



HAL
open science

Remodelage vasculaire pulmonaire et HTAP : caractérisation des progéniteurs vasculaires pulmonaires PW1+ et régulation par la voie PDGFR α

Julien Solinc

► **To cite this version:**

Julien Solinc. Remodelage vasculaire pulmonaire et HTAP : caractérisation des progéniteurs vasculaires pulmonaires PW1+ et régulation par la voie PDGFR α . Physiologie [q-bio.TO]. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS505 . tel-03850708

HAL Id: tel-03850708

<https://theses.hal.science/tel-03850708v1>

Submitted on 14 Nov 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.



Ecole Doctorale Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique ED 394

Sorbonne Université

Unité de recherche sur les maladies cardiovasculaires et métaboliques

UMR_S 1166

***Remodelage vasculaire pulmonaire et HTAP :
Caractérisation des progéniteurs vasculaires
pulmonaires PW1⁺ et régulation par la voie PDGFR α***

Par Julien SOLINC

Thèse de doctorat de physiologie et physiopathologie

Dirigée par le Dr Sophie NADAUD

Défendue le 14 décembre 2021

Pr Sonia KARABINA : Présidente

Dr Rozenn QUARCK : Rapporteur

Dr Vincent SAUZEAU : Rapporteur

Pr Jean-Baptiste DEMOULIN : Examineur

Dr Christophe GUIGNABERT : Examineur

Dr Thierry JAFFREDO : Examineur

Dr Sophie NADAUD : Directrice de thèse

Pr Florent SOUBRIER : Co-directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de thèse, le Dr Sophie Nadaud pour m'avoir accueilli dans son équipe et avoir dirigé ma thèse. Tout au long de ces années, elle n'a cessé de me pousser à la réflexion, avec parfois plus ou moins de tact et, malgré certains désaccords, nous avons réussi à installer une relation professionnelle ayant permis la réalisation des différents travaux effectués au cours de cette thèse. Je la remercie également pour sa disponibilité car, bien qu'elle pense que je ne l'ai pas suffisamment franchie, la porte de son bureau était toujours ouverte en cas de besoins !

Je remercie le Pr Sonia Karabina pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury lors de ma soutenance de thèse. Je remercie également le Dr Rozenn Quarck et le Dr Vincent Sauzeau d'avoir accepté d'être rapporteurs de mon travail de thèse ainsi que pour le temps consacré à la lecture de mon mémoire et des suggestions faites pour l'améliorer. J'associe à ces remerciements le Pr Jean-Baptiste Demoulin, le Dr Thierry Jaffredo et le Dr Christophe Guignabert pour leur participation au jury en qualité d'examineurs et le temps consacré à la lecture de mon mémoire.

Spéciale dédicace à mon rayon de soleil : Juliette Bignard ! Qu'est-ce que tu as pu m'éblouir au cours de ces 3 années. Blague à part, on a commencé notre thèse en même temps et on la finit ensemble. Même si au début nous ne nous parlions pas autant qu'à la fin (je ne suis pas un homme facile), je pense que l'on a trouvé mutuellement chez l'autre un bon binôme de thèse ! Notre vision du monde de la recherche était similaire, ce qui était pratique lorsqu'on en avait marre et que l'on refaisait le monde. On pouvait échanger sur nos doutes lorsque ça n'allait pas trop et plusieurs fois tu m'as soit calmé soit remotivé. Heureusement, on a aussi échangé beaucoup de potins sur le labo, la base ! et on a beaucoup rigolé (nous ne sommes pas des dépressifs). Je pense, je suis sûr que ces 3 années n'auraient pas été aussi bien sans ta présence derrière la vitre qui nous sépareit !

Je remercie Jessica Raimbault-Machado avec qui j'ai partagé mon bureau pendant presque 1 an. Tu as mené ta mission de transmission de savoir-faire avec brio. Je pense sincèrement que si tu n'avais pas été là lors de ma première année, ma thèse ne se serait pas déroulée de la même manière. Nous étions sur la même longueur d'onde aussi bien en ce qui concerne le travail que le reste. Nos différents fous rires ont probablement plusieurs fois dérangés les bureaux d'à côté, mais franchement ça valait le coup ! Dommage que tu n'aies pu rester davantage.

Je remercie Fabrice Atassi pour sa participation au projet, sa bonne humeur quotidienne, mais également pour les autres moments. Je pense notamment aux différentes bières partagées au cours de la 2^e année qui m'ont permis de décompresser et de relativiser. Indépendamment de la thèse, lors

des différentes phases de déconfinement et de couvre-feu, cela a également permis de maintenir un lien autre que strictement professionnel, au cours d'une période où les personnes avaient tendance à être isolées et à avoir que des activités professionnelles. De même, l'association COVID/Netflix a rendu les midis plus joyeux ! Tu as grandement participé à la bonne ambiance dans laquelle s'est déroulée ma thèse.

Merci à Mathilde Flamant. Tu commençais ta 3^e année quand nous sommes arrivés avec Juliette et tu nous as montré la voie. On a beaucoup parlé du travail mais également de tout et de rien, au labo ainsi que dans le TER. On a partagé de bons moments au labo, à l'intermède, lors du PC 2019, jour de l'an... Ta bonne humeur et ta joie étaient agréables à partager. Je pense que « macrophagiiiize » restera dans ma mémoire !

Je remercie l'ensemble des personnes qui a contribué de près ou de loin à ce projet : Nathalie Mougnot pour sa patience parfois mise à rude épreuve lors des mesures de pression, Bénédicte Hoareau pour les nombreux FACS réalisés en 3 ans (et les bouchages du trieur encore plus nombreux), Sophie Besse pour ses conseils concernant un WB récalcitrant et les Ac qu'elle m'a prêtés, Elise Balse pour ses conseils et protocoles pour une IF particulièrement maudite, Laetitia Duboscq-Bidot pour ses conseils sur un certains génotypage capricieux et Vincent Fontaine pour ses conseils en culture et les milieux/produits prêtés.

Merci aux stagiaires qui ont également contribué à l'avancée du projet et/ou à l'ambiance dans le labo : Marta, Chloé, Valentin et Vanessa. Chloé, tu es arrivée pour un stage de M1 et, même si tu as changé de bureau, tu n'es pas repartie du labo et tu es en thèse maintenant. Grâce à ta psychose du ménage, mon bureau n'a jamais été aussi bien rangé et propre en 3 ans que pendant ces 2 mois de stage^^. Maintenant c'est un autre bureau qui souffre de tes manies ! Merci pour les nombreux gâteaux faits maison. Je pense qu'ils ont contribué à ma prise de poids, et malheureusement, ce ne sont pas les quelques footings que nous avons fait ensemble qui ont pu compenser... J'espère que tu passeras tes 2 années de thèse restantes dans de bonnes conditions et une bonne ambiance, même si je ne me fais pas de soucis vu les gens avec qui tu partages ton bureau. Je remercie également Vanessa que j'ai directement encadrée pendant ma 3^e année. Tu es arrivée pile au bon moment pour moi ! Malgré ta timidité, tu t'es vite intégrée à l'équipe, et tu as rapidement assuré pour les manips. Ta rigueur m'a permis d'avoir rapidement confiance dans les résultats obtenus et ton autonomie m'a permis de consacrer un temps non négligeable à l'écriture de mon mémoire. Malgré un stage cours de 2 mois, nous nous sommes très bien entendu et c'était agréable de travailler avec toi.

Forcément, je ne peux pas oublier l'ensemble des jeunes et des moins jeunes (je me considère toujours dans la première partie même si mes cheveux disent le contraire) avec qui j'ai partagé plusieurs moments agréables, permettant de déconnecter temporairement de la thèse. Ces moments englobent aussi bien les pauses cafés, les pauses blablas/potins que les soirées apéros/raclettes/jeux/bar/escape game/laser game. C'est ce qui fait la différence entre une bonne et une mauvaise thèse. Merci donc à : Juliette, Mathilde, Chloé, Vanessa, Camille, Elodie, Marie, Brice, Pierre, Océane, Angèle, Fabrice, Gilles, Basile, Marine.

Je remercie l'ensemble des personnes qui m'ont fait grandir professionnellement et scientifiquement :

- Martine Debarle et Martine Auclair qui m'ont encadré lors de mon premier stage en 2008 et m'ont offert leur confiance les premières. Nous avons toujours gardé contact ces années.

- Carlos Daniel de Magalhaes Filho et Martin Holzenberger qui m'ont proposé mon premier poste d'AI en 2008-2009.

- Véronique Béréziat, présente lors de mon premier stage mais qui m'a surtout conseillé lorsque j'avais pour projet de reprendre mes études en 2014 et qui depuis n'a cessé de garder un œil sur mon parcours.

- Amélie Coudert qui m'a également fait confiance, m'a laissé une certaine autonomie pour un stage de M1 et qui a toujours répondu à mes questions même lorsque ça faisait 5 fois que je les posais. Tu as toujours écouté mes propositions et discuté avec moi de leur pertinence. Tu m'as fait grandir scientifiquement.

- Laura Fouassier et Javier Vaquero qui ont continué mon apprentissage en M2

- Xavier Houard. Vous ne me connaissiez que de nom et ne m'aviez vu qu'une fois lors du 1^{er} concours de thèse. Pourtant, suite à mon « échec » la première année, vous avez cru en moi et, via Indira, vous m'avez transmis des conseils afin de me préparer à repasser le concours. Tout au long de ces 3 années, je sais que vous avez régulièrement demandé des nouvelles à Indira, vous préoccupant de l'avancée de ma thèse mais également de son déroulement autrement que scientifiquement.

Je remercie bien évidemment tous mes amis, parmi lesquels aucun n'aurait parié en sortie de DUT que je finirais en thèse 10 ans après (moi non plus d'ailleurs !). On se supporte mutuellement depuis 16 ans pour le plus ancien et 14 ans pour la plus récente. On a toujours gardé contact quel que soit le contexte, aussi bien quand j'étais à l'armée et vous à la FAC, ou lorsque j'ai repris mes études et que vous bossiez (oui j'aime bien faire les choses à l'envers). On s'est tous vu évoluer au cours de ces années, aussi bien personnellement (certains sont mariés et/ou ont des enfants) que

professionnellement, mais étonnamment, lorsqu'on se réunit, on n'a pas trop changé depuis nos 18 ans ! Merci Babar (je sais que tu as sacrifié plusieurs soirées à relire mon mémoire), Mamie, Nichon et Nico.

Quelques lignes supplémentaires pour Mamie/Céline. Notre très grande sociabilité avec les gens nous a étonnamment rapproché dès l'IUT. Je trouve que l'on s'est bien amélioré ces dernières années ! On peut dire que tu as toujours été là pour moi, je pense aux nombreux midis lorsque j'étais en permission, les squattages lorsque j'ai repris mes études, les verres partagés et le prêt de ton appart lors de certaines vacances... Je sais que tu me maudis encore de t'avoir poussé à t'engager dans une thèse, mais au final on s'est bien marré ! Si tu ne l'avais pas fait, tes visites régulières depuis le 6^e étage à mon bureau au 3^e pour les pauses thé n'auraient pas eu la même saveur. Forcément, on n'aurait pas eu autant de choses à dire, ni les mêmes potins à raconter sur nos équipes respectives. Nos échanges « pestages » nous ont permis de décompresser plus d'une fois ! Moi je pars, toi tu restes... la titularisation n'a pas que du bon... mais bon, on continuera les cinés, bars et soirées, et c'est ça le plus important !

Je remercie également ma famille, qui m'a toujours accompagné et soutenu dans mes choix, que ça soit lorsque j'ai décidé de m'engager dans l'armée et que j'étais déployé en opération, ou lorsque j'ai repris mes études puis que je me suis engagé dans la voie du doctorat. Les repas de famille, les weekends, les vacances sont des moments qui contribuent à maintenir notre vie sociale pendant ces 3 années, un aspect malheureusement souvent trop mis de côté en thèse. Ce n'était pas mon cas, j'ai réussi à faire la part des choses, notamment grâce à vous, et c'est ce qui explique que ma thèse s'est également bien passée.

