. Montani, D. *et al.* Pulmonary veno-occlusive disease. *European Respiratory Journal***33**, 189–200 (2009).
107. Boucly, A. *et al.* La maladie veino-occlusive pulmonaire. *Revue des Maladies Respiratoires***35**, 160–170 (2018).
108. Ogawa, A., Sakao, S., Tanabe, N., Matsubara, H. & Tatsumi, K. Use of vasodilators for the treatment of pulmonary veno-occlusive disease and pulmonary capillary hemangiomatosis: A systematic review. *Respiratory Investigation***57**, 183–190 (2019).
109. Montani, D. *et al.* Maladie veino-occlusive et hémangiomatose capillaire pulmonaire. *La Presse Médicale***39**, 134–143 (2010).
110. Masson, G. R. Towards a model of GCN2 activation. *Biochem Soc Trans***47**, 1481–1488 (2019).
111. Maia de Oliveira, T. *et al.* The structure of human GCN2 reveals a parallel, back-to-back kinase dimer with a plastic DFG activation loop motif. *Biochemical Journal***477**, 275–284 (2020).
112. Deng, J. *et al.* Activation of GCN2 in UV-Irradiated Cells Inhibits Translation. *Current Biology* **8** (2002).
113. Gold, L. T. & Masson, G. R. GCN2: roles in tumour development and progression. *Biochemical Society Transactions* BST20211252 (2022) doi:10.1042/BST20211252.
114. Perros, F. Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease. <https://www.ahajournals.org/doi/epub/10.1161/CIRCULATIONAHA.115.014207>
doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.115.014207.
115. Montani, D. *et al.* Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J***46**, 1721–1731 (2015).

116. Dumas, O. *et al.* Respiratory effects of trichloroethylene. *Respiratory Medicine***134**, 47–53 (2018).
117. Montani, D. *et al.* Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Clinical, Functional, Radiologic, and Hemodynamic Characteristics and Outcome of 24 Cases Confirmed by Histology. *Medicine***87**, 220–233 (2008).
118. Zamanian, R. T. *et al.* Features and Outcomes of Methamphetamine-associated Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***197**, 788–800 (2018).
119. Chen, P.-I. *et al.* Amphetamines promote mitochondrial dysfunction and DNA damage in pulmonary hypertension. *JCI Insight***2**, e90427 (2017).
120. Zolty, R. Pulmonary arterial hypertension specific therapy: The old and the new. *Pharmacology & Therapeutics***214**, 107576 (2020).
121. Weatherald, J., Chaumais, M.-C. & Montani, D. Pulmonary arterial hypertension induced by tyrosine kinase inhibitors. *Current Opinion in Pulmonary Medicine***23**, 392–397 (2017).
122. Orlikow, E., Weatherald, J. & Hirani, N. Dasatinib-Induced Pulmonary Arterial Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology***35**, 1604.e1-1604.e3 (2019).
123. McGee, M., Whitehead, N., Martin, J. & Collins, N. Drug-associated pulmonary arterial hypertension. *Clinical Toxicology***56**, 801–809 (2018).
124. Orcholski, M. E. *et al.* Drug-induced pulmonary arterial hypertension: a primer for clinicians and scientists. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol***314**, L967–L983 (2018).
125. Seferian, A. *et al.* Drugs induced pulmonary arterial hypertension. *La Presse Médicale***42**, e303–e310 (2013).
126. Palasset, T. L. *et al.* Association between Leflunomide and Pulmonary Hypertension. *Ann Am Thorac Soc***18**, 1306–1315 (2021).
127. Coirier, V. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in four patients treated by leflunomide. *Joint Bone Spine***85**, 761–763 (2018).
128. Breedveld, F. & Dayer, J. Leflunomide: mode of action in the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis***59**, 841–849 (2000).
129. Xuan, J. *et al.* Mitochondrial dysfunction induced by leflunomide and its active metabolite. *Toxicology***396–397**, 33–45 (2018).

130. Hamilton, L. C., Vojnovic, I. & Warner, T. D. A771726, the active metabolite of leflunomide, directly inhibits the activity of cyclo-oxygenase-2 in vitro and in vivo in a substrate-sensitive manner. *Br J Pharmacol* **127**, 1589–1596 (1999).
131. Ren, Z. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and MAPK signaling pathway activation underlie leflunomide-induced toxicity in HepG2 Cells. *Toxicology* **392**, 11–21 (2017).
132. Sawamukai, N. *et al.* Leflunomide Inhibits PDK1/Akt Pathway and Induces Apoptosis of Human Mast Cells. *The Journal of Immunology* **179**, 6479–6484 (2007).
133. Waldman, W. J. *et al.* INHIBITION OF ANGIOGENESIS-RELATED ENDOTHELIAL ACTIVITY BY THE EXPERIMENTAL IMMUNOSUPPRESSIVE AGENT LEFLUNOMIDE1. *Transplantation* **72**, 1578–1582 (2001).
134. Savikko, J., von Willebrand, E. & Häyry, P. Leflunomide analogue FK778 is vasculoprotective independent of its immunosuppressive effect: potential applications for restenosis and chronic rejection. *Transplantation* **76**, 455–458 (2003).
135. Belen, D. *et al.* Leflunomide prevents vasospasm secondary to subarachnoid haemorrhage. *Acta Neurochir (Wien)* **149**, 1041–1048 (2007).
136. Grisar, J. *et al.* Leflunomide inhibits transendothelial migration of peripheral blood mononuclear cells. *Ann Rheum Dis* **63**, 1632–1637 (2004).
137. Rahman, S. & Rahman, T. Unveiling some FDA-approved drugs as inhibitors of the store-operated Ca²⁺ entry pathway. *Sci Rep* **7**, 12881 (2017).
138. Mulvany and Halpern. Contractile properties of small arterial resistance vessels in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Circulation Research* <https://www.ahajournals.org/doi/epdf/10.1161/01.RES.41.1.19> (1977) doi:10.1161/01.RES.41.1.19.
139. Grabar, P. B. *et al.* Investigation of the Influence of CYP1A2 and CYP2C19 Genetic Polymorphism on 2-Cyano-3-hydroxy-N-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-2-butenamide (A77 1726) Pharmacokinetics in Leflunomide-Treated Patients with Rheumatoid Arthritis. *Drug Metab Dispos* **37**, 2061–2068 (2009).
140. Diaconu, C. C., Dediu, G. N. & Iancu, M. A. Drug-induced arterial hypertension – a frequently ignored cause of secondary hypertension: a review. *Acta Cardiologica* **73**, 511–517 (2018).

141. Ruffenach, G. *et al.* Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med***194**, 1273–1285 (2016).
142. Martinsen, A., Dessy, C. & Morel, N. Regulation of calcium channels in smooth muscle: New insights into the role of myosin light chain kinase. *Channels (Austin)***8**, 402–413 (2014).
143. Guignabert, C. *et al.* Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest***126**, 3207–3218.
144. Eyries, M. *et al.* EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet***46**, 65–69 (2014).
145. Leblais, V. *et al.* β -adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent β_2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovascular Research***77**, 202–210 (2008).
146. Hautefort, A. *et al.* Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation***139**, 932–948 (2019).

ANNEXES

***Gcn2 (Eif2ak4^{-/-})* deficient rats display molecular and cellular lung dysregulation in basal and stress conditions**

Juliette Bignard¹, Fabrice Atassi¹, Olivier Claude², Maria-Rosa Ghigna³, Nathalie Mougenot⁴, **Bahgat Soilih Abdoukarim**⁵, Florence Deknuydt⁶, Aurélie Gestin⁶, David Montani⁵, Sophie Nadaud¹, Florent Soubrier¹, Frédéric Perros⁵

1. Sorbonne Universités, INSERM, UMR_S 1166, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France

2. Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), PSE-SANTE/SESANE/LRSI, Fontenay-aux-roses, France

3. Department of Pathology, Institut Gustave Roussy, Villejuif, Inserm UMR_S999 Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, Univ. Paris-Sud, Faculté de Médecine, Université Paris-Saclay, Le Kremlin Bicêtre, France

4. Sorbonne Université, UMS28, Plateforme d'Expérimentation Cœur, Muscles, Vaisseaux (PECMV), 75013, Paris, France

5. Université Paris–Saclay, AP-HP, INSERM UMR_S 999, Service de Pneumologie et Soins Intensifs Respiratoires, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, France.

6. Flow cytometry core Cyto-ICAN, Institute of Cardiometabolism and Nutrition, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France

Abstract

Hereditary pulmonary veno-occlusive disease (hPVOD) is a severe form of autosomal recessive pulmonary hypertension, and is due to biallelic loss-of-function of the *EIF2AK4* gene (alias *GCN2*) coding for GCN2. GCN2 is a stress kinase that belongs to the integrated stress response pathway (ISR). We created three different *Eif2ak4* (*Gcn2*) deletions with CRISPR-CAS9 technology generating three rat lines. These rats did not spontaneously develop a PVOD-related disease. We submitted these rats to a metabolic stress to document the molecular and cellular response of the lungs and to identify phenotypic changes that could be involved in PVOD pathophysiology. *Gcn2* mutant rat lungs were analyzed under basal conditions and three days after a single administration of PEG-asparaginase (ASNase). Lung mRNAs were analyzed by RNASeq and single cell RNASeq (scRNA-seq), flow-cytometry, tissue imaging, and western-blots. The ISR was not activated after ASNase treatment in *Gcn2*^{-/-} rat lungs, and apoptosis was increased. Several genetic markers of inflammation and innate immunity were overexpressed, and inflammatory cell infiltration was also observed in the perivascular area. Under basal conditions, scRNA-seq analysis of *Gcn2*^{-/-} rat lungs revealed increases in two T cell populations, a LAG3⁺ T cell population and a proliferative T cell population. Following ASNase administration, we observed an increase in calprotectin expression involved in TLR pathway activation and neutrophil infiltration. Under basal and metabolic stress conditions, *Gcn2*^{-/-} rats display molecular and cellular signatures in the lungs that may indicate a role for Gcn2 in immunity homeostasis and provide further clues to the mechanisms of PVOD development.

INTRODUCTION

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) is a rare and severe lung disease characterized by pulmonary vascular remodeling. Vascular remodeling involves small veins and venules with intimal fibrosis and medial hypertrophy, muscular hyperplasia of interlobular septal veins, and arterial remodeling illustrated by profound media hypertrophy of small arteries^{1,2}. As lumen diameter decreases, pulmonary vascular resistance increases and thus leads to progressive right ventricular failure.

PVOD presents either as a sporadic disease, occurring late in life and can be favored by tobacco consumption, occupational exposure to organic solvents, alkylating agent treatment, or as a hereditary form³⁻⁵. The hereditary form (hPVOD) is due to pathogenic variants present in the *EIF2AK4* gene (also known as and hereinafter as *GCN2*) rendering both alleles nonfunctional. hPVOD is inherited in an autosomal recessive manner with near complete penetrance, although the age of disease onset may vary, occurring from birth until 50 years of age⁶. The relationship between *GCN2* gene deficiency and pulmonary disease development remains unknown, as no clear links between gene function and the pathological lung lesions have yet been identified. The GCN2 protein is known to have a central role in sensing and responding to amino acid deficiency by shutting down protein translation, a mechanism common to all mammalian cells⁷. During cellular conditions of amino acid starvation, the cytoplasmic kinase GCN2 is activated by dimerization and autophosphorylation and binds uncharged tRNAs with high affinity⁸.

To decipher the mechanisms linking amino acid deficiency sensing and PVOD development, we interrupted *Gcn2* function in Sprague-Dawley rats by introducing small gene deletions using CrispR-CAS9 genome editing technology. In contrast to humans carrying *GCN2* biallelic mutations, homozygous *Gcn2*-deficient rats do not develop PVOD, either spontaneously or in

response to various stresses, as previously observed in *Gcn2* mutant mice. *Gcn2*-deficient rats are, however, exquisitely sensitive to acute asparagine and glutamine deprivation induced by asparaginase administration, in contrast to wild-type rats. We therefore analyzed changes in mRNA expression and cell populations in the lungs of wild-type and *Gcn2*-deficient rats. We highlighted the critical role of GCN2 in both the pulmonary inflammatory response and T cell development.

METHODS

In vivo study design - *Gcn2*- (alias *Eif2ak4*) deficient rats were generated on a Sprague Dawley background using the CrispR-CAS9 method as previously described⁹. Briefly, a frameshift deletion was introduced in the first exon of the *Gcn2* gene to disrupt the gene. We developed three lines with biallelic deletions of 152 bp, 41 bp, and 25 bp; designated *Gcn2*^{152-/-}, *Gcn2*^{41-/-} and *Gcn2*^{25-/-}, respectively. Three-week-old rats were genotyped using genomic DNA obtained from ear punches as described in Manaud *et al.*⁹. PCRs were performed using 5X Herculase, and primers were designed to encompass mutant sequences (DNA bases: UPTE71-EIF2AK4: 5'-GAGGTCCCGTTTTTCAGAGC-3' and LoTE71-EIF2AK4: 5'-AAGTCGAGGTGGGGAAGAAT-3'). Eight- to ten-week-old male and female rats weighing approximately 400 g were randomly assigned to receive either an intramuscular injection of 75 U/kg PEG-asparaginase (ASNase; Oncaspar, Shire) or an equal volume of vehicle (Vhcl; 0.9% NaCl). Because ASNase induces dramatic weight loss in *Gcn2* mutant rats, animals were euthanized three days post-injection (corresponding to a 20% weight loss threshold), through exsanguination under anesthesia. Blood and organs were collected for histological and molecular studies. Two lung lobes from each animal were inflated with OCT and either flash-frozen in isopentane on liquid nitrogen or fixed in paraformaldehyde for 72 hours. Remaining lobes were flash-frozen in liquid nitrogen.

RNA preparation and RNAseq analysis - Frozen lung samples were processed to obtain high-quality RNA for RNA Sequencing (RNAseq). A detailed protocol is provided in supplemental data. Final pooled sample libraries were sequenced on the Novaseq 6000 ILLUMINA, generating 2×5.10^7 paired-end base reads per sample after demultiplexing. Bioinformatic analyses were performed at the Paris ICM Institute's Data Analysis Core (iconics.institutducleveau-icm.org/). Data were normalized with DESeq2 (v1.26.0) bioconductor packages, prior to differential analysis with the DESeq2 workflow. Multiple tests-adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Finally, enrichment analysis was conducted using Hallmark databases and KEGG pathways with the clusterProfiler R package (v3.14.3) with Gene Set Enrichment Analysis.

Single-cell RNAseq - For every experimental group, three female rats from each KO line: *Gcn2*^{152-/-}, *Gcn2*^{41-/-}, and *Gcn2*^{25-/-} were euthanized and exsanguinated. Lungs were inflated with enzymatic solution (1.76 U/ml dispase, 0.15 U/ml collagenase) and slowly stirred at 37°C for 1 hour in 20 ml of enzymatic solution. Following digestion, lungs were pooled and cells were mechanically dissociated by carefully mincing into small pieces (2 to 3 mm³). The resulting cell suspension was filtered through a 70-micron sieve in order to eliminate cellular debris, then red blood cells were lysed. After washing, viable cells were selected by cell sorting using Zombie-green (Biolegend). SingleCell library prep were performed with chromium from 10X Genomics. Chromium Next GEM Single Cell 3' GEM kit and Chip G were used, following the manufacturer's recommendations. A total of 5,000 to 20,000 cells were loaded onto chromium and sequenced on the Novaseq 6000 ILLUMINA. Using a 100-cycle ILLUMINA cartridge, calculations were based on a minimum of 20,000 reads/cell per sample. scRNA-Seq data analyses was performed at

GenoSplice (www.genosplice.com). Detailed bioinformatic methods are described in supplemental data.

RESULTS

***Gcn2*^{-/-} rat phenotype under basal and stress conditions**

After more than 12 months of observation by echocardiography and lung sections morphometry analyses, *Gcn2*^{-/-} rats did not develop spontaneous PVOD nor any other obvious phenotype. Attempts to induce the disease using known GCN2 function-related stresses (amino acid deprivation, hypoxia, inflammation) were unsuccessful (results not shown)¹⁰.

Systemic responses to asparaginase in *Gcn2*^{-/-} rats

Considering GCN2 is one of the main sensors of amino acid starvation in the organism, we injected asparaginase (ASNase) at a dose of 75 U/Kg in both wild-type and homozygous *Gcn2* KO rats in order to evaluate their response to metabolic stress in the presence or absence of functional GCN2. The chemotherapy agent ASNase depletes serum levels of asparagine and glutamine, starving cells of essential substrates, and induces GCN2 activation. ASNase treatment induces rapid weight loss in *Gcn2*^{-/-} animals with health status deterioration, therefore experiments were stopped at three days post-injection (Figure 1A). In contrast, wild-type animals did not show any detectable physiological deterioration. Macroscopic observation of the organs from ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} animals revealed a yellowish liver, which upon microscopic examination, contained lipid droplets signaling developing steatosis (Figure E1 in supplemental data). ASNase-induced asparagine and glutamine starvation was the only condition in which we observed a phenotypic difference between *Gcn2*-deficient rats and WT rats.

Asparaginase induced an integrated stress response (ISR) and autophagy in WT rat lungs and increased apoptosis in *Gcn2*^{-/-} rat lungs.

ASNase treatment increased phospho-(T899)-GCN2 and total GCN2 protein in WT animals, neither of which were detected in *Gcn2*^{-/-} rats (Figure 1, B1 and B2)¹¹. Consistent with this result, ATF4 (Activating transcription factor 4), one of a downstream component of ISR, was significantly increased in ASNase-treated WT animals but remained unchanged in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} animals (Figure 1C). Asparaginase synthetase and Sestrin-2 proteins, known transcriptional targets of ATF4, were also increased in ASNase-treated WT animals (Figure 1B and 1C). We measured the expression of another EIF2 kinase, PERK, which is activated by endoplasmic reticulum stress. PERK was significantly increased in WT rats treated with ASNase and was unchanged in similarly-treated *Gcn2*^{-/-} rats (Figure 1B). These results demonstrate that the integrated stress response (ISR) is activated in ASNase-treated WT animals but is not induced in *Gcn2*^{-/-} animals. Given that the downstream autophagy pathway is triggered by GCN2-induced-ISR during amino acid starvation and/or inflammatory stress^{12,13}, we therefore assessed autophagy using four different protein markers; p62, LC3B, ATG3, and ATG5. ATG3 and p62 increased with ASNase treatment in WT rats as compared to *Gcn2*^{-/-} rats, whereas LC3B and ATG5 remained stable in both WT and *Gcn2*^{-/-} rats following ASNase treatment (Figure 2, A-B). In summary, in contrast to WT rats, ISR and autophagy was not induced in *Gcn2*^{-/-} rats in response to asparagine and glutamine deprivation.

Global lung apoptosis was significantly increased in *Gcn2*^{-/-} rats as compared to WT rats after ASNase treatment, as measured by TUNEL. In contrast, there was no difference at basal conditions (Figure 2C).

RNAseq experiments reveal whole lung inflammation in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats.

We performed RNAseq transcriptome analysis to document the lung response to ASNase-induced metabolic stress in both WT and *Gcn2*-deficient rats. Results were compared with those from *Gcn2*^{-/-} and WT rats treated with vehicle (NaCl 0.05%, Vhcl) corresponding to basal conditions. Under basal conditions, only a few genes were differentially regulated between *Gcn2*^{-/-} and WT rats, consistent with the absence of phenotypic abnormalities in KO rats. Expression analysis showed a total of 680 differentially upregulated and 628 differentially downregulated genes between *Gcn2*^{-/-} ASNase and WT ASNase groups (Figure 3, A-B).

In order to identify which gene networks were altered during ASNase treatment, differentially expressed genes (DEGs) were investigated using the Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) algorithm based on the Hallmark collection of Molecular Signature Database (MSigDB). This analysis revealed a number of significantly upregulated genes related to inflammation (Figure 3D), e.g., *Nfkb2* (Hallmark geneset: TNF- α signaling via NF- κ B), *Ccl2* (encoding MCP-1), *Il6*, *Il1b*, *Sele* coding for E-selectin (Hallmark geneset: inflammatory response), and *Myd88* (Hallmark geneset: interferon gamma response). These genes found to be upregulated with RNAseq in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats were confirmed with qPCR (Figure 4, A-F). In addition, the Hallmark geneset inflammatory response gene heatmap illustrated that several inflammatory genes were uniquely overexpressed in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats (Figure 3C). Calprotectin is synthesized by neutrophils and monocytes and is part of the classical complement pathway. The two calprotectin subunits are encoded by the *S100a8* and *S100a9* genes which underwent a more than 30-fold increase in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats (Table E1). Under ASNase conditions, serum calprotectin levels significantly increased in *Gcn2*^{-/-} rats compared to WT rats, as determined by ELISA (Figure 4G). Calprotectin is a known damage-associated molecular pattern (DAMP) component, able to

activate toll-like receptors (TLR) by an autocrine mechanism (on peut mettre 29). Indeed, we observed increased expression of *Tlr-2*, *-6*, *-8*, *-9*, *-10*, *-11*, and *-13* in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats (Table E1). *Myd88*, one of the most upregulated genes, codes for a cytosolic adaptor protein linking activated Toll-like receptors with other intracellular signaling intermediates. Altogether, these results demonstrate activation of the TLR-MYD88 pathway genes. Inflammation is also detected at the histological level. Interstitial edema and inflammatory cell infiltration are observed in the lungs of *Gcn2*^{-/-} rats treated with ASNase. This cell infiltration is composed of granulocytes and appears to be predominantly perivascular. These inflammatory lesions are not observed in ASNase-treated WT rats (Figure E2).

Identification of cell populations in whole rat lung tissue by scRNA-seq.

scRNA-seq was performed on pooled samples of three lungs from each KO line (*Gcn2*^{152/-}, *Gcn2*^{41/-} and *Gcn2*^{25/-}) in order to neutralize any potential off-target events inherent to CrispR-CAS9 technology. A single pool of animals was analyzed per experimental group (*Gcn2*^{-/-} ASNase, WT ASNase, *Gcn2*^{-/-} Vhcl, and WT Vhcl). All sequencing experiments passed quality control steps (Figure E3). A total of 18,201 cells were analyzed and a median 1341 genes were detected per cell. mRNA expression clustering enabled us to identify 19 distinct cell populations (Figure 5A). Each cell population was characterized by the expression of known markers (Figure 5B). We grouped cell clusters into three cell families: epithelial cells, immune cells, and vascular cells (Figure 5C). In the epithelial cell group we observed club cells and a rare population of Tuft cells, also known as brush cells, which were characterized by *Dclkl* and *Lrmp* expression^{14,15}. The vascular wall cell group was composed of endothelial cells, smooth muscle cells, and fibroblasts. Interestingly, ASNase treatment increased endothelial cell number only in WT rats, whereas fibroblasts were increased in *Gcn2*-deficient rats as compared to the other experimental groups. Immune cell

numbers also underwent significant changes. In the myeloid lineage, neutrophils and classical monocytes were strongly increased in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats, and non-classical monocytes were also increased to a lesser extent. Two populations of T-lymphoid cells expressing CD3 were unexpectedly increased under basal conditions in *Gcn2*^{-/-} rats. One population was characterized by predominant expression of the *Lag3* gene, encoding an inhibiting receptor of T cells (T_LAG3). This population was comprised of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and was only observed in untreated *Gcn2*^{-/-} rats, and disappeared with ASNase treatment. Another T cell population was also increased in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions but did not express *Lag3*. This population was shown to exist in a proliferating state as attested by increased *Mki67* expression. The evolution of this population is further analyzed below (Figure 5D).

ScRNA-seq experiments highlight cell population-specific gene and pathway regulation.

Differentially expressed genes (DEGs) were analyzed across cell populations identified through scRNAseq. This analysis revealed genes whose differential expression was specific to an experimental condition and/or a particular cell type. Under basal conditions, only T_LAG3 and endothelial cell populations displayed a large number of DEGs between *Gcn2* mutant and WT rats. In contrast, under ASNase conditions, most of the individual cell populations exhibited high numbers of DEGs between the two groups (Figure 6A). Several gene modulations were detected in endothelial cells of *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions. Indeed, *Bmpr2*, the major predisposing gene for PAH, was upregulated in endothelial cells from *Gcn2*^{-/-} rats. *Eng*, encoding the vascular endothelium glycoprotein endoglin, and *Il33*, encoding an interleukin involved in immune cell activation, were also exclusively upregulated in endothelial cells from the *Gcn2*^{-/-} Vhcl group (Figure 6B). In endothelial cells from ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats, one of the most upregulated genes was leucine-rich-alpha2-glycoprotein, *Lrg1* ($p=1.37 \times 10^{-4}$, $\log_{2}FC=1.33$; Figure 6B). LRG1

belongs to the leucine-rich repeat family of proteins involved in protein-protein interaction, and to the TGF- β signaling pathway. In T_LAG3 cells, *Gata3*, a transcription factor involved in T cell development, proliferation, and maintenance, was exclusively upregulated in the *Gcn2*^{-/-} Vhcl group (Figure 6B). Interestingly, DEG pathway enrichment analysis from the T_LAG3 population revealed downregulation of ribosomes and the mRNA transport pathway in *Gcn2*^{-/-} compared to WT rats under basal conditions (Table E2). The ISR was activated in neutrophils as *Ddit3* and *Atf3* genes were exclusively upregulated in WT but not in *Gcn2*^{-/-} rats following ASNase treatment (Figure 6B).

Trajectory analysis of the cell populations

The single-cell trajectory inference method uses scRNAseq data and then computationally orders cells along a pseudo-time trajectory on the basis of expression pattern similarities. In order to determine the potential lineage differentiation between cell populations, we used the Monocle-2 algorithm to infer differentiation trajectories for a subset of 1952 genes expressed in the majority of cells from the scRNAseq experiments (using M3drop). This analysis generated a structure composed of three branches representing three populations, consistent with cluster analysis (Figure E4, A). One branch included T cells, another branch included myeloid cells, and the third contained the epithelial and vascular cell populations. This analysis was consistent with the cell clustering identification generated from scRNASeq. T_LAG3 cells and T_Naïve cells were concentrated on the same position of branch 1, whereas clusters representing B cells, NK cells, CD8 cytotoxic cells, and ILC2 cells were more heterogeneously arrayed along branch 1, suggesting that those clusters were in similar states of differentiation. The proliferating T cell population was also heterogeneously distributed, a result expected from dividing cells (Figure E4, B).

RNA velocity, the time derivative of the gene expression state, can be estimated by distinguishing between spliced and unspliced mRNAs¹⁶. Using RNA velocity analysis, the T cell proliferating cluster is likely the origin of other T cell clusters, in particular T_LAG3 cells and NK T cells. Interestingly, T_Naïve cells evolve towards T_LAG3 and T_Eff, two populations with T cell activation markers (Figure 6C). The evolution of T_Naïve cells is thought to be differentially regulated in *Gcn2*^{-/-} Vhcl rats as the T_LAG3 cell population is only found in this group. Velocity analysis also highlighted the dynamic evolution of fibroblasts which are known to have phenotypic plasticity. Club cells displayed the greatest evolution dynamics and appeared oriented towards Tuft cells, an expected result because they both belong to the epithelial cell family (Figure 6C).

Flow-cytometry analysis and immunofluorescence imaging confirm cluster identification and differential regulation.

The T_LAG3 population found only in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions was confirmed by flow cytometry analysis. Using lungs from an additional set of *Gcn2*^{-/-} Vhcl and WT Vhcl rats (n=5/group), we analyzed cells from whole lungs in order to validate the increase in T_LAG3 cells in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions observed by scRNAseq. We used the CD3 cell surface marker to identify the global T cell population. CD4 and CD8 cell surface markers were added to determine the proportion of LAG3⁺ T cells in CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ T cell populations. Finally, we used the LAG3 marker to investigate the T_LAG3 population. Interestingly, we observed that the increase in LAG3 marker expression was essentially intracellular (without permeation there was no signal for either condition). Furthermore, the percentage of CD3⁺/LAG3⁺ cell populations significantly increased in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions as compared to WT, thus confirming our scRNAseq results (Figure 7A). The percentage of LAG3⁺ cells tended to increase in both CD3⁺/CD4⁺ and CD3⁺/CD8⁺ populations (p=0.09; Figure 7A). Flow cytometry analysis

demonstrated that the LAG3 increase appeared to be principally detected within the intracellular compartment, suggesting that the T_{LAG3} population remains in an unstimulated state in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions. T cell proliferation was assessed by double labeling with CD3 and Ki67 antibodies followed by immunofluorescence (IF) analyses. A two-fold increase in dual-positive cells illustrated greater T cell proliferation in *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions (Figure 7D).

The significantly increased expression of *S100a8* and *S100a9* genes encoding calprotectin subunits suggested an increase in neutrophil populations as confirmed by scRNAseq. The increased neutrophil cell population in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats was validated by IF with calprotectin antibodies (Figure 7B). Double staining with Von Willebrand factor indicates that the neutrophil infiltration is mainly perivascular. Given that MMP9 is produced under inflammatory conditions, we used it as an additional neutrophil infiltration marker similar to calprotectin¹⁷. Western blot experiments further demonstrated that MMP9 was increased in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats (Figure 7C). Altogether, these results demonstrating the infiltration of activated neutrophils in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats confirm an active inflammatory state.