Je finis par toi Indira ! On s'est rencontré au CNED, en L2 et, après s'être tourné autour quelques temps, nous ne nous sommes plus séparés. Cela fait 7 ans que tu partages ma vie, et que l'on se supporte mutuellement (dans les 2 sens du terme^^). Nos thèses (et le confinement) n'auront pas eu raison de nous et j'espère que nous vivrons et construirons encore beaucoup de choses tous les deux.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	1
ABREVIATIONS.....	3
INTRODUCTION	9
I. Système respiratoire	11
1. Présentation	11
2. Circulation pulmonaire et échanges gazeux	12
3. Pression pulmonaire.....	13
II. L'hypertension pulmonaire	14
III. L'hypertension artérielle pulmonaire.....	15
1. Définition et classification	15
2. Symptômes et diagnostic	16
3. Patient et hypertension artérielle pulmonaire.....	18
IV. Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	20
1. Histologie d'un vaisseau.....	20
2. Remodelage vasculaire.....	21
3. Acteurs cellulaires	22
a. Cellules endothéliales (CE)	22
b. Cellules musculaires lisses (CML)	23
c. Cellules inflammatoires.....	25
d. Plaquettes.....	26
e. Fibroblastes	26
f. Péricytes	26
g. Les cellules progénitrices.....	27
4. Acteurs moléculaires	28
a. Prostacycline.....	28
b. Monoxyde d'azote.....	28
c. Vasoactive intestinal peptide	29
d. Endothéline-1	29
e. Sérotonine	29
f. Thromboxane	30
g. Canaux potassiques.....	30
h. Facteurs de croissance	30
i. Facteurs de transcription	32
j. Facteurs génétiques	33

V. Traitements	37
1. Analogues de la prostacycline	38
2. Antagonistes des récepteurs à l'ET-1	39
3. Inhibiteurs des phosphodiésterases 5 et stimulateur de la guanylate cyclase	39
4. Antagonistes calciques	39
VI. Les modèles animaux	40
1. Le modèle d'hypoxie chronique	40
2. Le modèle monocrotaline	41
3. BMPR2 mutation et combinaison	42
VII. Cellules souches et progéniteurs dans l'hypertension artérielle pulmonaire.....	43
1. Notion de cellules souches et progéniteurs	43
2. Les progéniteurs vasculaires et le remodelage vasculaire au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	44
a. Les cellules progénitrices endothéliales.....	44
b. Les progéniteurs de cellules musculaires lisses.....	45
c. Les progéniteurs mésenchymateux PW1 ⁺	51
3. Aspects thérapeutiques des cellules souches et progénitrices dans l'hypertension pulmonaire	53
VIII. Voies des Platelet-Derived Growth Factor Receptors : PDGFR	55
1. Présentation	55
2. Rôle des PDGFR dans l'embryogenèse	62
a. Rôle de PDGFR α	62
b. Rôles de PDGFR β	65
3. Les PDGFR dans les tissus adultes	66
a. Conditions physiologiques.....	66
b. Conditions pathologiques.....	68
4. PDGFR et hypertension artérielle pulmonaire	76
MATERIELS ET METHODES	83
I. Souris transgéniques et modèles expérimentaux de l'hypertension pulmonaire	85
1. Modèles de souris transgéniques.....	85
2. Modèle d'hypertension induit par hypoxie chronique	85
3. Modèle d'hypertension induit par activation de PDGFR α	86
II. Mesure hémodynamique	86
III. Traitements des souris	86
IV. Cytométrie de flux.....	87
V. Culture cellulaire	89

VI. Séquençage de cellules uniques (Single-cell)	90
1. Principe du Single cell.....	90
2. Tri cellulaire et obtention des ADNc	90
3. Analyses bio informatiques	91
RESULTATS.....	93
<i>Partie 1 : PDGFRα activation drives pulmonary vascular remodeling via progenitor cell proliferation and induces pulmonary hypertension</i>	<i>95</i>
I. Introduction de l'article.....	95
II. Objectifs et résumé de l'article	96
III. Conclusion	97
ARTICLE.....	99
<i>Partie 2 : Caractérisation par analyse Single-cell RNA-seq des différentes populations de cellules pulmonaires PW1⁺ et des cellules issues de leur différenciation, et effets de l'hypoxie chronique.....</i>	<i>101</i>
I. Introduction.....	101
II. Résultats	102
1. Identification des clusters de cellules pulmonaires CD45 ⁻ / β -gal ⁺	102
2. Analyses de trajectoire.....	103
3. Association des clusters du single-cell aux populations isolées par FACS	105
4. Différenciation <i>in vitro</i> de la population c-kit ⁺ en cellules endothéliales	109
5. Analyse <i>in situ</i> de l'expression des marqueurs identifiés par single-cell dans les poumons de souris	110
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	115
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	133

TABLE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 : Schéma des voies aériennes inférieures.....	12
Figure 2 : Schéma de la circulation sanguine.....	13
Figure 3 : Schéma du cathétérisme cardiaque droit.....	18
Figure 4 : Structure d'une artère.....	20
Figure 5 : Remodelage vasculaire au cours de l'HTAP.....	21
Figure 6 : Schéma récapitulatif des principales voies de signalisation impactées au cours de l'HTAP et conduisant à l'hypertrophie et hyperplasie des CML.....	25
Figure 7 : Phénotype des principaux acteurs cellulaires du remodelage vasculaire lors de l'HTAP.....	27
Figure 8 : Voie de signalisation de BMPR2.....	34
Figure 9 : Chronologie de la découverte des différents gènes mutés impliqués dans l'HTAPh.....	36
Figure 10 : Cibles moléculaires des différentes thérapies utilisées dans l'HTAP.....	37
Figure 11 : Algorithme de traitement dans l'HTAP.....	38
Figure 12 : Diagramme de Venn simplifié représentant les différents sous type de CPE.....	44
Figure 13 : Régulation de la prolifération des CML localisées à la bordure de la zone muscularisée-non muscularisée, induite par l'HC.....	46
Figure 14 : Récapitulatif du phénotype moléculaire (A) et schéma du potentiel de différenciation (B) des CSM.....	48
Figure 15 : Progéniteurs périvasculaires pulmonaires PW1 ⁺	51
Figure 16 : Implication des cellules souches et progéniteurs au cours du remodelage vasculaire lors de l'HTAP.....	53
Figure 17 : Schéma d'activation des PDGFR par les PDGF.....	56
Figure 18 : Structure et dimérisation du PDGFR.....	57
Figure 19 : Schéma des voies de signalisation des PDGF/PDGFR.....	61
Figure 20 : Profil d'expression de pdgfra au cours de l'embryogenèse chez la souris.....	63
Figure 21 : Rôle des PDGF/PDGFR dans les maladies fibrotiques.....	72
Figure 22 : Localisation des mutations de PDGFR identifiées dans diverses pathologies.....	76
Figure 23 : Schéma récapitulatif des rôles de PDGFR α et PDGFR β dans l'HTAP.....	79
Figure 24 : Profil représentatif du FACS des cellules pulmonaires totales de souris indiquant la stratégie de sélection pour trier les populations PDGFR α ⁺ /PW1 ⁺	88
Figure 25 : Regroupement des populations cellulaires déterminées par analyse single-cell et identification des clusters (visualisation en UMAP).....	102

Figure 26 : Représentation de l'analyse de trajectoire entre les clusters mésenchymateux en normoxie et/ou en hypoxie.	104
Figure 27 : Représentation de l'analyse de trajectoire entre les clusters mésenchymateux et endothéliaux, en normoxie et/ou en hypoxie.....	105
Figure 28 : Analyse de l'expression de gènes d'intérêts entre les clusters de progéniteurs mésenchymateux en normoxie.....	107
Figure 29 : Certaines cellules de la population c-kit ⁺ ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales.....	109
Figure 30 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de CD248 et Scara5 dans le poumon de souris.	111
Figure 31 : Expression de Scara5 et CD248 par les cellules constituant le cluster CSM.....	111
Figure 32 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de CD248 et PDGFR α dans le poumon de souris.	112
Figure 33 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de Scn3a et PDGFR α dans le poumon de souris.	113
Figure 34 : Ensemble des facteurs connus impliqués dans la régulation des progéniteurs PW1 ⁺ . Rôle de PDGFR α dans leur prolifération et leur différenciation en CML : implication dans la néomuscularisation des artérioles pulmonaires au cours de l'HTAP.	123
Figure 35 : Schéma des hypothèses mécanistiques de la signalisation de PDGFR α régulant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire.....	126
Tableau 1 : Classification de l'hypertension pulmonaire adoptée lors du 6 ^e Symposium en 2018.....	14
Tableau 2 : Classification fonctionnelle de l'hypertension artérielle pulmonaire selon la New York Heart Association (NYHA) et adoptée par l'OMS.	17
Tableau 3 : Liste des sites de phosphorylation de PDGFR α et PDGFR β	58
Tableau 4 : Profil tissulaire et cellulaire d'expression des PDGF chez l'Homme et la souris.....	60
Tableau 5 : Profil d'expression de pdgfra au cours des premiers stades de l'embryogenèse chez la souris. Comparaison entre ARNm et protéine.	64
Tableau 6 : Cibles des inhibiteurs imatinib et nintedanib.....	69

ABBREVIATIONS

ABC8 : ATP-binding cassette 8

ABCG2 : ATP-binding cassette super-family G member 2

Ac : Anticorps

ACVRL1 : Activin receptor-like kinase 1

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

AEC2 : Alveolar Epithelial Cell type 2

ALK : Activin receptor like

AML1-like : Acute myeloid leukemia 1-like

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

AR : Amphiregulin

ARNm : Acide ribonucléique messenger

α SMA : alpha smooth muscle actin

ATP : Adenosine triphosphate

Bcl-xL : B-cell lymphoma-extra large

β -gal : β -galactosidase

BMP : Bone morphogenetic protein

BMPR2 : Bone morphogenetic protein receptor type 2

BTC : Beta-cellulose

CaSR : Calcium sensor receptor

CAV1 : Caveolin 1

CCL2/5 : Chemokine ligand 2/5

CCR2/5 : Chemokine receptor 2/5

CD31/34/44/45/73/90/133 : Cluster of differentiation 31/34/44/45/73/90/133

CE(s) : Cellule(s) endothéliale(s)

CFU-F : Colony-forming-unit fibroblast

c-kit : Tyrosine-protein kinase Kit

CML(s) : Cellule(s) musculaire(s) lisse(s)

CNN1 : Calponine

CPE : Cellule progénitrice endothéliale

CS : Cellule souche

CSM : Cellule souche mésenchymateuse

CX3CL1 (fractalkine) : chemokine [C-X3-C motif] ligand 1

CXCR7 : C-X-C chemokine receptor 7

CYP3A4 : Cytochrome P450 3A4

DDAO-G : 9H-(1,3-Dichloro-9,9-Dimethylacridin-2-One-7-yl) β -D-Galactopyranoside

DEP-1 : Density-enhanced phosphatase 1

DMEM : Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium

Dock180 : Deducator of cytokinesis

EBM2 : Endothelial Cell Growth Basal Medium-2

ECE : Enzyme de conversion de l'endothéline

EC-SOD : Extracellular superoxyde dismutase

EdU : Ethynyl-déoxyuridine

EGF : Epidermal growth factor

EndoMT : Transition endothélio-mésenchymateuse

eNOS : Endothelial NO synthase

ER : Estrogen receptor

ET-1 : Endothéline 1

ET_A, ET_{B1}, ET_{B2} : Endothelin receptor de type A, B1, B2

ETT : Echocardiographie par voie transthoracique

Etv6 : ETS variant transcription factor 6

FACS : Fluorescence activated cell sorting

FGF2 : Fibroblast growth factor 2

FGFR2 : Fibroblast growth factor receptor 2

FIP1L1 : Factor Interacting With PAPOLA And CPSF1

Gal3 : Galectine 3

GIST : Tumeur stromale gastro intestinale

GMPC : guanosine monophosphate cyclique

H : Hypoxie

HB-EGF : Heparin-binding EGF-like growth factor

HBSS : Hanks' Balanced Salt Solution

HC : Hypoxie chronique

HER : Human epidermal growth factor receptor

HIF-1 α / β : Hypoxia inducible factor 1 α / β

HP : Hypertension pulmonaire

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

HTAPh : Hypertension artérielle pulmonaire héréditaire

HTAPi : Hypertension artérielle pulmonaire idiopathique

HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

ICM : Institut du Cerveau et de la Moelle

Ig : Immunoglobuline

IL1- β /6 : Interleukin 1 beta / 6

IP : Prostaglandine receptor

i.p : Intra péritonéale

IRESnLacZ : Internal Ribosome Entry Site nuclear β -galactosidase

KCNK3 : Potassium channel subfamily K member 3

KDR : Kinase insert domain receptor

KLF4 : Kruppel like factor 4

K2P : Canal potassique à 2 domaines P

LRP1 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MCT : Monocrotaline

MEC : Matrice extracellulaire

MMP : Métalloprotéase matricielle

MO : Moelle osseuse

MRP4 : Multidrug resistance-associated protein 4

Mutation Ph : Mutation *Patch*

MYORG : Myogenesis regulating glycosidase

N : Normoxie

NFAT : Nuclear factor of activated T cells

NG2 : Neural glial antigen 2

NMDAR : Acide N-méthyl-D-aspartique receptor

NO : Monoxyde d'azote

NT5E : 5'-Nucleotidase Ecto

NYHA : New York Heart Association

OMS : Organisation mondiale de la santé

PAGA : Partition graph abstraction

PAI-1 : Plasminogen activator inhibitor-1

PAK1 : P21 (RAC1) Activated Kinase 1

PAPm : Pression artérielle moyenne

PAPO : Pression artérielle pulmonaire d'occlusion

PCA : Principal components analysis

PCP : Pression capillaire pulmonaire

PDE5 : Phosphodiesterase de type 5

PDGF : Platelet derived growth factor

PDGFR- α/β : Platelet derived growth factor receptor α/β

PECAM1 (CD31) : Platelet endothelial cell adhesion molecule 1

PGI2 : Prostaglandine 2

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKA /C /G : Protein kinase A /C /G