DISCUSSION

We generated genetically *Gcn2*-deficient rats by CrispR-CAS9 in an attempt to create an animal model of heritable PVOD. These rats, as well as *Gcn2* KO mice, do not develop spontaneous PVOD, even after twelve months. Moreover, PVOD did not occur in *Gcn2*-deficient rats, even after the induction of various short- or long-term stressors, such as inflammatory or amino acid deprivation. To induce short-term metabolic stress, we used asparaginase, an anti-leukemia drug that causes asparagine and glutamine deficiency. We found it to be the only experimental condition that strongly discriminated between WT and *Gcn2*^{-/-} rats since *Gcn2* mutant rats underwent rapid weight loss with fatal consequences within a few days of administration, whereas WT rats did not show any significant physiological failure.

We conducted transcriptomic profiling and scRNAseq in *Gcn2*^{-/-} and WT rat lungs three days after a single ASNase injection to derive insights into the molecular and cellular responses to this stress. Under basal conditions, only five genes were differentially regulated, consistent with the absence of phenotypic alterations in *Gcn2*-deficient rats. However, *Gcn2*-deficient rat lungs contained large populations of T_LAG3 cells expressing LAG3, a CD4 homologue that binds MHC class II molecules with very high affinity and has an intrinsic negative regulatory T cell function. Other studies have shown that persistent antigen exposure results in sustained LAG3 expression and contributes to a state of “exhaustion” responsible for impaired proliferation of T cells and decreased cytokine production¹⁸. Previous reports have demonstrated that LAG3 is mainly localized in the intracellular compartment and is translocated to the cell surface upon stimulation¹⁹. Using flow cytometry, we confirmed that LAG3 had intracellular localization in this T cell population from *Gcn2*^{-/-} rats under basal conditions. Under unstimulated conditions, the majority of LAG3 does not reach the cell surface and likely undergoes degradation within lysosomal compartments¹⁹.

Nevertheless, DEGs analysis of T_LAG3 cells highlighted increased *Lag3* expression in *Gcn2*^{-/-} compared to WT rats under basal conditions. Given that intracellular LAG3 is accumulating in these *Gcn2*^{-/-} rats, the degradation pathway might be impaired.

In combination with the results from trajectory analysis demonstrating that T_LAG3 cells and T_Naïve cells were at the same stage of differentiation, we speculate that GCN2 loss prevents normal T_Naïve cell development, resulting in a unique T cell population with defective lysosomes. We therefore demonstrate an essential role for GCN2 in T cell differentiation independent to amino acid starvation.

Interestingly, the T_Prolif cell population also increased in *Gcn2*^{-/-} rats under non-stimulated conditions. Considering that this cell population expresses LAG3 at higher level in *Gcn2* deficient rats, it is possible that T_LAG3 cells are proliferating at higher rates than in WT animals.

The T_LAG3 population is no longer detected after ASNase treatment. Considering that GCN2 and amino acid supply are both necessary for T cell survival and differentiation, it is likely that GCN2-deficient T_LAG3 cells undergo cell death with ASNase treatment. It has been previously shown that T cells (CD4⁺, CD8⁺, and CD4⁺/CD8⁺), B cells (B220⁺ sIgM⁺), and leukocytes (CD11b⁺) from *Gcn2*^{-/-} mice demonstrate enhanced cell death when exposed to ASNase-induced amino acid deficiency²⁰.

The effects of GCN2 on T cell proliferation in the context of amino acid starvation is controversial. Our present data show decreased numbers of proliferating T cells in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats, a result consistent with the report of Van de Velde *et al.* demonstrating that both wild-type and GCN2-deficient T cells failed to proliferate in low concentrations of different amino acids (asparagine, leucine, tryptophan, and arginine)²¹. Moreover, we suggest that the decrease of T_Prolif is also due to the immunosuppressing effect of ASNase. The lymphocyte T expressing LAG3 in proliferating state is also likely to undergo cell death under ASNase treatment.

Considering that GCN2 has been reported to play a role in immune cell differentiation^{22,23} it is possible that *Gcn2*-deficient T cells cannot differentiate as efficiently as WT T cells during asparagine and glutamine starvation. Indeed, we found that the T_Eff population, corresponding to activated T cells, was significantly decreased in *Gcn2*^{-/-} rats compared to WT rats with ASNase treatment, whereas T_Naïve populations, corresponding to quiescent T cells, remained unchanged between experimental groups. Moreover, instead of being necessary for T cell proliferation, as proposed by Munn *et al.*²⁴, Van de Velde *et al.* suggested that GCN2 is required for normal cytotoxic T_Eff function. The possible inability of T_Eff to lyse activated antigen presenting cells could be one cause of increasing inflammatory status observed under amino acid starvation conditions. We can hypothesize that T cell dysfunction under basal conditions combined with the immunosuppressive effects of ASNase treatment results in amplified inflammatory processes in *Gcn2*^{-/-} rats.

Altogether, GCN2 loss impedes normal T cell development and leads to their proliferation, resulting in an increased T_LAG3 population which is unable to survive when rats are undergoing metabolic stress. ASNase treatment affects GCN2-deficient T cell differentiation, resulting in decreased T_Eff populations, and, possibly, cytotoxic dysfunction.

GCN2 has already been demonstrated as critically important in limiting asparaginase toxicity in the liver and pancreas in rodents^{25,26}. Consistent with these results, cytosolic vacuoles were present in yellowy livers from ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats, suggesting steatosis and inflammation. Indeed, ASNase treatment rapidly led to severe morbidity in GCN2-deficient rats indicating a high sensitivity to asparagine and glutamine depletion. We cannot exclude the possibility that inflammatory mediators originating from other organs, such as the liver or intestine, could target the lungs and indirectly induce lung injury.

As previously described in mice, we confirm that the GCN2 protein kinase is required to activate integrated stress responses in rats treated with ASNase. In accordance with the previous observation that ISR failure can drive cells towards apoptosis²⁰, we showed that apoptosis increased in lung cells from ASNase-treated *Gcn2*-deficient rats using the TUNEL assay. Given there is growing evidence that cell death can activate the immune response either by the transfer of antigens to the immune system or by the release of DAMPs^{27,28}, we speculate that increased cell death is an inflammatory trigger in ASNase-treated *Gcn2*-deficient rats. Ravishankar *et al.* demonstrated the important role of GCN2 in regulating the tolerogenic response to apoptotic cell antigens by inducing IL-10 and TGF- β production in macrophages²⁹. This expected increase was not observed in either WT or *Gcn2* mutant rats, a discrepancy that could be due to experimental differences, since Ravishankar triggered apoptosis with LPS. We then identified a DAMP molecule called calprotectin, whose two subunits are encoded by the *S100a8* and *S100a9* genes, and which were strongly overexpressed and also increased in the serum of ASNase-treated *Gcn2* mutant rats. Several reports have suggested that the immune system senses cell death via the TLR2 and/or TLR9 pathway(s)³⁰. In fact, DAMP molecules, such as calprotectin, can either activate the TLR pathway in sentinel cells (macrophages and mast cells) or in an autocrine manner via neutrophils^{31,32}. This data, along with our current results demonstrating *Tlr2*, *Myd88*, *Il6*, and *Il1b* overexpression, collectively establish that increased cell death could be responsible for increased inflammation processes by releasing calprotectin and inducing TLR pathway activation. Calprotectin is involved in neutrophil migration to inflammatory sites³³ and its increased expression in *Gcn2* mutant rats likely explains, at least in part, the increased neutrophil cell population as attested by scRNAseq and immunofluorescence analysis of lung cells. Immunofluorescence analysis of lung sections indicated that the neutrophil population localizes to perivascular areas. Perivascular neutrophils increased in parallel with increased MMP9, known to promote revascularization at injury sites³⁴,

and could suggest a possible role for neutrophils in vascular remodeling. It was previously shown that neutrophils facilitate monocyte recruitment, likely explaining increased numbers of monocytes in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats³⁵. Finally, inflammation activation could also be due to defective autophagy in *Gcn2*^{-/-} rats. Ravindran *et al.* demonstrated an enhanced inflammatory response in the gut of *Gcn2*^{-/-} mice following dextran sodium sulfate (DSS) oral administration that was due to absent autophagy activation¹³. Consistent with their results, we found that autophagy was not induced in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} rats in contrast to WT. These results were obtained at the protein level on key elements from these two pathways.

Endothelial cells (ECs) play a major role in vascular remodeling and several genes of interest were strongly modulated in this cell population. We observed a major increase in *Lrg1* gene expression in ASNase-treated *Gcn2*^{-/-} mutant rats. LRG1 is mitogenic for endothelial cells in the presence of TGF- β 1 and induces angiogenesis. Owing to its interaction with endoglin, LRG1 increases both endothelial TGF- β type II receptor, as well as ALK1 activation and signaling, by activating the Smad1/5/8 pathway³⁶. More recently, Singhal *et al.* showed that in the presence of a primary tumor, ECs transcriptionally induced *LRG1* expression, and LRG1 was increased in the serum of cancer patients³⁷. They also demonstrated that LRG1 increased the number of NG2⁺ perivascular cells. *Lrg1* upregulation in lungs from *Gcn2*-deficient rats under stress conditions might offer a clue to understanding the large ECs proliferation conferring a capillary hemangiomatosis aspect observed in some patients with hPVOD. *BMPR2* and *endoglin*, two genes involved in BMP signaling in endothelial cells and linked to hereditary predisposition to PAH development, were found upregulated in endothelial cells from *Gcn2* mutant rats under basal conditions. In contrast to our results, *BMPR2* was found decreased in a rat model of PVOD induced by an alkylating agent³⁸. Our results also suggest an activation of endothelial cells through IL-6 and E-selectin as RNAseq

revealed that their transcripts were increased. E-selectin increase in endothelial cells mediates rolling along the activated endothelium, neutrophil chemoattraction, and capture likely participating to neutrophil recruitment in *Gcn2* deficient rats^{39,40}.

There are some limitations to our study that must be discussed. The first is the absence of PVOD development in *Gcn2*-deficient rats, which prevented the observation of the molecular and cellular events associated with vascular remodeling. The scRNAseq experiments might have been biased if all lung cell populations had not been correctly extracted and included in the analysis. However, we conducted the study in accordance with standard protocols for lung experiments. Finally, although some gene modulations were integrated into gene networks likely involved in the ASNase treatment stress response in *Gcn2*-deficient rats, in view of severe physiological consequences, other gene alterations could be secondary to this metabolic catastrophe and non-lung tissue failures, and may be difficult to interpret. Therefore, either there was an integrated regulatory system present that we do not yet understand, or several genes were increased due to compromised systemic physiological status. The *Gcn2*-deficient rodent model characterized by a major difference compared with human subjects carrying biallelic *GCN2* deficiency, because severe PVOD usually occurs early in life, even in neonates, despite the absence of an identifiable trigger. We cannot eliminate a specific and unidentified inducing factor involved in humans to which the experimental rats have not been exposed, although we used several conditions to attempt to induce PVOD. Another hypothesis could refer to a specific inflammatory factor involved in the development of vascular remodeling in humans, which could be absent in rodents.

Our results suggest that the activation of the lung's innate immune system in response to metabolic stress in *Gcn2*-deficient rats is the combination of calprotectin-induced TLR pathway activation associated with neutrophil recruitment during apoptosis, and autophagy deficiency. Importantly, we propose a new role for GCN2 in adaptive immunity involving T cell development under basal

conditions, independent to amino acid starvation. These results suggest that GCN2 has an additional role to its amino acid sensor function which should be further investigated.

REFERENCES

1. Montani D, Lau EM, Dorfmüller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, Perros F, Nossent E, Garcia G, Parent F, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2016;47:1518–1534.
2. Mandel J, Mark EJ, Hales CA. Pulmonary Venno-occlusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000;162:1964–1973.
3. Ranchoux B, Günther S, Quarck R, Chaumais M-C, Dorfmüller P, Antigny F, Dumas SJ, Raymond N, Lau E, Savale L, Jaïs X, Sitbon O, Simonneau G, Stenmark K, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Montani D, Perros F. Chemotherapy-Induced Pulmonary Hypertension. *The American Journal of Pathology*. 2015;185:356–371.
4. Montani D, Lau EM, Descatha A, Jaïs X, Savale L, Andujar P, Bensefa-Colas L, Girerd B, Zendah I, Le Pavec J, Seferian A, Perros F, Dorfmüller P, Fadel E, Soubrier F, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Occupational exposure to organic solvents: a risk factor for pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J*. 2015;46:1721–1731.
5. Montani D, Achouh L, Dorfmüller P, Le Pavec J, Sztrymf B, Tchérakian C, Rabiller A, Haque R, Sitbon O, Jaïs X, Darteville P, Maître S, Capron F, Musset D, Simonneau G, Humbert M. Pulmonary Venno-Occlusive Disease: Clinical, Functional, Radiologic, and Hemodynamic Characteristics and Outcome of 24 Cases Confirmed by Histology. *Medicine*. 2008;87:220–233.
6. Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, Chelghoum N, Coulet F, Bonnet D, Dorfmüller P, Fadel E, Sitbon O, Simonneau G, Tregouët D-A, Humbert M, Soubrier F. EIF2AK4 mutations cause pulmonary venno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nature Genetics*. 2013;46:65.
7. Zhang P, McGrath BC, Reinert J, Olsen DS, Lei L, Gill S, Wek SA, Vattem KM, Wek RC, Kimball SR, Jefferson LS, Cavener DR. The GCN2 eIF2 Kinase Is Required for Adaptation to Amino Acid Deprivation in Mice. *Molecular and Cellular Biology*. 2002;22:6681–6688.
8. Masson GR. Towards a model of GCN2 activation. *Biochemical Society Transactions*. 2019;47:1481–1488.
9. Manaud G, Nossent EJ, Lambert M, Ghigna M-R, Boët A, Vinhas M-C, Ranchoux B, Dumas SJ, Courboulin A, Girerd B, Soubrier F, Bignard J, Claude O, Lecerf F, Hautefort A, Florio M, Sun B, Nadaud S, Verleden SE, Remy S, Anegon I, Bogaard HJ, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Vonk Noordegraaf A, Grünberg K, Humbert M, Montani D, Dorfmüller P, Antigny F, Perros F. Comparison of Human and Experimental Pulmonary Venno-Occlusive Disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2020;63:118–131.
10. Castilho BA, Shanmugam R, Silva RC, Ramesh R, Himme BM, Sattlegger E. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843:1948–1968.

11. Romano PR, Garcia-Barrio MT, Zhang X, Wang Q, Taylor DR, Zhang F, Herring C, Mathews MB, Qin J, Hinnebusch AG. Autophosphorylation in the activation loop is required for full kinase activity in vivo of human and yeast eukaryotic initiation factor 2alpha kinases PKR and GCN2. *Mol Cell Biol*. 1998;18:2282–2297.
12. Battu S, Afroz S, Giddaluru J, Naz S, Huang W, Khumukcham SS, Khan RA, Bhat SY, Qureshi IA, Manavathi B, Khan AA, August A, Hasnain SE, Khan N. Amino acid starvation sensing dampens IL-1 β production by activating riboclustering and autophagy. *PLoS Biol*. 2018;16:e2005317.
13. Ravindran R, Loebbermann J, Nakaya HI, Khan N, Ma H, Gama L, Machiah DK, Lawson B, Hakimpour P, Wang Y, Li S, Sharma P, Kaufman RJ, Martinez J, Pulendran B. The amino acid sensor GCN2 controls gut inflammation by inhibiting inflammasome activation. *Nature*. 2016;531:523–527.
14. Zaragosi LE, Deprez M, Barbry P. Using single-cell RNA sequencing to unravel cell lineage relationships in the respiratory tract. *Biochem Soc Trans*. 2020;48:327–336.
15. Gerbe F, Brulin B, Makrini L, Legraverend C, Jay P. DCAMKL-1 Expression Identifies Tuft Cells Rather Than Stem Cells in the Adult Mouse Intestinal Epithelium. *Gastroenterology*. 2009;137:2179–2180.
16. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature*. 2018;560:494–498.
17. Chakrabarti S, Zee JM, Patel KD. Regulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in TNF-stimulated neutrophils: novel pathways for tertiary granule release. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;79:214–222.
18. Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, Vignali DAA. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target. *Immunol Rev*. 2017;276:80–96.
19. Bae J, Lee SJ, Park C-G, Lee YS, Chun T. Trafficking of LAG-3 to the Surface on Activated T Cells via Its Cytoplasmic Domain and Protein Kinase C Signaling. *J*. 2014;193:3101–3112.
20. Bunpo P, Cundiff JK, Reinert RB, Wek RC, Aldrich CJ, Anthony TG. The eIF2 Kinase GCN2 Is Essential for the Murine Immune System to Adapt to Amino Acid Deprivation by Asparaginase1–3. *The Journal of Nutrition*. 2010;140:2020–2027.
21. Van de Velde L-A, Guo X-ZJ, Barbaric L, Smith AM, Oguin TH, Thomas PG, Murray PJ. Stress Kinase GCN2 Controls the Proliferative Fitness and Trafficking of Cytotoxic T Cells Independent of Environmental Amino Acid Sensing. *Cell Reports*. 2016;17:2247–2258.
22. Sundrud MS, Korolov SB, Feuerer M, Calado DP, Kozhaya AE, Rhule-Smith A, Lefebvre RE, Unutmaz D, Mazitschek R, Waldner H, Whitman M, Keller T, Rao A. Halofuginone

Inhibits TH17 Cell Differentiation by Activating the Amino Acid Starvation Response. *Science*. 2009;324:1334–1338.

23. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadis G, Liakopoulos V, Tsogka K, Sounidaki M, Stefanidis I. Differential effects of the two amino acid sensing systems, the GCN2 kinase and the mTOR complex 1, on primary human alloreactive CD4⁺ T-cells. *International Journal of Molecular Medicine*. 2016;37:1412–1420.
24. Munn DH, Sharma MD, Baban B, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Mellor AL. GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*. 2005;22:633–642.
25. Wilson GJ, Bunpo P, Cundiff JK, Wek RC, Anthony TG. The eukaryotic initiation factor 2 kinase GCN2 protects against hepatotoxicity during asparaginase treatment. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. 2013;305:E1124–E1133.
26. Phillipson-Weiner L, Mirek ET, Wang Y, McAuliffe WG, Wek RC, Anthony TG. General control nonderepressible 2 deletion predisposes to asparaginase-associated pancreatitis in mice. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016;310:G1061–G1070.
27. Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, Métivier D, Larochette N, van Endert P, Ciccocanti F, Piacentini M, Zitvogel L, Kroemer G. Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med*. 2007;13:54–61.
28. Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, Yang H, Amigorena S, Ryffel B, Barrat FJ, Saftig P, Levi F, Lidereau R, Nogues C, Mira J-P, Chompret A, Joulin V, Clavel-Chapelon F, Bourhis J, André F, Delaloge S, Tursz T, Kroemer G, Zitvogel L. Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med*. 2007;13:1050–1059.
29. Ravishankar B, Liu H, Shinde R, Chaudhary K, Xiao W, Bradley J, Koritzinsky M, Madaio MP, McGaha TL. The amino acid sensor GCN2 inhibits inflammatory responses to apoptotic cells promoting tolerance and suppressing systemic autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015;112:10774–10779.
30. Krysko DV, Kaczmarek A, Krysko O, Heyndrickx L, Woznicki J, Bogaert P, Cauwels A, Takahashi N, Magez S, Bachert C, Vandenabeele P. TLR-2 and TLR-9 are sensors of apoptosis in a mouse model of doxorubicin-induced acute inflammation. *Cell Death Differ*. 2011;18:1316–1325.
31. Pruenster M, Kurz ARM, Chung K-J, Cao-Ehlker X, Bieber S, Nussbaum CF, Bierschenk S, Eggersmann TK, Rohwedder I, Heinig K, Immler R, Moser M, Koedel U, Gran S, McEver RP, Vestweber D, Verschoor A, Leanderson T, Chavakis T, Roth J, Vogl T, Sperandio M. Extracellular MRP8/14 is a regulator of β 2 integrin-dependent neutrophil slow rolling and adhesion. *Nat Commun*. 2015;6:6915.

32. Vogl T, Ludwig S, Goebeler M, Strey A, Thorey IS, Reichelt R, Foell D, Gerke V, Manitz MP, Nacken W, Werner S, Sorg C, Roth J. MRP8 and MRP14 control microtubule reorganization during transendothelial migration of phagocytes. *Blood*. 2004;104:4260–4268.
33. Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, Tessier PA. Proinflammatory Activities of S100: Proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 Induce Neutrophil Chemotaxis and Adhesion. *J Immunol*. 2003;170:3233–3242.
34. Christoffersson G, Vågesjö E, Vandooren J, Lidén M, Massena S, Reinert RB, Brissova M, Powers AC, Opdenakker G, Phillipson M. VEGF-A recruits a proangiogenic MMP-9–delivering neutrophil subset that induces angiogenesis in transplanted hypoxic tissue. *Blood*. 2012;120:4653–4662.
35. Soehnlein O, Zerneck A, Eriksson EE, Rothfuchs AG, Pham CT, Herwald H, Bidzhekov K, Rottenberg ME, Weber C, Lindbom L. Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes. *Blood*. 2008;112:1461–1471.
36. Wang X, Abraham S, McKenzie JAG, Jeffs N, Swire M, Tripathi VB, Luhmann UFO, Lange CAK, Zhai Z, Arthur HM, Bainbridge J, Moss SE, Greenwood J. LRG1 promotes angiogenesis by modulating endothelial TGF- β signalling. *Nature*. 2013;499:306–311.
37. Singhal M, Gengenbacher N, Abdul Pari AA, Kamiyama M, Hai L, Kuhn BJ, Kallenberg DM, Kulkarni SR, Camilli C, Preuß SF, Leuchs B, Mogler C, Espinet E, Besemfelder E, Heide D, Heikenwalder M, Sprick MR, Trumpp A, Krijgsveld J, Schlesner M, Hu J, Moss SE, Greenwood J, Augustin HG. Temporal multi-omics identifies LRG1 as a vascular niche instructor of metastasis. *Sci Transl Med*. 2021;13:eabe6805.
38. Perros F, Günther S, Ranchoux B, Godinas L, Antigny F, Chaumais M-C, Dorfmueller P, Hautefort A, Raymond N, Savale L, Jaïs X, Girerd B, Cottin V, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M, Montani D. Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation*. 2015;132:834–847.
39. Lawrence MB, Springer TA. Neutrophils roll on E-selectin. *J Immunol*. 1993;151:6338–6346.
40. Meizlish ML, Franklin RA, Zhou X, Medzhitov R. Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annu Rev Immunol*. 2021;39:557–581.

FIGURES

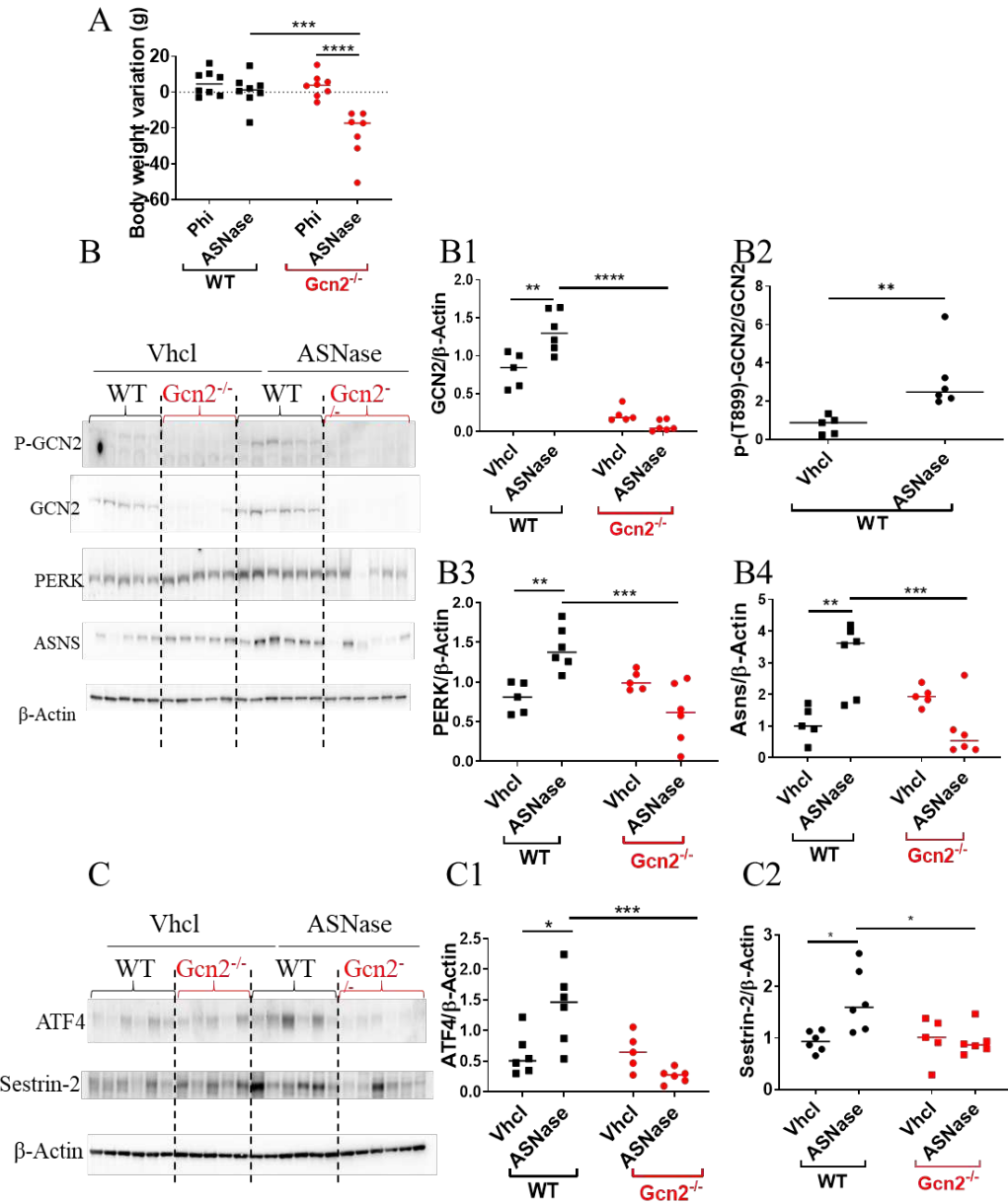


Figure 1. The integrated stress response is induced in WT rat lungs after systemic asparaginase exposure.

(A) Bodyweight loss three days after a single injection of either asparaginase (ASNase; 75 units per kilogram body weight) or physiological serum in both WT rats (WT) and Gcn2 KO rats (Gcn2^{-/-}). (B) Pulmonary levels of phospho-GCN2 protein (general control nonderepressible 2; B1), GCN2 (B2), PERK [(PKR)-like endoplasmic reticulum kinase; B3] and ASNS (asparagine synthetase; B4) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and Gcn2^{-/-} genotypes. (C) Pulmonary

levels of ATF4 (activating transcription factor 4; C1) and Sestrin-2 (C2) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and *Gcn2*^{-/-} genotypes. β -Actin was used as the loading control. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ by two-way ANOVA test, except for B2: Mann-Whitney U test.