PLC γ : Phospholipase C γ

PS : Pénicilline/streptomycine

PTP1B : Protein-tyrosin phosphatase 1B

PVD : Pression ventriculaire droite

PW1 : Protein widely 1

Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1

ROS : Reactive oxygen species

rpm : Rotation par minute

RTK : Récepteur tyrosine kinase

RVP : Résistances vasculaires périphériques

Sca1 : Stem cells antigen 1

Scara5 : Scavenger Receptor Class A member 5

SDF1 : Stromal cell-derived factor 1

SERT : Serotonin transporter

SFK : Src family kinase

sGC : Soluble guanylyl cyclase

SH2 : Src homology 2

SHP-2 : SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2

siARN : Small interfering ARN

SLC20A2 : Solute carrier family 20 member 2

SM22 α : Smooth muscle 22 alpha

SM-MHC : Smooth muscle myosin heavy chain

SNC : Système nerveux central

SP : Side population

STAT : Signal transducers and activators of transcription

SU546 : Sugen 546

SVF dec : Sérum de veau foetal décomplémenté

TC-PTP : T-cell protein tyrosine phosphatase

TEM1 : Tumor endothelial marker 1

TGF- α/β : Transforming growth factor α/β

Tie2 : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains

TNF α : Tumor necrosis factor alpha

TPH1 : Tryptophane hydroxylase 1

Twist 1 : Twist protein related protein1

Tyr : Tyrosine

UMI : Unique Molecular Identifier

UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection

VCAM-1 : Vascular cell adhesion molecule-1

VD : Ventricule droit

VEGF : Vascular endothelial growth factor

VEGFR-2 : Vascular endothelial growth factor receptor 2

VIH : Virus d'immunodéficience humain

VIP : Vasoactive intestinal peptide

VPAC-1 et 2 : Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 / 2

VRT : Vitesse de regurgitation tricuspide

VWF : Von willebrand factor

WT : Wild type

XPR1 : Xenotropic And Polytropic Retrovirus Receptor 1

3G5 : 3G5-defined ganglioside

5-HT : 5 hydroxytryptamine 5 ; sérotonine

5-HTR : 5 hydroxytryptamine receptor

5-HTT : 5 hydroxytryptamine transporter

INTRODUCTION

I. Système respiratoire

1. Présentation

Chez les Mammifères, le système respiratoire permet les échanges gazeux entre l'air inhalé et la circulation sanguine afin de fournir les apports en dioxygène (O_2) nécessaires à l'organisme. Au centre de ce système se trouve un organe : le poumon. L'Homme possède 2 poumons : le droit, constitué de 3 lobes (supérieur, médial et inférieur) (4 lobes chez la souris) et le gauche, divisé en 2 lobes (supérieur et inférieur) (1 lobe chez la souris). Le poumon gauche est morphologiquement plus petit que le droit afin de laisser de l'espace au cœur dans la cavité thoracique. Le système respiratoire est doté de voies aériennes qui conduisent l'air inspiré au niveau de la bouche et du nez jusqu'à la zone d'échanges gazeux : les alvéoles pulmonaires. On distingue les voies aériennes supérieures : nez, fosses nasales, bouche, pharynx, et les voies aériennes inférieures : trachée, bronches, bronchioles, alvéoles. (**Fig 1**) Ces voies ont pour principales fonctions de réchauffer et humidifier l'air inspiré afin de le préparer pour les échanges gazeux. En effet, un gaz ne peut diffuser au niveau de la surface d'échange que sous forme dissoute. En parallèle, ces voies vont permettre d'épurer cet air de toutes particules potentiellement pathogènes (microorganismes, poussières, polluants chimiques...). La qualité de l'air inhalé ainsi optimisée, les échanges gazeux entre l'air inspiré riche en O_2 et le sang riche en CO_2 pourront s'effectuer au niveau de la partie distale du poumon, constituée par les alvéoles. (**Fig 1**) A l'inverse, après échanges gazeux, ces mêmes voies permettent l'expulsion de l'air enrichi en dioxyde de carbone lors de l'expiration. Le sang permettant ces échanges gazeux est acheminé grâce à la circulation pulmonaire.

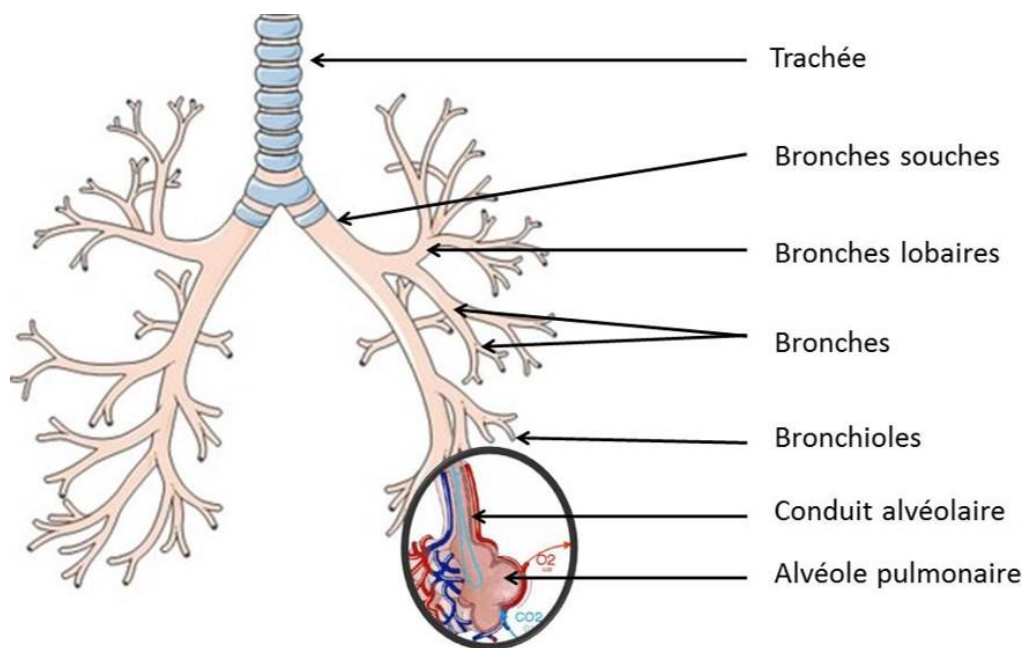


Figure 1 : Schéma des voies aériennes inférieures.

L'air inhalé riche en dioxygène est conditionné tout au long de sa conduction (humidification, dépollution) afin de diffuser dans la circulation sanguine au niveau des alvéoles. Le dioxyde de carbone diffuse en sens inverse et est éliminé par l'air expiré. (D'après N'Guessan A. 2015) [1]

2. Circulation pulmonaire et échanges gazeux

La circulation sanguine est constituée de 2 systèmes de circulation complémentaires : la circulation systémique et la circulation pulmonaire. (**Fig 2**)

La circulation systémique a pour fonction de conduire le sang oxygéné (par convention le sang artériel) du cœur vers les différents organes via les artères puis de ramener le sang appauvri en O_2 et enrichi en CO_2 (par convention le sang veineux) des organes vers le cœur via les veines.

La circulation pulmonaire a pour fonction d'amener le sang veineux au contact de la zone alvéolaire afin de le réoxygéner et de le renvoyer vers le cœur pour l'irrigation des organes. Pour cela, le sang veineux arrive au cœur dans l'oreillette droite puis dans le ventricule droit qui, en se contractant, l'éjecte en direction des poumons via les artères pulmonaires. Ces artères vont ensuite se ramifier en artérioles pulmonaires qui à leur tour se ramifient en capillaires pulmonaires. C'est au niveau de ces derniers que s'effectue l'hématose, c'est à dire l'ensemble des échanges alvéolo-capillaires permettant l'apport d'oxygène au sang et l'élimination du dioxyde de carbone. Ces échanges s'effectuent par diffusion grâce à la différence de pression partielle en CO_2 et O_2 entre l'alvéole et le capillaire sanguin. Enfin, le sang réoxygéné retourne à l'oreillette gauche par les veines pulmonaires.

La circulation pulmonaire est à distinguer de la circulation bronchique qui appartient à la circulation systémique. En effet, les artères bronchiques apportent un sang riche en O₂ et pauvre en CO₂ afin d'oxygéner le tissu pulmonaire et un sang appauvri en O₂ retourne au cœur via les veines bronchiques.

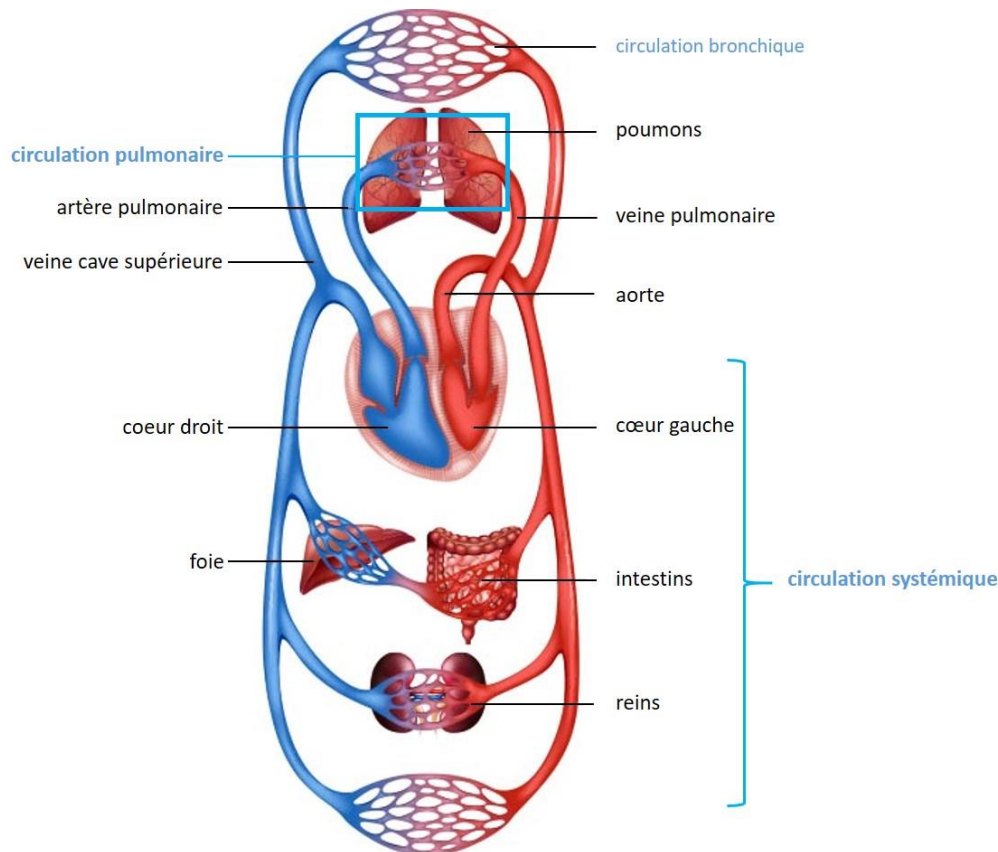


Figure 2 : Schéma de la circulation sanguine.