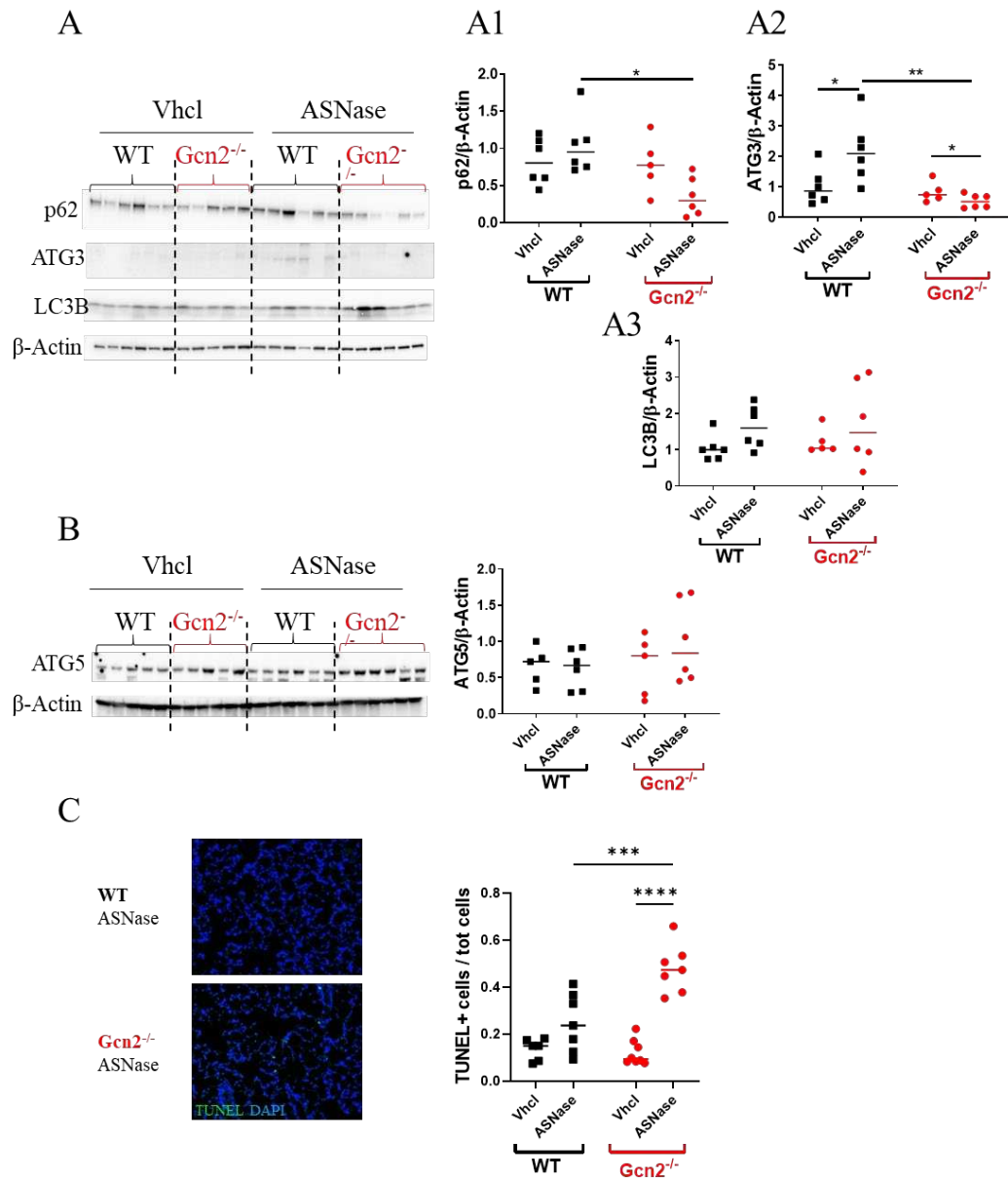


Figure 2. Deficient autophagy and increased apoptosis in lungs from asparaginase-treated *Gcn2*-deficient rats. (A) Pulmonary levels of p62 (A1), ATG3 (A2), and LC3B (A3) were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and *Gcn2*^{-/-} genotypes. (B) Pulmonary levels of

ATG5 were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats of both WT and *Gcn2*^{-/-} genotypes. β -Actin was used as the loading control. (C) Immunofluorescent TUNEL staining of rat lungs (green, apoptosis marker). To quantify pulmonary apoptosis, the ratio of TUNEL⁺ cells per total (DAPI⁺) cell number was calculated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$ by two-way ANOVA test.

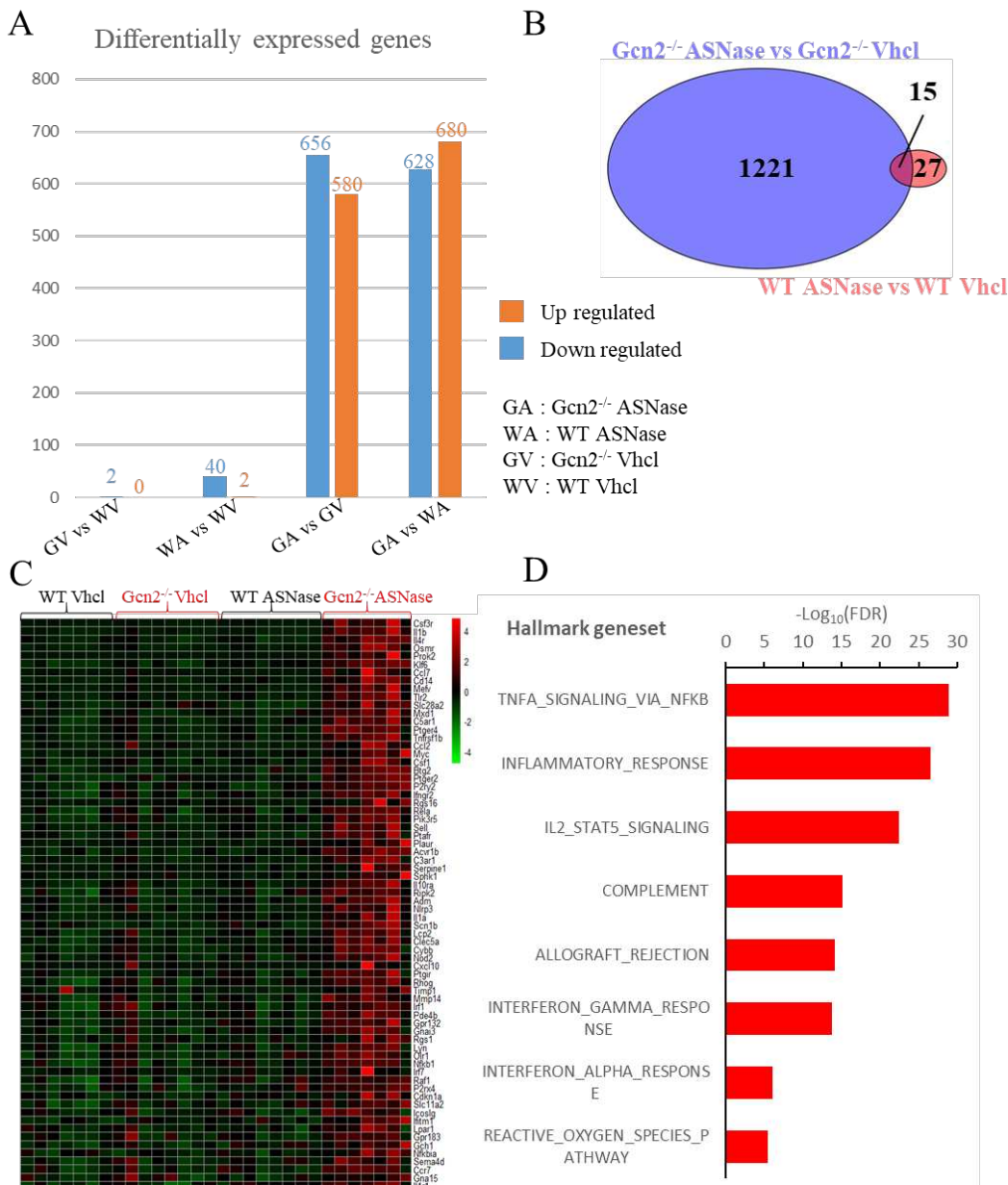


Figure 3. Transcriptional profiling of lungs three days after a single injection of either asparaginase or physiological serum in both wild-type rats (WT) or *Gcn2* KO rats (*Gcn2*^{-/-}). (A) Differentially expressed

genes that are significantly either up- or downregulated between all experimental groups. (B) Venn diagram shows the number of genes altered by asparaginase treatment, with 1221 genes categorized as unique to ASNase-treated Gcn2^{-/-} rats, 27 genes unique to ASNase-treated WT rats, and 15 genes common to both ASNase-treated genotypes. (C) Heatmap representation of upregulated genes in asparaginase-treated Gcn2^{-/-} rats classified by the Hallmark_inflammatory response gene set in all experiment groups. (D) Hallmark geneset enrichment analysis of asparaginase-treated Gcn2^{-/-} rats versus asparaginase-treated WT rats showing the most significantly upregulated pathways.

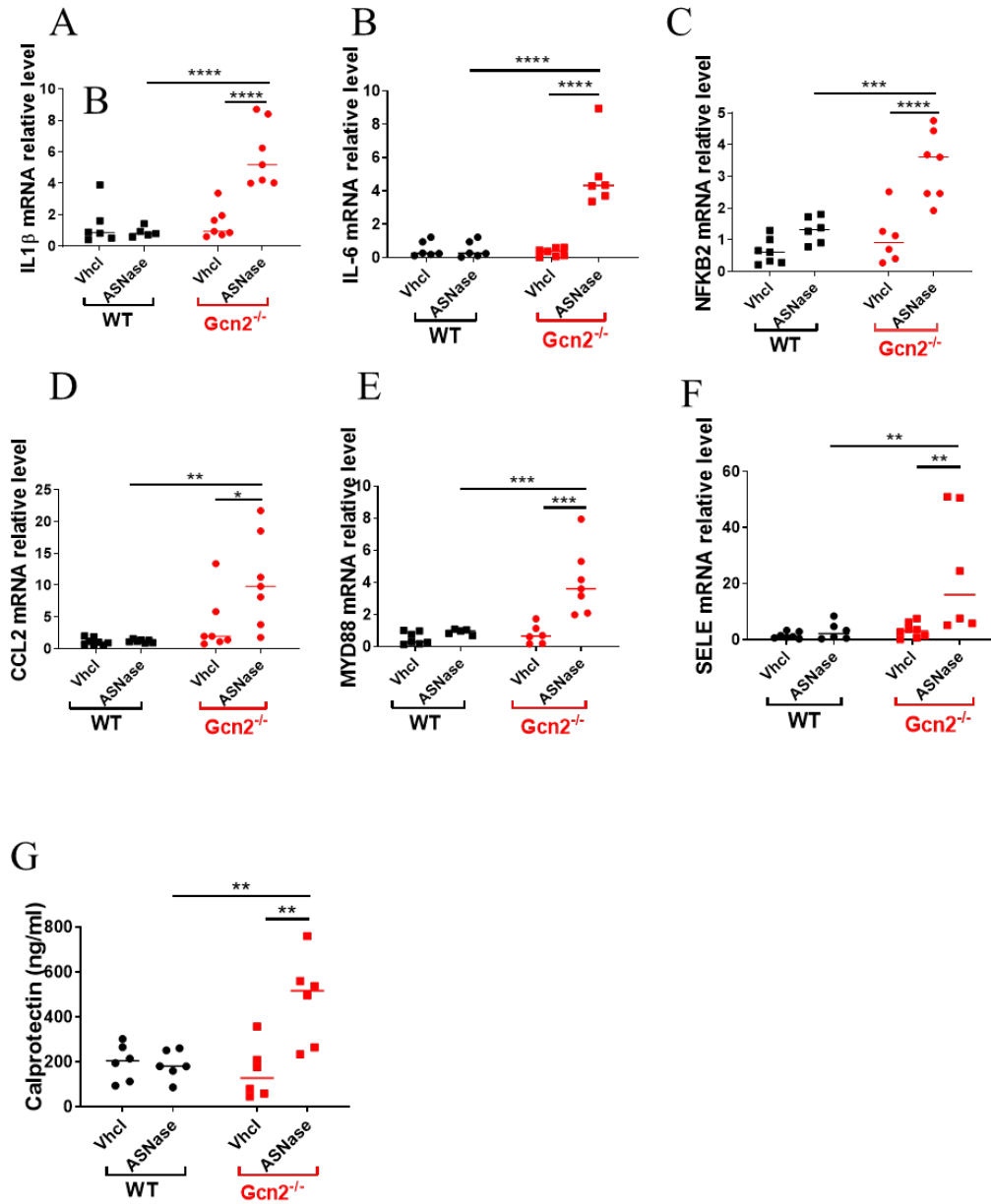


Figure 4. Asparaginase treatment induces inflammation in *Gcn2*-deficient rats (*Gcn2*^{-/-}). (A) Gene expression of Il1β (B) Il6, (C) Nfkb2, (D) Ccl2, (E) Myd88, and Sele (F) in rat lungs measured by RT-qPCR. Each mRNA from a single biological sample was measured in triplicate, normalized to 18S ribosomal RNA, and means of triplicate values are compared. Results were obtained by the comparative Ct method and are expressed as fold change with respect to the experimental control. (G) Calprotectin concentration in the serum measured by ELISA. *p<0.05, **p<0.005, ***p<0.0005, ****p<0.0001 by two-way ANOVA test.

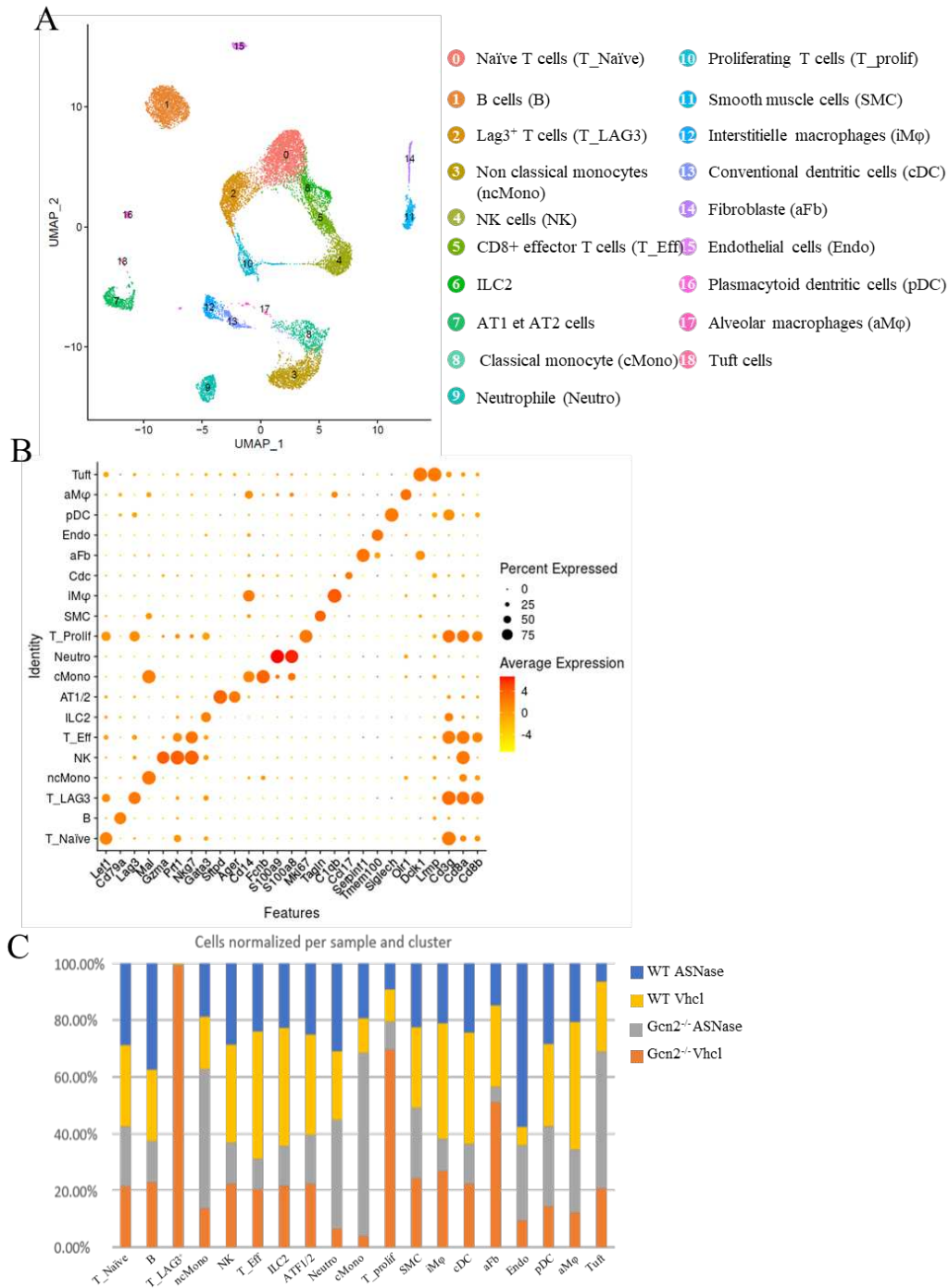


Figure 5. scRNA-seq identifies different cellular landscapes in the lungs of Gcn2-deficient rats and WT rats with either asparaginase treatment or under basal conditions. (A) UMAP projection of 18,201 lung cells from 12 rats showing the formation of 19 clusters. (B) Dot plot displaying average expression of discriminative marker genes used to identify cell clusters in (A). Dot size corresponds to percentage of

cells expressing a gene in the cluster (C). Bar chart highlighting the percentage of cells per sample within each cell type cluster (WT rats treated with asparaginase in blue, WT rats treated with physiological serum in yellow, Gcn2-deficient rats treated with asparaginase in grey, and Gcn2-deficient rats treated with physiological serum in orange).

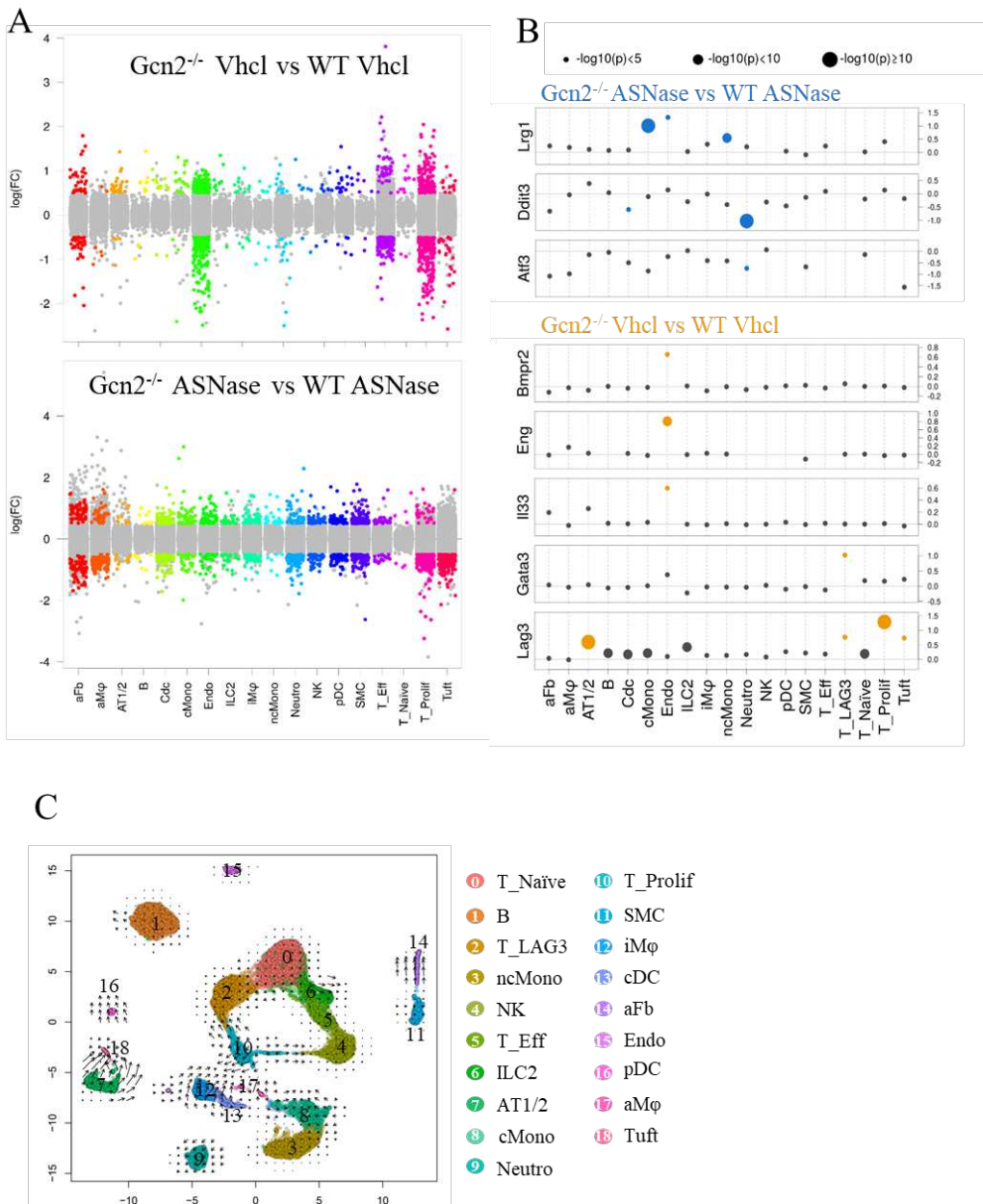


Figure 6. scRNA-seq reveals unique DEGs in cell types of Gcn2^{-/-} rats compared to WT rats. (A) Jitter plot displaying differential gene expression for each cell type of the UMAP projection according to genotype

(Gcn2^{-/-} rats injected with vehicle vs WT rats injected with vehicle) or according to asparaginase treatment and genotype (Gcn2^{-/-} rats treated with asparaginase vs WT rats treated with asparaginase). Each dot represents genes distributed according to the log (fold change) of a gene. Dots with FDR < 0.05 are in color. Grey dots were not significant. (B) Dot plot presenting differentially expressed genes across cell types enabling the identification of genes whose differential expression was specific to an experiment group and a particular cell type. (C) RNA velocity analysis is defined as the time derivative of the gene expression state and is used to predict the future transcriptional state of cells. The arrows represent extrapolated future states.

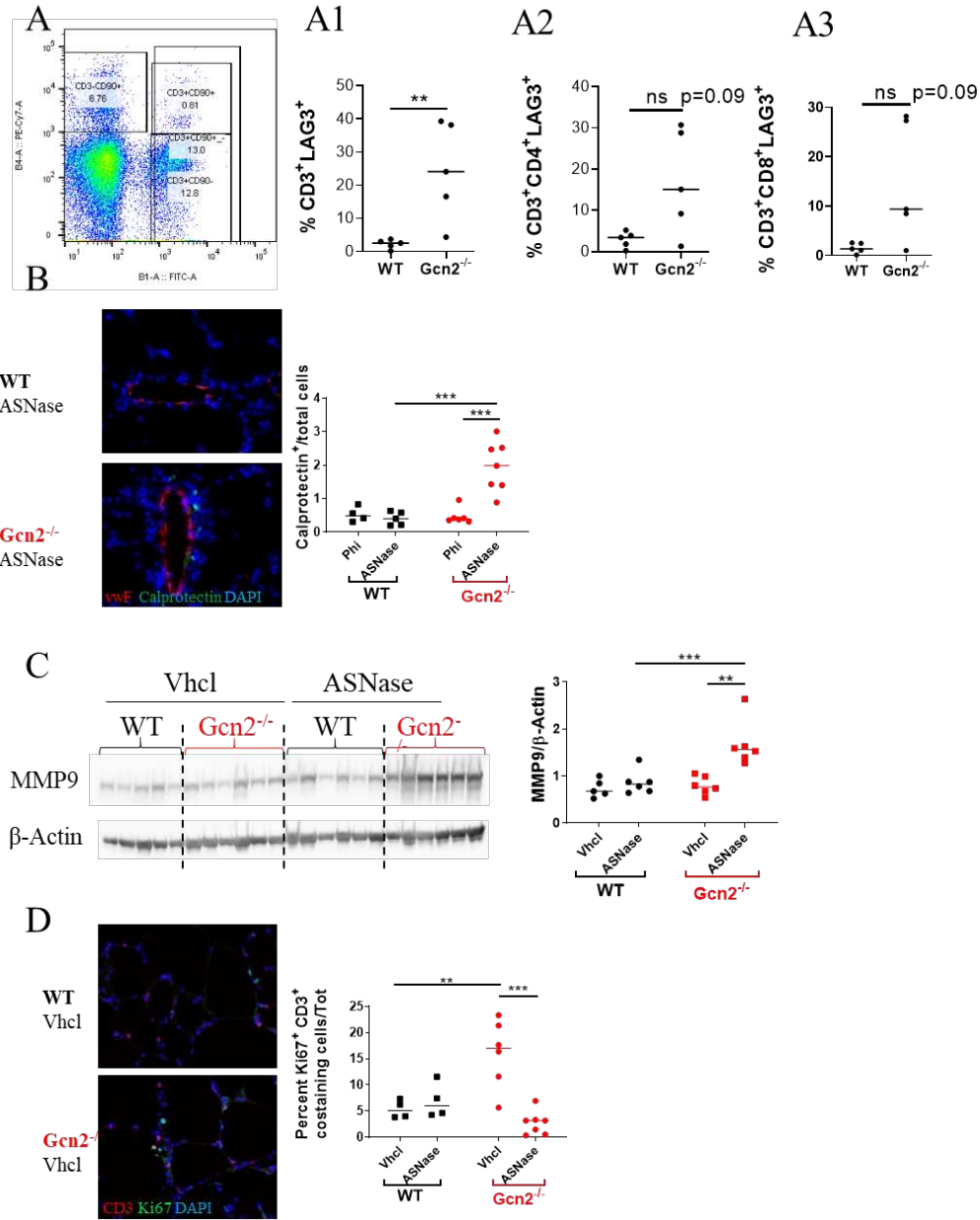


Figure 7. Flow cytometry and immunofluorescence validate scRNA-seq cell type identities. (A) Flow cytometry analysis of pulmonary cells from Gcn2-deficient rats and WT rats under basal conditions confirmed (A1) the increased population of CD3⁺ LAG3⁺ cells in unstressed Gcn2-deficient rats. This analysis enabled us to confirm that the increase of LAG3⁺ T cells occurs in both CD4⁺ (A2) and CD8⁺ (A3) T cells. (B) Immunofluorescent staining of rat lungs for calprotectin (green) and von Willebrand Factor (vWF; endothelial marker; red). To quantify calprotectin⁺ cells, the ratio of calprotectin⁺ cells over total

(DAPI+) cells was calculated. (C) Pulmonary levels of MMP9 were analyzed by Western blotting in control and asparaginase-treated rats for both WT and Gcn2^{-/-} genotypes. β -Actin was used as the loading control. (D) Immunofluorescent staining of rat lungs for Ki67 (proliferation marker; green) and CD3 (lymphocyte T cell marker; red). To quantify proliferating CD3⁺ cells, the ratio of double-positive Ki67⁺ CD3⁺ cells over total cells was calculated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$ by two-way ANOVA test, except for (A1), (A2), and (A3): Mann Whitney U test.

Online Supplement Data

***Gcn2* deficient rat display lung molecular and cellular dysregulation in basal and stress conditions**

Juliette Bignard, Fabrice Atassi, Olivier Claude, Maria-Rosa Ghigna, Nathalie Mougenot, **Bahgat Soilih Abdoukarim**, Florence Deknuydt, Aurélie Gestin, David Montani, Sophie Nadaud, Florent Soubrier, Frédéric Perros

Methods

Animals - Rats were housed at the Sorbonne-University (SU) animal core facility. The animal facility is licensed by the French Ministry of Agriculture (agreement N°B751320). This study was approved by the Animal Experiments Ethics Committee (authorization N°APAFIS#20355-2019042316587189v5). All efforts were made to minimize animal suffering. The rats were housed in a controlled environment (temperature $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 12-h light/dark cycle).

Histopathology – Paraformaldehyde-fixed histological samples were embedded in paraffin, and serial sections of 5 μm were obtained from lung tissues. Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) staining. Lung samples from all rats were retrospectively analyzed in a blinded fashion by conventional light microscopy.

Western blots – Proteins from rats' lung-tissues were extracted in lysis buffer containing 1% Igepal®, 20 mmol/L Tris-HCl, 137 mmol/L NaCl, 10% glycerol, 2 mmol/L EDTA, 1 mmol/L Na_3VO_4 , leupeptin 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, pepstatin 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, aprotinin 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, and a protease-inhibitor cocktail (aprotinin, leupeptin, and Pefabloc® [Roche]). A total of 50 μg of protein were separated on SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. After blocking, membranes were incubated in 5% BSA in TBS 0.1% Tween-20 overnight at 4°C with primary antibodies –described in the table E3. Blots were incubated with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse diluted 1:1000 (Bio-technie) or with HRP-conjugated goat anti-rabbit diluted 1:1000 (Bio-technie). Immuno-reactive bands were revealed using ECL reagents (Biorad). Image-J Software was used to quantify the level of protein expression.

Immunofluorescence labeling – Cryosections of 10 μm thickness were fixed in formalin (10 min at RT). They were then permeabilized in methanol/acetone (1:1) (10 min at -20°C). Nonspecific binding was blocked with 5% bovine serum albumin (BSA) and 10% goat serum in PBS (1 h at

RT) and sections were incubated with primary antibodies diluted in 5% BSA and 3% goat serum described in Table E3 overnight at 4°C. Secondary antibodies (anti-mouse or anti-rabbit fluorophore-coupled, depending on the antigen tested) were diluted in 5% BSA and 3% goat serum and incubated 1 h at room temperature (RT). Immunolabeled sections were mounted with Dako fluorescent mounting medium (Dako) and examined under a confocal microscope (Leica SPE confocal microscope). Control sections were stained by omitting primary antibodies and did not show labeling. For positive cell counting, images were analyzed by an investigator blinded to the experimental status of animals. A total of 20 to 40 fields were analyzed per animal.