On distingue la circulation systémique dont la fonction est d'apporter le sang riche en dioxygène du cœur aux organes, de la circulation pulmonaire qui apporte un sang appauvri en dioxygène du cœur aux poumons, afin d'éliminer le dioxyde de carbone en échange d'oxygène. (D'après dreamstime.com)

3. Pression pulmonaire

La circulation pulmonaire est un système à basse pression. Celle-ci varie selon la localisation dans le système. En effet, elle sera plus élevée au niveau des artères pulmonaires avec une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) de $14 \pm 3,3$ mmHg, puis diminuera au fur et à mesure des ramifications atteignant une pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) de 2-4 mmHg. La PAPm (moyenne entre la PAP systolique et diastolique) reflète la fonction du ventricule droit et dépend du débit sanguin pulmonaire, de la pression capillaire pulmonaire (PCP), ainsi que des résistances vasculaires périphériques (RVP). La PAPO reflète la PCP ainsi que la pression auriculaire gauche. Dans ce système, les pressions varient globalement ainsi : $PAPm > PCP > PAPO$.

Tout comme le système systémique, la circulation pulmonaire peut être exposée à une augmentation pathologique de la pression sanguine, on parle alors d'hypertension pulmonaire (HP).

II. L'hypertension pulmonaire

De 1973 à nos jours, la classification de l'HP a beaucoup évolué. Suite au 1^{er} symposium mondial de l'HP organisé en 1973 à Genève par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la première classification ne faisait état que de 2 groupes : l'HP primitive et l'HP secondaire. Cette distinction dépendait uniquement de l'identification ou non de causes et/ou facteurs à risques. Lors du 2nd symposium à Evian en 1998, une classification clinique en 5 groupes fut proposée et adoptée. Cette classification repose sur les caractéristiques hémodynamiques, les similitudes physiopathologiques et les approches thérapeutiques. L'architecture de cette classification a globalement été conservée et mise à jour suite aux avancées scientifiques et médicales. La dernière mise à jour de la classification de l'HP date de 2018, lors du 6^e symposium à Nice. (**Tableau 1**) [2]

<p>1. Hypertension artérielle pulmonaire</p> <p>1.1 Idiopathique</p> <p>1.2 Héritable</p> <p>1.3 Induite par des médicaments ou des toxiques (tableau 3)</p> <p>1.4 Associée à :</p> <ul style="list-style-type: none"> – 1.5.1 Connectivites – 1.5.2 Infection par le VIH – 1.5.3 Hypertension portale – 1.5.4 Cardiopathies congénitales – 1.5.5 Bilharziose <p>1.5 Répondeurs à long terme aux antagonistes calciques (tableau 4)</p> <p>1.6 HTP avec signes évoquant une maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou une hémangiomatose capillaire pulmonaire (tableau 5)</p> <p>1.7 HTP persistante du nouveau-né (tableau P1)</p> <p>2. HTP des cardiopathies gauches</p> <p>2.1 Insuffisance cardiaque à FEVG préservée</p> <p>2.2 Insuffisance cardiaque à FEVG diminuée</p> <p>2.3 Valvulopathies</p> <p>2.4 Lésions postcapillaires obstructives congénitales (tableau P2)</p>	<p>3. HTP des maladies respiratoires et/ou hypoxémies chroniques</p> <p>3.1 BPCO</p> <p>3.2 Pneumopathies interstitielles</p> <p>3.3 Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives</p> <p>3.4 Hypoxie sans maladie pulmonaire</p> <p>3.5 Anomalies du développement (tableau P3)</p> <p>4. HTP liée à une obstruction artérielle pulmonaire (tableau 6)</p> <p>4.1 HTP thromboembolique chronique</p> <p>4.2 Autres obstructions artérielles pulmonaires</p> <p>5. HTP de mécanisme multifactoriel ou incertain (tableau 7)</p> <p>5.1 Maladies hématologiques</p> <p>5.2 Maladies systémiques</p> <p>5.3 Autres</p> <p>5.4 Maladies cardiaques congénitales complexes (tableau P4)</p> <p><i>FEVG : fraction d'éjection ventriculaire gauche; BPCO : bronchopneumopathie chronique obstructive</i></p>
--	--

Tableau 1 : Classification de l'hypertension pulmonaire adoptée lors du 6^e Symposium en 2018 [3]

Jusqu'à récemment, l'HP était arbitrairement définie par une PAPm au repos ≥ 25 mmHg et on distinguait les HP pré-capillaires (PAPO ≤ 15 mmHg) et post-capillaires (PAPO ≥ 15 mmHg). Lors du 6^e symposium, il a été proposé que le seuil d'une PAPm considérée comme anormale soit abaissé à 20 mmHg. En se basant sur de nombreuses études sur des sujets sains dont la PAPm au repos est de $14 \pm 3,3$ mmHg, 20 mmHg peut être considéré comme étant la valeur limite haute de la normale (valeur moyenne + 2 déviations standards). Cependant, une PAPm au repos ≥ 20 mmHg n'est pas suffisante pour définir une maladie vasculaire pulmonaire car elle pourrait simplement être due à une hausse du débit cardiaque, à une cardiopathie congénitale, ou à un shunt cœur gauche-droit lié. Il a donc été proposé d'inclure la valeur de la résistance vasculaire périphérique (RVP) dans la classification hémodynamique des HP, permettant ainsi de distinguer :

- Les HP pré-capillaires : PAPm >20 mmHg, PCP ≤ 15 mmHg, RVP ≥ 3 unités de Woods (groupes 1, 3, 4, 5)
- Les HP post-capillaires isolées : PAPm >20 mmHg, PCP >15 mmHg, RVP <3 unités de Woods (groupe 2, 5)
- Les HP pré et post-capillaires combinées : PAPm >20 mmHg, PCP >15 mmHg, RVP ≥ 3 unités de Woods (groupe 2, 5)

III. L'hypertension artérielle pulmonaire

1. Définition et classification

L'HTAP est une maladie rare dont la prévalence est de 15-50 cas/million d'habitants, et sévère puisque la survie dans les trois ans suivant le diagnostic est de 48%. [4] Elle est caractérisée par : une augmentation de la PAPm (>20 mmHg au repos), une PCP ≤ 15 mmHg, une augmentation des RVP (≥ 3 unités de Wood), et un remodelage progressif et occlusif des artères pulmonaires. [2] A long terme, ces altérations entraînent une surcharge de travail du cœur droit provoquant une hypertrophie du ventricule droit puis une insuffisance cardiaque droite menant au décès du patient en absence de transplantation cardio-pulmonaire.

Selon l'origine de la maladie, on distingue 7 sous-groupes d'HTAP : [2]

- idiopathique : la maladie survient sans antécédent familial ni facteur de risque identifié
- héritable : le patient présente une mutation d'un des gènes identifiés comme prédisposant au développement de l'HTAP (75% des cas sont liés à une mutation du gène bone morphogenetic protein receptor type 2 : *BMPR2*) et/ou lorsque plusieurs membres de la famille sont atteints
- induite par des médicaments (ex : anorexigènes) ou toxines
- associée à d'autres pathologies (connectivite, virus d'immunodéficience humaine (VIH), hypertension portale, maladie cardiaque congénitale, schistosomiase)
- répondeurs à long terme aux inhibiteurs calciques
- HP avec signes évoquant une maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou une hémangiomasose capillaire pulmonaire
- HP persistante du nouveau-né

Ces différentes formes/causes d'HTAP ont en commun une atteinte des artérioles pulmonaires de petits calibres : diamètre < 500 µm. [5]

2. Symptômes et diagnostic

L'HTAP est deux fois plus fréquente chez les femmes que chez les hommes avec un pic d'apparition vers 40 ans. [4] Il n'existe pas de signe fonctionnel spécifique de l'HTAP, rendant le diagnostic difficile et généralement tardif. En effet, les patients présentent divers symptômes non spécifiques comme un essoufflement, de la fatigue, un œdème des membres inférieurs, des douleurs thoraciques, des évanouissements. Ils surviennent généralement à l'effort, leur survenue au repos témoignant de la sévérité de la pathologie. [6] Ainsi selon la gravité des symptômes, l'OMS distingue 4 classes d'HTAP. (**Tableau 2**)

I.	Absence de limitation fonctionnelle pour les activités physiques habituelles. Ces activités ne causent pas de dyspnée, de fatigue excessive, de douleur thoracique ou de malaise.
II.	Limitation fonctionnelle légère pour les activités physiques. Il n'y a pas d'inconfort au repos, mais la pratique d'activités physiques normales entraîne une dyspnée, une fatigue excessive, des douleurs thoraciques ou des malaises.
III.	Limitation fonctionnelle importante pour les activités physiques. Il n'y a pas d'inconfort au repos, mais la pratique d'activités physiques peu importantes entraîne une dyspnée, une fatigue excessive, des douleurs thoraciques ou des malaises.
IV.	Incapacité à réaliser toute activité physique et/ou présence de signes d'insuffisance cardiaque droite. La dyspnée et la fatigue peuvent être présentes au repos et accentuées par toute activité physique.

Tableau 2 : Classification fonctionnelle de l'hypertension artérielle pulmonaire selon la New York Heart Association (NYHA) et adoptée par l'OMS.

Selon l'importance des symptômes et l'impact sur la santé des patients, l'HTAP est divisée en 4 classes de gravité.

L'échocardiographie par voie transthoracique (ETT) couplée au Doppler est le principal examen non invasif permettant de déceler la pathologie. Il permet d'estimer la PAP systolique et de détecter son élévation en mesurant la vitesse du flux de régurgitation tricuspide (VRT). Si la VRT est inférieure à 2,8 m/s, un diagnostic d'HTAP est très improbable tandis qu'une VRT supérieure à 3,4 m/s rend ce diagnostic fort probable. L'ETT permet aussi de détecter des anomalies anatomiques du cœur comme une hypertrophie cardiaque droite, caractéristique de l'HTAP.

Cependant, pour confirmer le diagnostic d'HTAP, le patient doit être soumis à un cathétérisme cardiaque droit. [6] Il s'agit d'un examen invasif réalisé sous anesthésie locale. Un cathéter de Swan-Ganz relié à un manomètre est introduit par voie jugulaire, humorale ou fémorale. Il passe progressivement dans l'oreillette droite, le ventricule droit, l'artère pulmonaire avant d'être bloqué en position capillaire à l'aide d'un ballonnet. (**Fig 3**) Cet examen permet de mesurer les paramètres suivants : la pression auriculaire droite, les pressions ventriculaires droites (systolique, télédiastolique), les pressions pulmonaires (systolique, diastolique et moyenne) et la PAPO. Ainsi, comme dit précédemment, le diagnostic repose sur :

- une PAPm > 20 mmHg au repos
- une PCP ≤ 15 mmHg
- RVP ≥ 3 unités Wood
- Un remodelage des artérioles pulmonaires progressif et occlusif

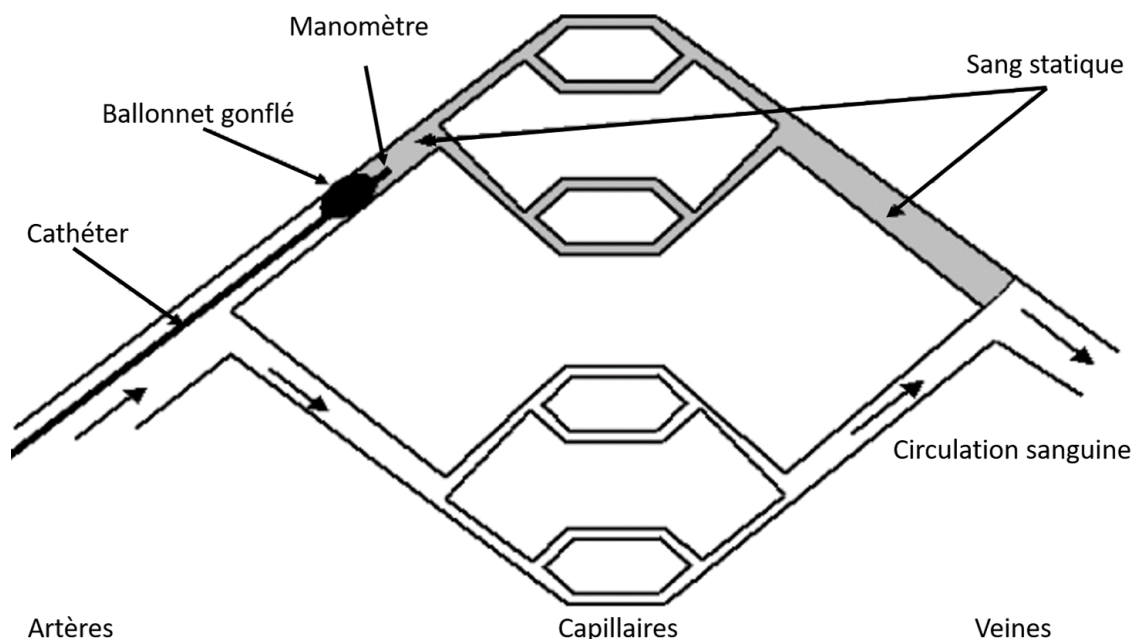


Figure 3 : Schéma du cathétérisme cardiaque droit.