RNA preparation and RNAseq analysis - Total RNA was extracted from frozen lung samples using the mirVANA extraction kit (Invitrogen) followed by DNase treatment. RNA quality was assessed on TapeStation (Agilent technologies) and only samples with an RNA Integrity Number (RIN) > 6 were used. cDNA libraries were constructed with 100 ng total RNA input following the manufacturer's recommendations (KAPA mRNA Hyper Prep from Roche). Raw data quality was evaluated with FastQC. Poor quality sequences were trimmed or removed with the fastp tool using default parameters. The Illumina DRAGEN bio-IT platform (v3.7.5) was used for mapping onto the Rnor_6.0 reference genome and quantified with the gencode v32 annotation gtf file. Library orientation, library composition, and coverage along transcripts were checked with Picard tools. Analyses were conducted with R software. Data were normalized with DESeq2 (v1.26.0) bioconductor packages, prior to differential analysis with the DESeq2 workflow. Multiple hypotheses adjusted p-values were calculated with the Benjamini-Hochberg procedure to control FDR. Finally, enrichment analysis was conducted using the clusterProfiler R package (v3.14.3) with Gene Set Enrichment Analysis, with gene ontology database and KEGG pathways.

scRNA-Seq data analyses - Sequencing data quality analysis was performed using FastQC v0.11.2 on four rat samples. For read alignment and unique molecular identifiers (UMI) quantification, Cell Ranger software v3.0.2 was used with the *Rattus Norvegicus* genome Rnor_06 with default parameters and gene annotation from Ensembl 100. The four expression matrices containing UMI counts were merged, and only the genes with $UMI \geq 1$ in at least one cell were kept. The following filters were applied to generate a global matrix used in further analysis: cells with $UMI \geq 2000$, number of detected genes ≥ 800 , and cells with UMI in mitochondrial genes $\leq 10\%$. For UMIs normalization, Seurat 3.1.1 was used¹, and global-scaling normalization method was applied with a scale factor of 10,000 and log-transformation of data. This was followed by a scaling linear transformation step, to avoid highly-expressed genes having higher weight in downstream analysis.

Clustering and marker genes - PCA was performed on the scaled data, with a Jackstraw plot to choose how many principal components (PCs) to retain as an input for the Seurat clustering step. The clustering step was performed using default parameters, with the Louvain algorithm as the clustering method, 10 PCs and a resolution parameter defining the clusters granularity set to 0.6. Marker genes defining each cluster were found via differential expression testing, with a Wilcoxon rank sum test and a log fold change threshold of 1.

Trajectory analysis of scRNAseq data- Monocle-2 single-cell trajectory was constructed using M3Drop² and Monocle 2.10.1³. Input genes for Monocle trajectory construction were selected using an unsupervised approach via M3Drop result, which identifies differentially expressed genes based on a Michaelis-Menten function for the relationship between mean expression and dropout rate, the relevant genes being those shifting above a fitted curve. The default Monocle workflow was then performed to generate the trajectories. For RNA Velocity⁴, spliced and unspliced expression matrices were generated using the standard Velocity pipeline. Loom files were merged using the loompy package on Python. R packages velocity.R and SeuratWrappers were then used

to estimate RNA velocity vectors with velocity parameters $kCells = 25$, $fit.quantile = 0.2$ and $\Delta T = 1$, and visualization parameters $n = 200$, $grid.n = 40$, $arrow.scale = 3$, and $scale = \text{“sqrt.”}$

Enrichment analysis - Analysis for enriched GO terms, KEGG pathways, and REACTOME pathways were performed using the WebGestaltR package⁵, on databases from the *Mus musculus* organism. GO terms and pathways were considered as enriched if fold enrichment ≥ 2.0 , uncorrected p-value ≤ 0.05 , and the minimum number of regulated genes in pathway/term ≥ 2.0 .

mRNA expression levels by Real Time Quantitative PCR - Total RNA was extracted as described above. A total of 1 μg of purified RNA was reverse transcribed using the M-MLV cDNA Reverse Transcription kit (Invitrogen). Relative mRNA expression levels were determined by quantitative PCR using Brilliant III-ultra-fast-SYBR green-qPCR kit (Agilent) on a Lightcycler 480. Each mRNA from a single biological sample was measured in triplicate and normalized to 18S ribosomal RNA. Results were obtained by the comparative Ct method and are expressed as fold change with respect to the experimental control. All primer/probe assays were ordered from Eurogentec. Primer sequences are shown in Table E4.

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) were performed using kits from Fine Biotech for calprotectin according to the manufacturer's instructions. The plates were read using a Flexstation 3 microplate reader at a wavelength of 450 nm.

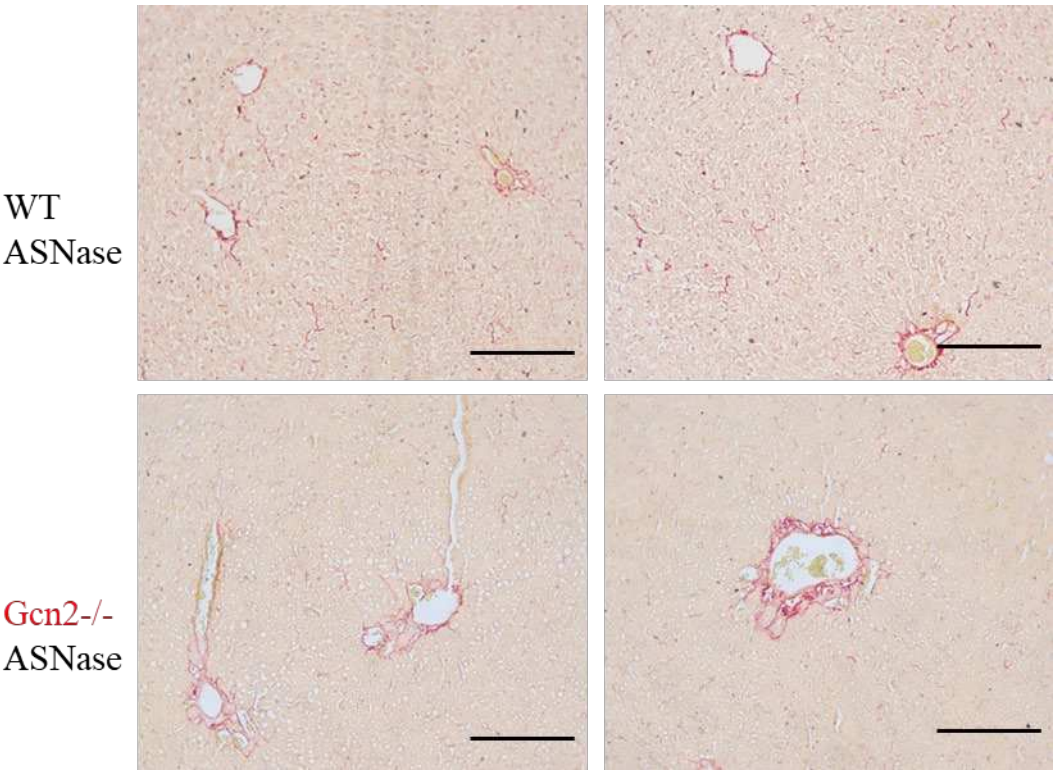
T cell characterization by flow cytometry - Rats were euthanized and after exsanguination, lungs were washed in cold PBS and cut into small pieces (2–3 mm^3). The multi-Tissue Dissociation Kit 2 (Miltenyi biotec) was used in combination with the gentle MACS Dissociator (Miltenyi biotec) according to the manufacturer's instructions. Tissues were passed through a 70- μm cell strainer and washed in 5% HBSS-BSA. Cells were then incubated for 1 min with red blood cell lysis buffer (RBCL, Invitrogen). Isolated rat lung cells were surface stained for 10 min on ice in the dark.

Antibodies used were CD3 Viobright B515, CD4 PerCPVio700, and CD8b APC-Vio770. Viability Fixable Dye Vioblue (Miltenyi biotec) was used on lung cells as a viability cell marker. All the antibodies are described in Table E3. After 30 min fixation with 1% paraformaldehyde, cells were washed with PBS and centrifuged for 5 min at 300g at 4°C. We realized 20 min of permeabilization (0.15% saponin in PBS), and then stained with LAG3 conjugated with PE (phycoerythrin). After washing twice with PBS, all stained cells were resuspended in PBS and acquired by flow cytometry using a MACSQUANT 10 (Miltenyi Biotech) and the results analyzed on FLOWJOX software.

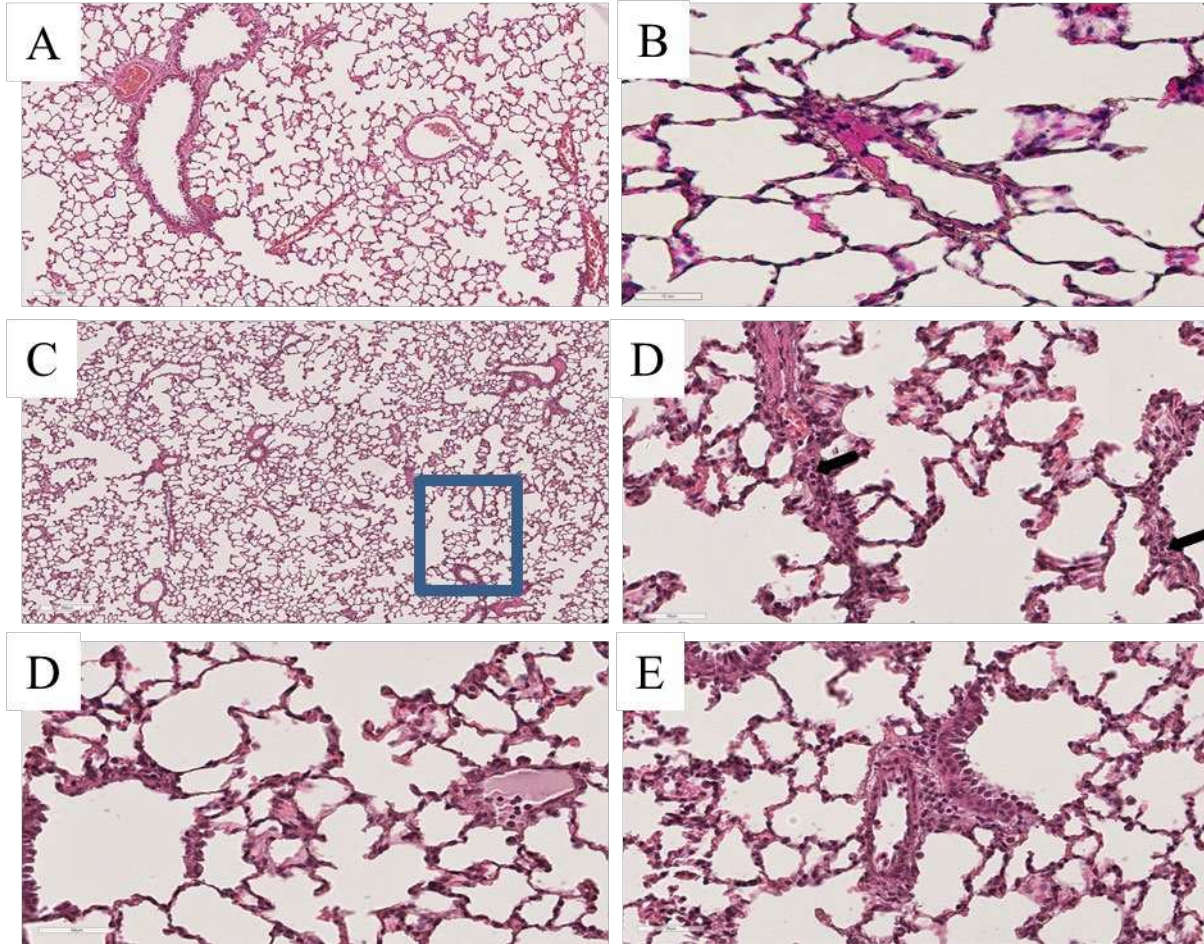
References

1. Butler A, Hoffman P, Smibert P, Papalexi E, Satija R. Integrating single-cell transcriptomic data across different conditions, technologies, and species. *Nat Biotechnol.* 2018;36:411–420.
2. Andrews TS, Hemberg M. M3Drop: dropout-based feature selection for scRNASeq. *Bioinformatics.* 2019;35:2865–2867.
3. Qiu X, Mao Q, Tang Y, Wang L, Chawla R, Pliner HA, Trapnell C. Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods.* 2017;14:979–982.
4. La Manno G, Soldatov R, Zeisel A, Braun E, Hochgerner H, Petukhov V, Lidschreiber K, Kastrioti ME, Lönnerberg P, Furlan A, Fan J, Borm LE, Liu Z, van Bruggen D, Guo J, He X, Barker R, Sundström E, Castelo-Branco G, Cramer P, Adameyko I, Linnarsson S, Kharchenko PV. RNA velocity of single cells. *Nature.* 2018;560:494–498.
5. Wang J, Vasaikar S, Shi Z, Greer M, Zhang B. WebGestalt 2017: a more comprehensive, powerful, flexible and interactive gene set enrichment analysis toolkit. *Nucleic Acids Res.* 2017;45:W130–W137.

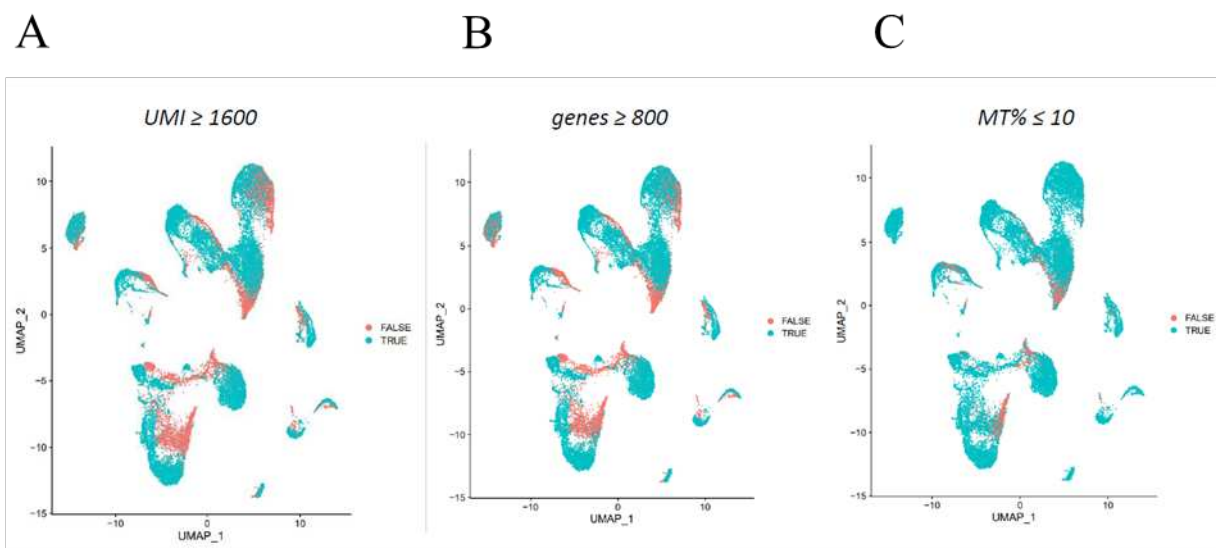
Figures



Supplemental Figure E1. Histopathology of asparaginase-induced liver injury in *Gcn2*-deficient rats. Sirius red stain, 20× magnification. Lipid droplets were observed in livers of asparaginase-treated *Gcn2*-deficient rats, demonstrating steatosis. These lesions were not observed in asparaginase-treated WT rats. Scale: 100 μm.