Le cathétérisme cardiaque droit est un examen invasif, qui permet de déterminer les valeurs de la PAPm et de la PCP, indispensable pour confirmer le diagnostic d'HTAP. (D'après le collège des enseignants de pneumologie) [6]

3. Patient et hypertension artérielle pulmonaire

Les premiers symptômes de l'HTAP étant généralement légers et communs à d'autres pathologies ou à un manque de condition physique (essoufflement, fatigue, oppression thoracique), le diagnostic est souvent établi lorsque l'HTAP a dépassé un stade bénin. En effet, dans un premier temps, ces différents symptômes non spécifiques vont être reliés aux différentes pathologies potentielles, qui devront être éliminées au fur et à mesure avant d'établir le diagnostic de l'HTAP. Ce délai dans la confirmation de la maladie retarde la mise en place d'un traitement et peut impacter la survie des patients. Une fois la pathologie dépistée par ETT et confirmée par cathétérisme cardiaque droit, un bilan étiologique est réalisé pour rechercher une cause éventuelle à l'HTAP. Ce bilan a pour but d'exclure les HP secondaires à des pathologies respiratoires, cardiaques ou thromboemboliques, pour lesquelles des traitements plus spécifiques pourront être prescrits. Sa réalisation nécessite d'effectuer différents examens (radiographie pulmonaire, explorations fonctionnelles respiratoires, oxymétrie nocturne, scintigraphie pulmonaire de ventilation/perfusion...) qui peuvent également retarder la prise de traitements adaptés.

Les traitements actuels visent essentiellement à atténuer les symptômes et améliorer la qualité de vie des patients. En effet, le principal test pour déterminer la gravité de la maladie et l'efficacité du traitement consiste à évaluer la tolérance à l'effort. Pour cela, on mesure la distance parcourue par le patient en 6 min. Plus la classe de gravité est élevée, plus le patient sera fatigué rapidement voir sans effort, et donc parcourra une distance faible. Cet état de fatigue impacte grandement la vie des patients dans leurs déplacements et activités quotidiennes (professionnelles, tâches domestiques, monter un escalier, courses...) mais également lors des visites médicales, puisqu'il peut arriver qu'un patient se retrouve dans l'incapacité de se rendre à son rendez-vous médical (également lié à des complications de la maladie ou des effets secondaires des médicaments), rendant ainsi compliqué le suivi des patients des stades sévères. L'HTAP a également des conséquences sur l'état de santé des patients (autres que ceux propres à la maladie) puisque ceux-ci sont plus sensibles aux infections respiratoires et en cas de nécessité d'une anesthésie, l'anesthésie générale est moins bien tolérée que l'anesthésie locale. Concernant les femmes, il est fortement déconseillé de procréer, le risque de mortalité pour la mère étant augmenté et le risque de complications pour le fœtus élevé. La mise en place d'une contraception est recommandée, et dans le cas d'une contraception hormonale, il faut tenir compte des interactions médicamenteuses variables selon les molécules. [7]

Au-delà de l'aspect purement physique, il faut également prendre en compte l'aspect psychologique des patients. Malgré les traitements, leur état va progressivement (plus ou moins rapidement) se dégrader, diminuant leurs activités physiques (sous toutes formes) et leurs interactions sociales (famille, amis, collègues). Cette situation peut ainsi entraîner un sentiment d'isolement. La dégradation de l'état physique du patient altère également son activité professionnelle, allant jusqu'à une incapacité de travail et perte d'emploi, ce qui impacte fortement les finances personnelles ou du foyer. Comme indiqué précédemment, il est fortement déconseillé aux femmes d'avoir des enfants. De plus, les patients peuvent présenter ou développer une intolérance à certains traitements, dont les effets secondaires les affaiblissent physiquement et moralement. Les épisodes d'hospitalisation plus ou moins longs vont être de plus en plus fréquents. Concernant les patients les plus sévèrement touchés (classe IV), la prise médicamenteuse est très lourde, nécessitant la mise en place définitive d'une pompe connectée à un cathéter tunnelisé placé au niveau de la veine sous-clavière ou d'une pompe en perfusion sous cutanée, pour délivrer en permanence de la prostacycline ou dérivés. Ainsi, au fur et à mesure de l'avancée de la maladie et de la dégradation de l'état du patient, une multitude d'émotions négatives peut être développée par ce dernier, tel que la colère, la frustration, le sentiment d'inutilité, pouvant conduire à un état dépressif. L'ensemble de ces paramètres atteints également la sphère familiale large et plus intime. Enfin, il ne faut surtout pas oublier qu'actuellement le pronostic vital à terme est fatal en absence de transplantation cardio-pulmonaire. [8]–[11]

IV. Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire

1. Histologie d'un vaisseau

Les artérioles sont formées de 3 tuniques distinctes. La tunique la plus interne est l'intima, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) reposant sur une membrane basale, correspondant à un assemblage de glycosaminoglycanes, de fibres de collagène de type IV et VII, et de glycoprotéines (fibronectine, laminine, entactine). Une limitante élastique interne (élastine, fibrillines 1 et 2, MAGP) la sépare de la media qui est constituée d'une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses (CML). La couche externe est l'adventice, composée de fibroblastes et matrice extracellulaire (MEC) et bordée par une limitante élastique externe. (**Fig 4**) La muscularisation des artérioles pulmonaires est continue pour celles de diamètre compris entre 100 et 500 μm , puis devient partielle et disparaît progressivement pour celles de diamètre inférieur à 100 μm . La majorité des artérioles pulmonaires est non muscularisée (près de 60% chez la souris). [12]

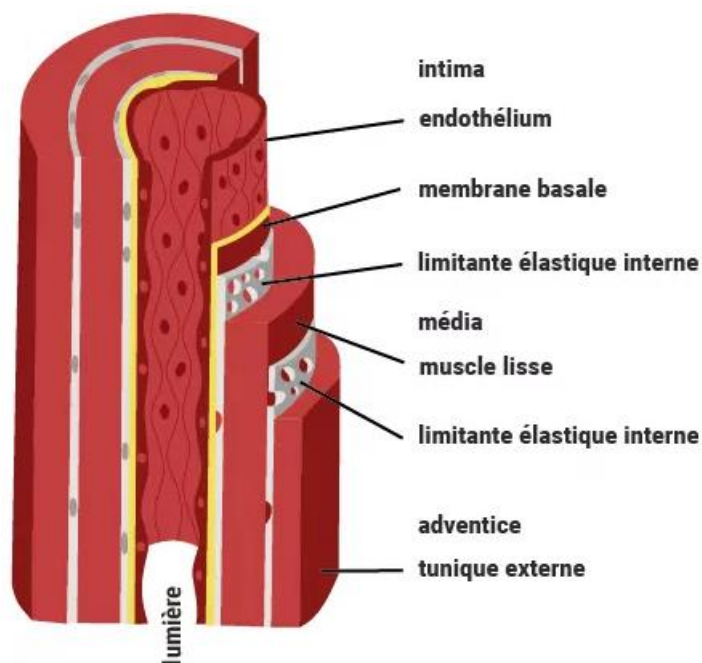


Figure 4 : Structure d'une artère.

Une artère est constituée de 3 tuniques. La plus externe correspond à l'adventice et est constituée essentiellement de fibres de collagène et de fibroblastes. La seconde correspond à la media, constituée de cellules musculaires lisses. Enfin, l'intima correspond à la couche cellulaire qui délimite la lumière du vaisseau et est constituée de cellules endothéliales. (D'après le site de la Fédération Française de Cardiologie)

2. Remodelage vasculaire

L'accès à des biopsies pulmonaires HTAP est rare, mais les examens des tissus, post-mortem ou post-transplantation, ont permis d'avoir une bonne connaissance de l'histologie de ces poumons. Lors de l'HTAP, pour les vaisseaux de gros et moyen calibre, les 3 tuniques sont impactées par le remodelage vasculaire. Au niveau de la tunique externe, on observe un épaississement de l'adventice associé à une fibrose et une inflammation. La formation d'une media (néomuscularisation) est décrite au niveau des artérioles pré-capillaires normalement non muscularisées et une media continue (muscularisation) se développe au niveau des artérioles initialement partiellement muscularisées. Ce phénomène de (néo)muscularisation s'accompagne d'une hypertrophie de la media suite à la prolifération des CML. Enfin, une néo-intima, constituée de myofibroblastes et de MEC, se forme et obstrue progressivement les vaisseaux sanguins. (**Fig 5**) [13]

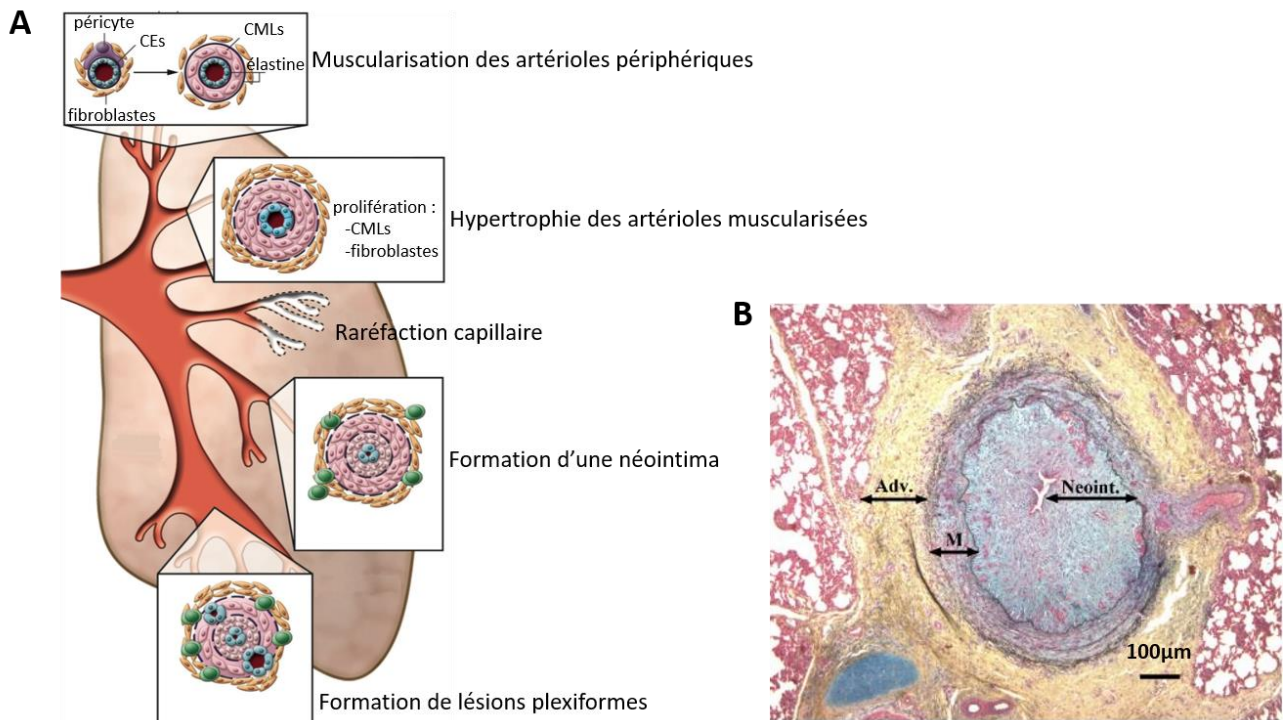


Figure 5 : Remodelage vasculaire au cours de l'HTAP.