Supplemental figure E2. Asparaginase induces inflammation in the *Gcn2*^{-/-} rat lungs, with significant perivascular cells infiltration and granulocytes involvement. (A-B) Lungs of WT ASNase displaying normal architecture and vessels. Alveolar spaces are uniform in shape, as well as airways and vessels. No significant inflammatory infiltrate is noticed within interstitium or around bronchial or vascular structures. (C) Lung parenchyma of *Gcn2*^{-/-} ASNase appears more cellular without architectural alteration. Airways and bronchi are uniform, without structural changes. Increased cellularity is noticed in the interstitial compartment and around and within vessels and airways. (D-E) Pulmonary vessel carrying inflammatory infiltration. It is mainly constituted by granulocytes (arrows). No significant vascular remodeling is noticed.

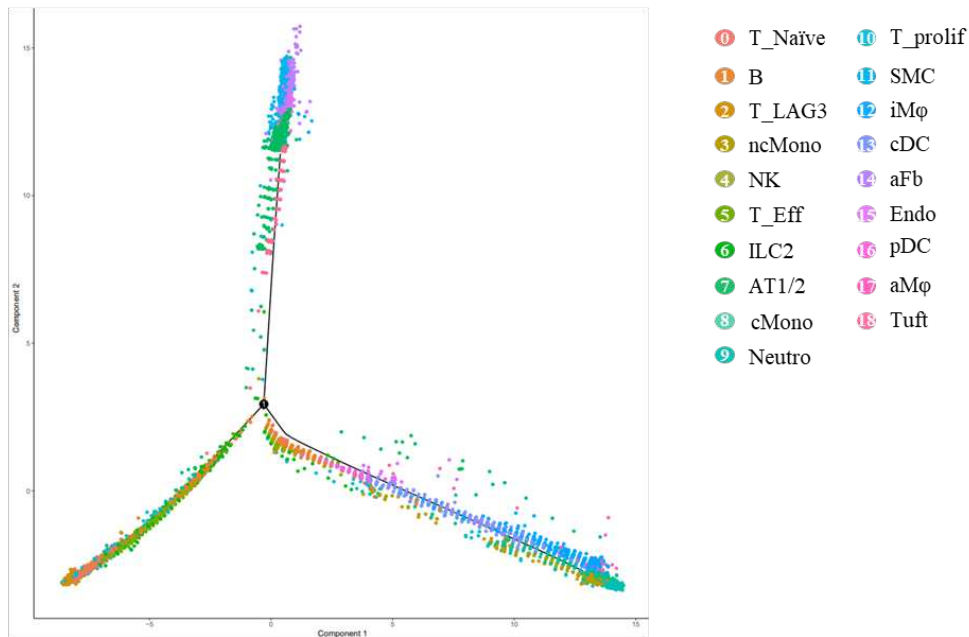


D

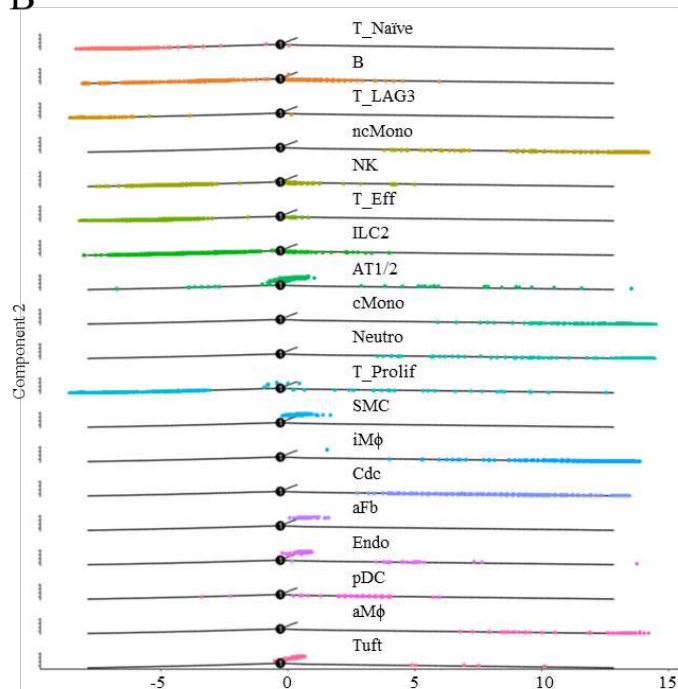
Sample	Cells not passing thresholds	Cells passing thresholds	% cells passing thresholds
WT Vhcl	1604	6927	81,20%
WT ASNase	692	1304	65,30%
Gcn2 ^{-/-} Vhcl	2698	6240	69,80%
Gcn2 ^{-/-} ASNase	639	1218	65,60%

Supplemental Figure E3. scRNA-seq quality control. UMAP showing the 18,201 cells filtered by (A) UMI (Unique Molecular Identifiers) ≥ 1600 , (B) number of genes ≥ 800 , and (C) fraction of mitochondrial genes ≤ 10 detected per cell. (D) Number and percentage of filtered cells for each sample.

A



B



Supplemental Figure E4. The ordering of lung cells in a two-dimensional state-space defined by Monocle-2. Monocle-2 arranged cells along a pseudo-time axis to indicate their position in the transition state. (A) The resulting trajectory has three states and one branch point. All the cells from every cluster were distributed according to their pseudo-time trajectory. (B) 3D representation of cell trajectory for each cluster with three states and one branch per cluster.

Gene	Log ₂ (FC)	FDR
IL6	6,95703244	9,95E-15
IL1B	2,75783596	1,29E-20
MYD88	1,32842492	1,23E-23
TLR2	2,11656774	5,16E-10
TLR9	1,27571497	8,27E-03
TLR10	2,22275414	9,61E-07
TLR11	1,73250092	6,44E-04
S100A8	4,80426536	1,45E-30
S100A9	4,40421913	1,41E-28
SELE	3,30863971	1,23E-14

Supplemental table E1. List of differentially expressed genes between *Gcn2*^{-/-} *ASNase* and *WT ASNase* involved in *TLR* pathway. FC:Fold change. FDR: False Discovery Rate

Pathway Description (KEGG)	Nb Genes in Pathway	Nb Regulated Genes (Up / Down)	P-Value (All)	P-Value (Up)	P-Value (Down)	Min P-Value	min FDR
Estrogen signaling pathway	133	7 (5/2)	1,26E-03	2,75E-05	3,64E-01	2,75E-05	5,55E-03
Ribosome	179	9 (0/9)	3,67E-04	NA	5,64E-05	5,64E-05	3,80E-02
Protein processing in endoplasmic reticulum	164	9 (5/4)	1,92E-04	7,49E-05	7,27E-02	7,49E-05	1,01E-02
Mitophagy	65	6 (2/4)	1,42E-04	1,32E-02	3,47E-03	1,42E-04	2,86E-02
Th17 cell differentiation	109	5 (4/1)	1,10E-02	2,05E-04	6,51E-01	2,05E-04	2,00E-02
Human immunodeficiency virus 1 infection	243	11 (4/7)	2,08E-04	4,03E-03	8,93E-03	2,08E-04	3,45E-02
RNA transport	168	8 (0/8)	1,10E-03	NA	2,13E-04	2,13E-04	6,23E-02
Antigen processing and presentation	101	7 (3/4)	2,43E-04	2,51E-03	1,61E-02	2,43E-04	3,80E-02
Pathways in cancer	533	11 (7/4)	6,41E-02	4,99E-04	7,55E-01	4,99E-04	3,52E-02
Cellular senescence	189	9 (3/6)	5,45E-04	1,42E-02	9,70E-03	5,45E-04	4,68E-02
Endocytosis	275	11 (5/6)	5,94E-04	8,17E-04	4,89E-02	5,94E-04	4,68E-02
Fluid shear stress and atherosclerosis	152	7 (4/3)	2,71E-03	7,25E-04	1,78E-01	7,25E-04	4,55E-02
Glioma	71	4 (3/1)	1,12E-02	9,11E-04	4,95E-01	9,11E-04	5,04E-02
p53 signaling pathway	74	3 (3/0)	6,24E-02	1,03E-03	NA	1,03E-03	5,20E-02
Herpes simplex infection	219	9 (1/8)	1,54E-03	4,48E-01	1,23E-03	1,23E-03	7,50E-02
Hepatocellular carcinoma	180	7 (4/3)	6,80E-03	1,36E-03	2,48E-01	1,36E-03	5,81E-02
Alzheimer disease	185	5 (4/1)	7,76E-02	1,50E-03	8,33E-01	1,50E-03	6,15E-02
Cytosolic DNA-sensing pathway	56	4 (0/4)	4,89E-03	NA	2,01E-03	2,01E-03	1,59E-01
Phototransduction	26	2 (2/0)	4,01E-02	2,20E-03	NA	2,20E-03	7,67E-02

Supplemental table E2. KEGG analysis on differentially expressed genes from population *T_LAG3* between *Gen2^{-/-} Vhcl* and *WT Vhcl* animals

Western Blot						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
p-GCN2		Rabbit		Abcam	ab75836	1/1000
GCN2		Rabbit		Cell signaling technology	3302	1/1000
PERK		Rabbit	C33E10	Cell signaling technology	3192	1/1000
ATF4		Rabbit	D4B8	Cell signaling technology	11815	1/1000
Asns		Rabbit	E6C2C	Cell signaling technology	92479	1/1000
p62		Rabbit		Abcam	ab56416	1/1000
ATG5		Rabbit	D5F5U	Cell signaling technology	12994	1/1000
ATG3		Rabbit		Cell signaling technology	3415	1/1000
LC3B		Rabbit		Cell signaling technology	2775	1/1000
MMP9		Rabbit		Abcam	ab76003	1/1000
β-actin		Mouse		Abcam	ab8227	1/1000

Immunofluorescence						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
Calprotectin		Mouse	MAC387	Invitrogen	MA181381	1/100
vwF		Rabbit		Dako	A0082	1/500
Ki67		mouse	B56	Abcam	ab279653	1/500
CD3		Rabbit	SP7	Abcam	ab16669	1/100
DAPI				Sigma-aldrich	MBD0015	1/1000

Flow cytometry						
Target	Conjugated	Host species	Clone	Supplier	Reference	Concentration
CD3	Viobright B515	Human	REA223	Miltenyi	130-127-365	1/200
CD4	PerCPVio700	Human	REA482	Miltenyi	130-107-627	1/50
CD8b	APC-Vio770	Human	REA222	Miltenyi	130-102-686	1/50
LAG3	PE	Rat	C9B7W	eBiosciences	12-2231-82	1/10
Viobility Fixable Dye	Vioblue			Miltenyi	130-110-205	1/100

Supplemental table E3. Antibodies used for Western blot, Immunofluorescence and flow cytometry

Gene	Primer forward	Primer reverse
IL1 β	GGCATAACAGGCTCATCTGG	ATCTTTTGGGGTCTGTCAGC
IL6	GACAAAGCCAGAGTCATTCAGA	TCCTTAGCCACTCCTTCTGTG
SELE	CCTCGTGCTTTCTCTCTGCT	CCCGTTGACAATACGCACTT
NFKB2	CGTTGCTACGATCCAGGTTT	GCTGTTCCACAATCACCAGA
CCL2	AGCATCCACGTGCTGTCTC	GATCATCTTGCCAGTGAATGAG
MYD88	GAGATCCGCGAGTTTGAGAC	CTGTTTCTGCTGGTTGCGTA
18S	CATTCGAACGTCTGCCCTAT	GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC

Supplemental table E4. Primers sequences for real-time RT-qPCR experiments.

Titre : Etude de la physiopathologie des formes héritable et induite d'hypertension pulmonaire

Mots clés : Hypertension artérielle pulmonaire, Maladie veino-occlusive pulmonaire, Physiopathologie, GCN2, Vasoréactivité, Léflunomide

Résumé : Dans ce manuscrit, sont présentés la circulation pulmonaire et les principaux traits de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), une maladie grave et incurable. Ce travail se focalise sur 2 catégories d'étiologie de l'HTAP : une cause génétique, associée à un sous-groupe d'HTAP, la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP), illustrée par la déficience pour le gène EIF2AK4, et d'autre part, une cause iatrogène de l'HTAP, illustrée par la toxicité potentielle induite par un immunosuppresseur, le léflunomide (LEF).

Mon premier projet était de caractériser la réactivité vasculaire des artères pulmonaires issues des rats dont le gène Eif2ak4, codant pour la protéine kinase GCN2, a été invalidé, en faisant l'hypothèse que la voie du monoxyde d'azote est altérée et participe au défaut de réactivité attendu dans le contexte de la dysfonction de GCN2. Pour ce projet, nous n'avons pas pu mettre en évidence de phénotype particulier en conditions basales. Cependant les données de biologie moléculaire ont montré que GCN2 régule

l'expression de l'enzyme eNOS lorsque ces rats sont traités par l'asparaginase. La création de nouveaux modèles facilitera la recherche en vue d'une élucidation des mécanismes liés à la physiopathologie de la MVOP.

Le 2^e objectif était d'étudier l'effet iatrogène du LEF, un médicament immunomodulateur. Selon des données cliniques, une association possible de ce traitement avec l'HTAP a été identifiée. J'ai recherché les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les effets de ce médicament et de son métabolite, susceptibles d'être associés à la pathogénèse de l'HTAP. L'étude a produit des résultats paradoxaux par rapport à l'étiologie connue de l'HTAP, notamment une inhibition de la contractilité des artères pulmonaires et du profil pro-prolifératif/migratoire des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires. Ce projet ouvre la voie à d'autres recherches afin de mieux comprendre les effets de LEF impliqués directement à l'HTAP.

Title: Study of the heritable- and drug induced-pulmonary hypertension

Keywords: Pulmonary arterial hypertension, Pulmonary veno-occlusive disease, Pathobiology, GCN2, Vasoreactivity, Leflunomide

Summary: This work studied the vascular phenotype of an experimental model mimicking a loss-of-function biallelic mutation in the EIF2AK4 gene encoding the GCN2 protein, responsible for the development of pulmonary veno-occlusive disease in human. Vascular reactivity was not changed in rats deficient for GCN2, but expression of eNOS enzyme was decreased when these rats were acutely treated with asparaginase.

Additionally, the effect of leflunomide, an immunomodulatory drug suspected to cause pulmonary arterial hypertension (PAH), was tested on isolated rat pulmonary arteries and vascular cells. This project yielded unexpected results, showing that leflunomide inhibits vascular contraction and vascular smooth muscle cells proliferation/migration. These data urge for further exploration of the mechanisms involved regarding the development of the disease.