A : Schéma récapitulatif des différents événements du remodelage vasculaire. Au niveau histologique, cette pathologie est caractérisée par un remodelage progressif et occlusif des vaisseaux pulmonaires de petit et moyen calibre. Les 3 tuniques sont impactées lors du remodelage. On observe une dysfonction endothéliale altérant la communication cellulaire entre CE et CML. Une néointima se forme et obstrue progressivement la lumière. Concernant la media, on observe une hypertrophie au niveau des artérioles muscularisées, et une muscularisation des artérioles normalement non muscularisées. Enfin, une fibrose adventitielle se développe. (D'après Rabinovitch 2012) [13] **B :** Image représentative d'une artériole pulmonaire remodelée et obstruée. Adv. : adventice ; M : media ; Neoint. : néointima. (D'après Pugliese *et al.* 2015) [14]

Cette obstruction provoque la formation de nouveaux canaux microvasculaires endoluminaux pour compenser la diminution du flux sanguin et ainsi subvenir aux besoins en dioxygène du tissu pulmonaire. La prolifération désorganisée des CE et des myofibroblastes dans une MEC dense et riche en collagène va donner naissance à des lésions dites « plexiformes » (ou fibrose intimale concentrique). Une thrombose *in situ* y est également observée, dernier stade du remodelage vasculaire pulmonaire et spécifique des HTAP sévères. [13]

L'hétérogénéité cellulaire et moléculaire du remodelage vasculaire fait ainsi de l'HTAP une pathologie multifactorielle et complexe. L'étude de ces différents acteurs est donc primordiale pour la caractérisation des mécanismes impliqués dans le développement de la maladie.

3. Acteurs cellulaires

Différents types cellulaires sont impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP (**Fig 7**) :

a. Cellules endothéliales (CE)

Chez un individu sain, la balance entre vasoconstricteurs et vasodilatateurs, produits par les CE, est responsable du tonus vasculaire pulmonaire basal. Cependant, un dérèglement de cette balance peut survenir, altérant le dialogue cellulaire entre les CE et CML.

La dysfonction endothéliale, caractéristique de l'HTAP, se traduit par une hausse de la production de vasoconstricteurs (endothéline 1 (ET-1), [15] thromboxane, [16] sérotonine (5-HT) [17]) et une diminution de celle des vasodilatateurs (prostacycline, [16] monoxyde d'azote (NO) [18], [19]), provoquant la contraction des CML et l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire.

Parallèlement à leurs effets sur la contractilité des CML, vasodilatateurs et vasoconstricteurs exercent aussi respectivement un rôle anti et pro-prolifératif sur les CML. La dysfonction endothéliale crée donc un environnement favorable à la prolifération des CML, contribuant au phénomène de (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires.

Selon le niveau de ramification vasculaire, les CE présentent un phénotype pro-apoptotique, responsable de la raréfaction des artérioles distales et des capillaires, ou à l'inverse, un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose. [20] Ce second phénotype conduit à la formation d'une néointima qui obstrue progressivement la lumière endoluminale et favorise la formation des lésions plexiformes.

Enfin, les CE anormales synthétisent moins de facteurs anti-thrombotiques (thromboduline, inhibiteur de l'activateur du plasminogène 1 (PAI-1)), aggravant les risques de thrombose *in situ*. [21]

Indépendamment de l'origine de l'HTAP, la dysfonction endothéliale, ainsi que la transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) abordée ultérieurement, sont donc des éléments majeurs dans le développement et la progression de la pathologie.

b. Cellules musculaires lisses (CML)

La néomuscularisation des artérioles pulmonaires normalement non muscularisées et la muscularisation anormale des vaisseaux partiellement muscularisés et muscularisés, associées à un épaissement de la media, sont caractéristiques de l'HTAP.

Ces phénomènes sont notamment liés à la prolifération excessive des CML présentes dans la media. Les CML vasculaires sont des cellules hautement différenciées et spécialisées, identifiées par l'expression combinée de différents marqueurs sélectifs/spécifiques comme l'alpha Smooth Muscle Actin (α SMA), la Smooth Muscle Myosin Heavy Chain (SM-MHC), la Smooth Muscle 22 alpha (SM22 α), l'h1-calponine, la smootheline. Elles conservent cependant une certaine plasticité en fonction des signaux environnementaux, contrairement aux cellules musculaires squelettiques et cardiaques. [22] Ainsi, suite à des atteintes vasculaires et/ou pathologies (athérosclérose, resténose, HTAP), les CML peuvent enclencher un processus de transition phénotypique. Elles passent alors d'un état quiescent contractile à un état prolifératif, migratoire et/ou sécrétoire, et présentent une diminution de l'expression de leurs gènes marqueurs spécifiques. [23] Dans le cadre de l'HTAP, leur changement phénotypique et leur accumulation sont en partie liés au microenvironnement et à la dérégulation de certaines voies de signalisation (**Fig 6**) dont certaines sont associées à la dysfonction de l'endothélium et favorisent la prolifération et la contraction des CML. [24]

Les CE produisent également des facteurs de croissance (Platelet Derived Growth factor : PDGF, Vascular Endothelial Growth Factor : VEGF, Fibroblast Growth Factor : FGF) qui stimuleront à leur tour la prolifération et la migration des CML. [25], [26] De plus, les CML présentent des altérations intrinsèques impliquées dans ce changement phénotypique. Ainsi, l'inhibition ou la perte des canaux potassiques exprimés à la surface des CML causent une dépolarisation membranaire. [27] Cela entraîne l'entrée de calcium extracellulaire qui stimule la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique. L'augmentation du calcium intracellulaire stimule ainsi la prolifération et la contraction des CML via l'axe calcium/calmoduline.

Au niveau membranaire, les CML des patients HTAP surexpriment la pompe Multidrug Resistance-associated Protein 4 (MRP4) qui permet l'efflux des nucléotides cycliques, régulant les taux intracellulaires d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) et de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). [28]

De plus, la faible disponibilité de NO diminue l'activité enzymatique de la guanylyl cyclase soluble (sGC) [24] et favorise l'activité des phosphodiésterases de type 5 (PDE5) [29], contribuant à un faible taux de GMPc.

Or la faible disponibilité d'AMPc et de GMPc favorise également la prolifération et la contraction des CML. De plus, dans le cas des HTAP héritable (HTAPh), la mutation du gène BMP-RII pourrait s'accompagner d'une perte d'inhibition de la prolifération des CML. [30]

Certains composants de la MEC participent également à la prolifération des CML. En effet, suite à l'altération de l'endothélium, différents médiateurs sériques entrent en contact avec les CML, induisant l'expression du facteur de transcription Acute Myeloid Leukemia 1-like (AML1-like). AML1-like induit à son tour la production et la libération d'élastase neutrophile par les CML pulmonaires. (Wigle 1998) De plus, l'apolipoprotéine A1 sérique se fixe aux CML et lie l'élastine, induisant son activité sérine élastase. [31] Celle-ci active alors différents facteurs de croissance stockés dans la MEC tel que le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2) et le Transforming Growth Factor beta (TGF- β), qui à leur tour stimulent la prolifération des CML et la sécrétion, entre autres, de ténascine. Cette glycoprotéine associée aux facteurs de croissance amplifie également la prolifération des CML. [13] Le niveau élevé d'élastase neutrophile chez les patients HTAP est un marqueur de sévérité de la pathologie et le déficit en élastine (inhibiteur de l'activité élastase) pourrait s'avérer une cible thérapeutique intéressante. [32]

La prolifération et la migration des CML pulmonaires sont également promues par une interaction entre macrophages et CML, via les axes CCL2/CCR2 et CCL5/CCR5. En effet, les patients HTAP présentent une surexpression des récepteurs CCR2 et CCR5, à la fois par les CML et les macrophages, et, *in vitro* et *in vivo*, l'inhibition des 2 récepteurs prévient la prolifération des CML et le développement de l'HP. [33]

Ces phénomènes de néomuscularisation et muscularisation sont également accompagnés d'une hyperplasie des CML et d'un épaissement de la media.

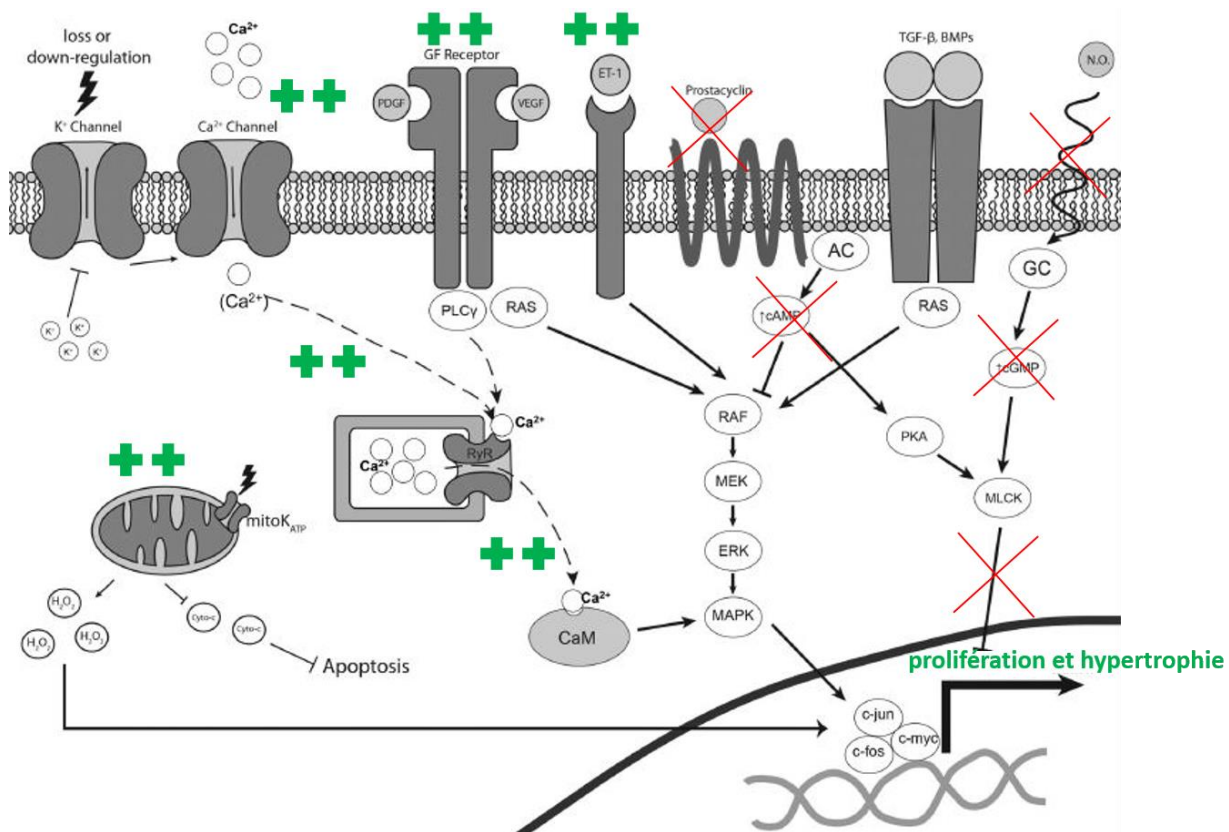


Figure 6 : Schéma récapitulatif des principales voies de signalisation impactées au cours de l'HTAP et conduisant à l'hypertrophie et hyperplasie des CML.

On constate une diminution de l'activation des voies inhibitrices de la prolifération : NO (monoxyde d'azote) et prostacycline, et une suractivation des voies favorisant la prolifération : ET-1 (endothéline 1), facteurs de croissance (PDGF, VEGF), TGFβ et modulation calcique. + : voie suractivée ; x voie inhibée (D'après Crosswhite et Sun 2014) [34]

c. Cellules inflammatoires

Chez les patients HTAP, différentes études histologiques ont montré une infiltration périvasculaire importante de cellules immunitaires : macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes B et T et de mastocytes ainsi qu'une augmentation de la production de certaines cytokines et chimiokines (interleukine 1 beta (IL1-β), interleukine 6 et 8 (IL-6 IL-8), fractalkine (CX3CL1), Monocyte Chemoattractant Protein 1 (MCP-1 ou CCL2), Tumor Necrosis Factor alpha (TNFα)). L'inflammation est une composante importante de la physiopathologie notamment dans le remodelage vasculaire puisqu'elle contribue à la prolifération des CML, et que de nombreuses cellules immunitaires sont retrouvées au niveau des lésions plexiformes. En revanche, nous ne savons pas si l'inflammation initie ce remodelage ou s'il s'agit d'une réponse aux modifications vasculaires. [13], [35]

d. Plaquettes

Un dysfonctionnement plaquettaire est également observé au cours de l'HTAP. [36] En effet, les plaquettes synthétisent et libèrent excessivement des facteurs pro-coagulants, vasoactifs et mitogènes tel que la thromboxane A2, la 5-HT, les PDGF, le TGF- β et les VEGF. Cette sécrétion excessive contribue au remodelage vasculaire en induisant un phénotype prolifératif et contractile des CML, ainsi qu'un environnement favorable à la formation de thrombus pouvant mener à l'occlusion complète du vaisseau et à la formation des lésions plexiformes. [37]

e. Fibroblastes

Les fibroblastes sont des cellules au phénotype peu différencié présentant une grande plasticité et de nombreuses capacités : prolifération, migration, propriété contractile, transdifférenciation en myofibroblaste, sécrétion de métalloprotéases matricielles (MMP), de cytokines et de composants de la MEC. Ces cellules vont ainsi participer au remodelage vasculaire, notamment à la formation d'une néo-intima et à la fibrose adventitielle en donnant des myofibroblastes et en sécrétant des composants de la MEC. [38]

f. Péricytes

L'intégrité structurale des capillaires et petits vaisseaux est assurée par une population hétérogène de cellules murales : les péricytes. Ces cellules, à l'interface des CE et des CML, participent ainsi à la régulation :

- de l'homéostasie des vaisseaux : prolifération, différenciation et migration des CE, stabilité structurelle [39]
- du tonus vasculaire : contraction des CML
- de la réponse immunitaire : capacité de phagocytose et de présentation d'antigène [40], [41]
- du flux sanguin [42]

Chez les patients HTAP, il a été remarqué une augmentation du nombre de péricytes et donc de la couverture péricytaire des vaisseaux pulmonaires. [43] De plus, certains péricytes ont un phénotype de progéniteurs, leur permettant de se différencier en CML, les désignant ainsi comme cible potentielle pour lutter contre la néomuscularisation. Cet aspect sera traité ultérieurement.

g. Les cellules progénitrices

Ces acteurs cellulaires seront présentés dans une partie dédiée.

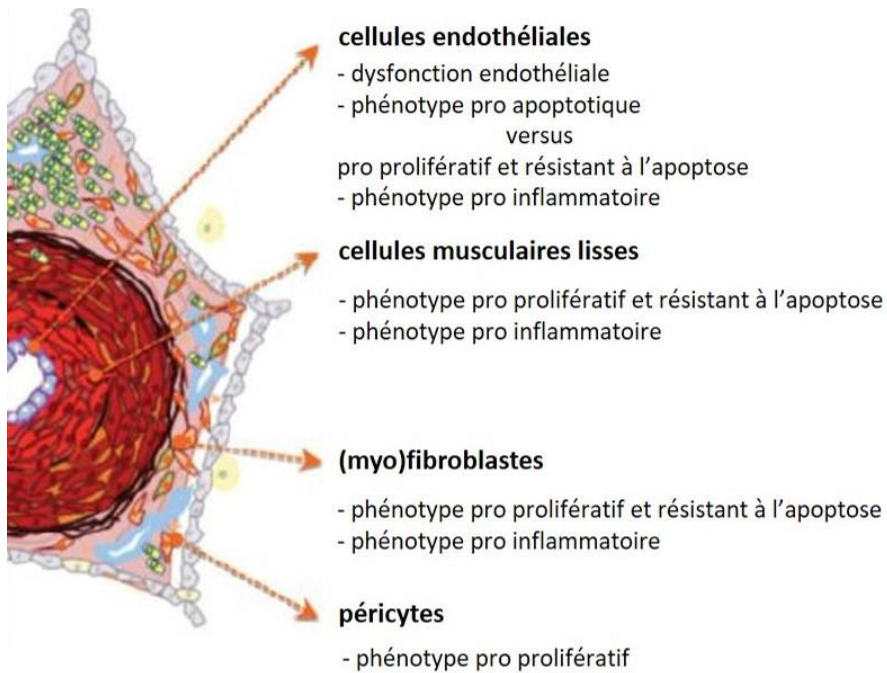


Figure 7 : Phénotype des principaux acteurs cellulaires du remodelage vasculaire lors de l'HTAP.

L'ensemble des cellules vasculaires présente un comportement altéré au cours de l'HTAP et adopte un phénotype pro-prolifératif et pro-inflammatoire. (D'après Guignabert et Dorfmueller 2017) [44]

4. Acteurs moléculaires

Au cours de l'HTAP, différentes voies et médiateurs cellulaires sont impliqués dans le dysfonctionnement endothélial et le remodelage vasculaire.

a. Prostacycline

La prostacycline ou prostaglandine I₂ (PGI₂) est un métabolite de l'acide arachidonique synthétisé par la prostacycline synthase. Il s'agit d'un puissant vasodilatateur sécrété par l'endothélium qui contribue à réguler la prolifération et la contraction des CML. Pour cela, elle se fixe aux récepteurs IP de la PGI₂ des CML et agit via la voie dépendante de l'AMPc.

L'activation des protéines kinase A et G (PKA, PKG) entraîne la diminution du calcium intracellulaire, favorisant la relaxation des CML. En plus de l'action sur les CML, la PGI₂ réduit l'agrégation plaquettaire.

Cependant, chez les patients HTAP, les CE produisent moins de prostacycline synthase et par conséquent moins de PGI₂. Ainsi, la diminution de l'effet vasodilatateur et anti-prolifératif de la PGI₂ contribue au remodelage vasculaire. [34]

b. Monoxyde d'azote

Le NO est synthétisé dans les CE par la NO synthase endothéliale (eNOS) qui transforme la L-arginine en L-citrulline et NO. Ce dernier va ensuite diffuser dans les CML et activer la sGC. L'activation de la sGC entraîne une augmentation de GMPc qui va activer la PKG, favorisant la diminution du calcium intracellulaire et donc la relaxation des CML. Le NO possède également des capacités anti-coagulante et anti-proliférative.

La diminution de NO synthase dans les CE et donc de NO chez les malades participe à la prolifération des CML, à la vasoconstriction pulmonaire et favorise les phénomènes de thrombose. [34]

c. Vasoactive intestinal peptide

Le vasoactive intestinal peptide (VIP) est un neuropeptide vasodilatateur. Il exerce aussi une action inhibitrice sur la prolifération des CML et l'agrégation plaquettaire. Pour cela, le VIP se lie à ses récepteurs : vasoactive intestinal polypeptide receptor 1 et 2 (VPAC-1 et VPAC-2) et agit via les voies de l'AMPC et GMPc. Les faibles concentrations sériques de VIP chez les patients HTAP, associées à une faible immunoréactivité pour ses récepteurs, diminuent son action vasodilatatrice, anti proliférative et anti agrégative.

d. Endothéline-1

L'ET-1 est un neuropeptide synthétisé par l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) et sécrété par les CE. Il s'agit d'un puissant vasoconstricteur se liant aux récepteurs ET_A et ET_{B2} présents à la surface des CML et qui stimule également leur prolifération, via la voie de la protéine kinase C (PKC). Les récepteurs ET_{B1} sont présents à la surface des CE et permettent une boucle d'autorégulation négative en entraînant la libération de NO et PGI₂.

L'augmentation du taux d'ET-1 au cours de l'HTAP contribue au remodelage vasculaire et à la vasoconstriction pulmonaire. [34]

e. Sérotonine

La sérotonine est synthétisée par les cellules entérochromaphines du tube digestif, les neurones sérotonergiques et les CE pulmonaires. Elle est transportée à travers la circulation sanguine grâce aux plaquettes dans lesquelles elle est stockée. Elle exerce son action vasoconstrictrice grâce à son récepteur membranaire le 5 hydroxytryptamine receptor (5-HTR), exprimé par les CML et stimule également leur prolifération. La 5-HT peut aussi agir via son transporteur membranaire, le serotonin transporter (SERT ou 5-HTT), internalisé dans la cellule cible. Le taux sérique élevé de 5-HT observé chez les patients serait lié à un défaut de stockage et/ou une surproduction. [45], [46]

f. Thromboxane

Le thromboxane est un vasoconstricteur synthétisé par les CE et les plaquettes. Il induit aussi la prolifération des CML et l'agrégation des plaquettes. Une augmentation de la production de métabolites de thromboxane A₂ est observée chez les patients HTAP contribuant au remodelage vasculaire et à la vasoconstriction pulmonaire. La diminution des facteurs vasodilatateurs conduit à un déséquilibre de la balance vasodilatateurs/vasoconstricteurs au profit de ces derniers.

Ces facteurs vont également favoriser la prolifération des CML ainsi que l'agrégation des plaquettes, participant au remodelage vasculaire pulmonaire.

g. Canaux potassiques

Les CML présentent à leur surface des canaux potassiques voltage-dépendants responsables de la modulation de leur potentiel de membrane et de la concentration calcique intracellulaire. Dans le cadre de l'HTAP, il a été montré une baisse d'expression ainsi qu'un dysfonctionnement des canaux potassiques Kv1.5, entraînant une hausse du calcium intracellulaire par les canaux calciques voltage dépendant, provoquant la contraction et la prolifération des CML. [34] De plus, des mutations du gène *KCNK3* codant pour un canal potassique membre de la famille des canaux potassiques à 2 domaines P (K₂P) et des mutations du gène *ABCC8* codant pour une sous-unité régulatrice des canaux potassiques ont également été identifiées chez des patients HTAP. [47]

h. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance interviennent dans différents processus physiologiques en régulant la prolifération et la croissance cellulaire mais également la migration, la différenciation ainsi que la survie en se liant à leurs récepteurs tyrosine-kinase (RTK) spécifiques. Il s'avère que ces facteurs (VEGF, PDGF, FGF, EGF) [43], [44], [45] sont surexprimés au niveau pulmonaire lors de l'HTAP, induisant une suractivation de leurs récepteurs. La suractivation de ces récepteurs conduit à des phénomènes de prolifération, migration, différenciation et de résistance à l'apoptose des cellules vasculaires, favorisant le remodelage vasculaire. Les causes de cette surexpression des facteurs de croissance ne sont pas entièrement élucidées mais le stress oxydant, l'hypoxie et les contraintes mécaniques semblent concourir à la surproduction des facteurs de croissance.

- Fibroblast growth factor 2 (FGF2)

Ce facteur stimule l'angiogenèse, la prolifération et la migration des CML. Son expression est augmentée en réponse à l'hypoxie ou à de fortes contraintes de cisaillement. Sa surexpression est observée aussi bien dans les modèles expérimentaux que chez les patients HP (augmentation dans la circulation sanguine de 51% des patients HTAP idiopathiques (HTAPi)). Chez les patients, ce facteur de croissance est surexprimé par les CE et participe à l'altération de leur phénotype par action autocrine.

L'action du FGF2 est également paracrine et induit l'hyperplasie des CML. L'altération de cette voie de signalisation passe également par une surexpression du récepteur FGFR2 par les cellules endothéliales. *In vitro*, l'expression d'un récepteur constitutivement actif favorise la survie des CE et entraîne une surproduction de FGF2. Ainsi, la survie et sélection de CE surexprimant naturellement FGR2 lors des premiers stades de la pathologie pourrait expliquer la surproduction de FGF2. Nous avons également pu observer *in vitro* que FGF2 induisait la prolifération des progéniteurs vasculaires pulmonaires PW1⁺ qui participent au remodelage vasculaire. *In vivo*, l'utilisation d'inhibiteur de FGFR2 en thérapeutique réduit l'HP établie et induite par la monocrotaline (MCT). [51]

- Epidermal growth factors (EGF)

La famille des EGF est constituée de différents ligands : EGF, Transforming Growth Factor- α (TGF- α), Heparin-Binding EGF-like Growth Factor (HB-EGF), epiregulin, amphiregulin (AR), epigen, beta-cellulin (BTC), neuregulin 1, 2, 3, 4 et de 4 récepteurs : HER1, 2, 3, 4. *In vivo*, la surexpression de TGF- α dans le poumon induit une HP chez la souris. Ce développement est prévenu par l'expression d'un récepteur mutant dominant négatif. De plus, chez le rat monocrotaline (MCT), on observe une augmentation des ARNm EGF, TGF- α , HER1, 2, 3, et l'utilisation d'inhibiteurs d'EGFR provoque l'apoptose des CML et améliore la survie des rats. L'effet bénéfique de ces inhibiteurs sur la régression de l'HP n'est cependant pas retrouvé dans le modèle d'hypoxie chronique (HC). Cette différence peut être expliquée par la différence d'espèce (rat versus souris), le mode d'induction de l'HP, les mécanismes impliqués dans le développement de l'HP et la sévérité du modèle étudié.

Chez les patients HTAPi, le niveau d'expression des ARNm (homogénats pulmonaires) de BTC, AR, HB-EGF et des 4 récepteurs reste inchangé par rapport aux individus sains. Cependant, EGF co-localise avec la tenascine C, une protéine composante de la MEC retrouvée en abondance dans les lésions obstructives des patients HTAP et qui induit de manière EGF-dépendante la prolifération et migration des cellules vasculaires. Des études ont également montré que EGF pouvait agir en coopération et synergie avec d'autres facteurs tels que TGF- β 1 et FGF2, mécanismes pouvant donc être également impliqués dans le développement de la pathologie. [51]

- Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Bien que son expression ainsi que celle de son principal récepteur, le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 (VEGFR2) soient augmentées dans les lésions plexiformes des patients, le rôle du VEGF dans l'établissement de la pathologie n'est pas clair. En effet, un rôle contradictoire est observé *in vivo*, puisque selon le modèle expérimental, VEGF va être augmenté (souris HC) ou diminué (rat MCT). Il semble cependant avoir un effet protecteur sur les CE en les protégeant de l'apoptose et sa participation au remodelage vasculaire au cours de l'HTAP se traduirait surtout par un effet sur les CML, de manière VEGFR indépendante. En effet, 2 modèles *in vivo* montrent l'augmentation de production de VEGF par les CML qui régulerait via l'axe TGF- β /NADPH la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) par les CML, impliquées dans le remodelage vasculaire. De même, une surproduction de VEGF par les CML peut être induite par un taux élevé d'IL-6, favorisant un phénotype prolifératif et anti-apoptotique. Son impact chez l'Homme reste donc à être élucidé. [34]

- Platelet-derived Growth Factor (PDGF)

Voir : VIII Voie des Platelet-derived Growth Factor

- i. Facteurs de transcription

Au cours de l'HTAP, le Nuclear Factor of Activated T cells (NFAT) est surexprimé dans les CML et les cellules inflammatoires. [52] En réponse à différents stimuli, dont l'hypoxie, il induit la transcription de médiateurs pro-inflammatoires comme les interleukines et le TNF, et active les lymphocytes B et T. [53] Il provoque également la diminution de l'expression par les myocytes cardiaques des canaux potassiques voltage-dépendants Kv1.5 suite à un infarctus du myocarde [54], contribuant à leur prolifération, et contrôle l'expression de nombreux gènes de la fonction mitochondriale. [55]

L'Hypoxia Induced Factor 1 α (HIF-1 α) est un facteur de transcription qui régule les réponses transcriptionnelles à l'hypoxie. HIF est un hétérodimère constitué de 2 sous unités : HIF-1 β , exprimé constitutivement, et HIF-1 α dont la régulation est dépendante de l'oxygène. [56] En normoxie, cette sous-unité est dégradée par hydroxylation de ses résidus proline [57] tandis qu'en hypoxie, cette dégradation est inhibée. L'accumulation d'HIF-1 α va permettre sa dimérisation avec HIF-1 β entraînant la transcription de ses gènes cibles. [56] Ces gènes sont impliqués dans différents processus tel que la vascularisation dépendante du VEGF, l'érythropoïèse, la prolifération, la migration et le métabolisme cellulaire.

L'hypoxie provoque ainsi la prolifération des CML. [58] Indépendamment de l'hypoxie, ET-1 augmente également la quantité de transcrits de HIF-1 α dans les CML vasculaires, et son inhibition prévient la prolifération des CML induite par l'HC *in vitro*. [59] Ainsi, l'augmentation d'ET-1 dans l'HTAP permettrait l'accumulation d'HIF-1 α dans les CML, entraînant leur prolifération et participant au remodelage vasculaire.

La voie du Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) est également suractivée dans les CE de patients HTAPi. Cette suractivation pourrait être liée à la dérégulation de la voie des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). En effet, physiologiquement, cette voie inhibe la croissance cellulaire en inactivant STAT3 via les protéines Smads. Ainsi, l'absence de l'effet inhibiteur de la voie BMP permet une activation constante de STAT3, participant ainsi à la prolifération et à la résistance à l'apoptose des CE pulmonaires lors de l'HTAP. [20]

j. Facteurs génétiques

La principale mutation génétique identifiée comme étant associée à l'HTAP est celle du gène *BMPR2* avec perte de fonction. Ce récepteur sérine/thréonine kinase appartient à la superfamille des récepteurs TGF- β et est exprimé à la surface des CE pulmonaires, des macrophages et dans une moindre mesure des CML et fibroblastes.

BMPR2, constitutivement actif, forme un hétérotétramère avec l'un des récepteurs de type I : BMPR1-A (ou activin receptor like 3 (ALK3)), BMPR1-B (ALK6), ALK1, ALK2 qu'il va activer par phosphorylation en présence de ligands : BMP 2, 4, 6, 7, 9, 10 ; GDF 5, 6. Le BMPR1 initie alors la transduction intracellulaire du signal via la signalisation canonique ou non canonique.

La voie canonique ou Smad dépendante correspond à la phosphorylation des Smads 1, 5 et 8 qui forment un complexe avec Smad 4. Ce complexe est transféré dans le noyau afin de réguler, en coopération avec d'autres facteurs de transcription, co-activateurs et corépresseurs, la transcription de nombreux gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

La signalisation non canonique (Smad indépendante) correspond à l'activation de différentes voies incluant la Phosphoinositide 3-kinase/AKT (PI3K/AKT), les Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), la PKC. Au niveau du poumon, BMPR2, BMPR1-A et ALK2 sont exprimés à la fois par les CE et les CML tandis qu'ALK1 est exprimé uniquement par les CE.

Des études permettent ainsi d'établir le modèle d'interaction ligand/récepteur suivant : CE pulmonaires : BMP 9/10 avec BMPR2/ALK1 ; CML pulmonaires : BMP 2/4 avec BMPR2/ALK3 et BMP 5/6/7 avec BMPR2/ALK2. (Fig 8) [60], [61]

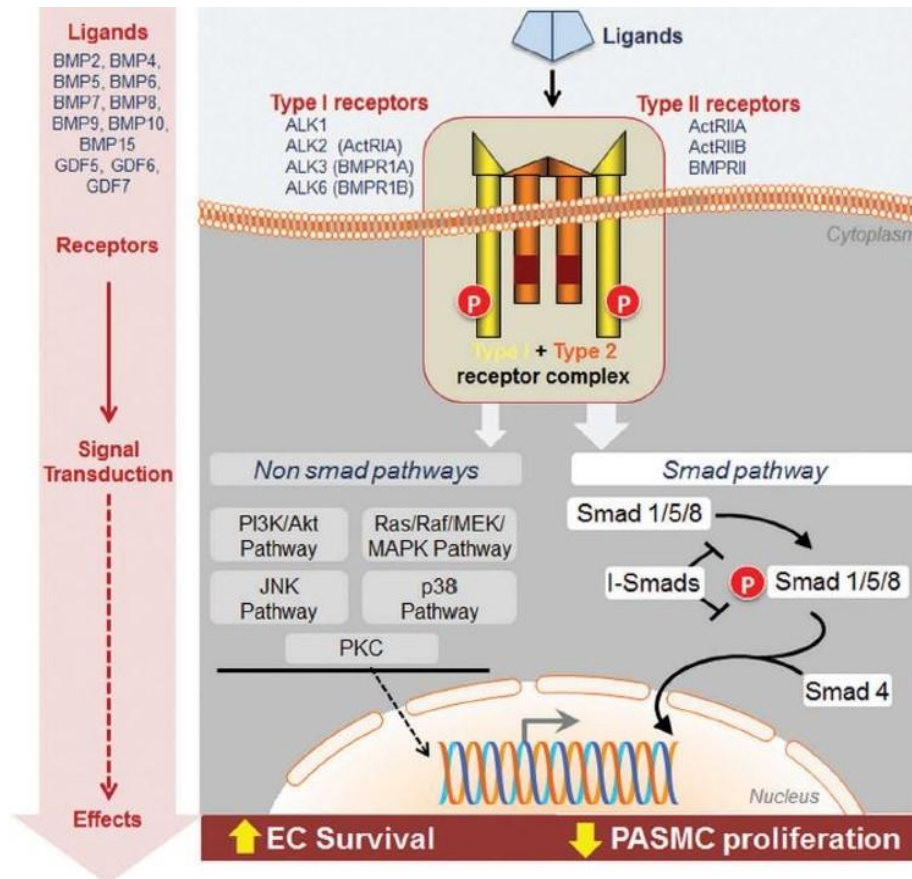


Figure 8 : Voie de signalisation de BMPR2.

La transduction du signal de BMPR2 s'effectue selon 2 voies : la voie canonique, dépendante des SMAD et non canonique, indépendante des SMAD. Cette signalisation favorise la survie des cellules endothéliales et réprime la prolifération des cellules musculaires lisses. (D'après Guignabert *et al.* 2017) [61]

Découvertes en 2000 par 2 groupes indépendants (Fig 9) [62], [63], les mutations germinales de BMPR2 sont retrouvées dans près de 80% des HTAPh et entre 10-30% des HTAPi. [64], [65] Près de 500 mutations de *BMPR2* ont été identifiées, incluant des mutations non sens, faux sens, des défauts d'épissages, des délétions et des duplications. [61], [65] Dans 70% des cas, la mutation monoallélique entraîne la production d'une protéine tronquée rapidement dégradée et dans 30% des cas, la production d'une protéine non fonctionnelle et non adressée à la surface membranaire, à l'origine d'une haplo-insuffisance. [65]

Cependant, il s'agit d'une prédisposition génétique pour l'HTAP à pénétrance faible (environ 14% chez l'homme et 42% chez la femme) suggérant qu'une mutation hétérozygote de *BMPR2* est nécessaire mais pas suffisante pour déclencher la pathologie. [61], [66], [67] Le dysfonctionnement de *BMPR2* entraîne un déséquilibre entre prolifération et apoptose des CE et CML.

En effet, *in vitro*, les BMP 2, 4 et 7 inhibent la prolifération de CML isolées d'artère pulmonaire saine et stimulent leur apoptose. En revanche, ils n'ont plus d'effet inhibitoire sur la prolifération de CML de patients ayant une mutation du récepteur. A l'inverse des CML, la prolifération et la migration des CE sont stimulées par BMP4 qui inhibe également leur apoptose. Ainsi la mutation de *BMPR2* serait en partie responsable de l'apoptose des CE, observée au cours de l'HTAP. [65] La déficience en *BMPR2* va également promouvoir l'expression par les CML de B-cell lymphoma-extra large (Bcl-xL), un régulateur négatif de l'apoptose, et au contraire, l'inhiber dans les CE, entraînant ainsi l'effet apoptotique inverse observé dans ces 2 types cellulaires. De plus, l'effet pro-survie des CE est médié par l'interaction entre *BMPR2* et *ALK1*, ainsi la mutation de *BMPR2* diminue l'interaction entre ces 2 récepteurs, favorisant l'apoptose des CE. [68] Il s'avère également que les patients HTAPi sans mutation de *BMPR2*, ont une diminution d'expression du récepteur par les CML pulmonaires. Cette diminution serait due à l'ubiquitination et à la dégradation du récepteur par les lysosomes. Chez des rats exposés à la MCT, l'expression d'ARNm de *BMPR2* est également réduite. Cependant, un traitement à la chloroquine des rats monocrotaline augmente la quantité de protéine, sans améliorer l'expression d'ARNm, en inhibant le mécanisme d'autophagie cellulaire. L'administration quotidienne de chloroquine chez ces rats prévient également l'augmentation de la pression ventriculaire droite (PVD) et l'hypertrophie du ventricule droit (VD). Elle diminue aussi la muscularisation des artérioles pulmonaires et prévient de l'hypertrophie de la media en réduisant la prolifération des CML induite par la MCT et en favorisant leur apoptose, probablement médié par la signalisation *BMPR2*. [69]

Dans une moindre mesure, d'autres mutations génétiques dans d'autres gènes ont également été identifiées. (**Fig 9**) En effet, en 2001, des mutations ont été identifiées pour *ALK1* et l'*endogline*, 2 autres récepteurs de la superfamille du TGF- β , dans des cas HTAPh associées à une télangiectasie hémorragique héréditaire. [66], [70] *ALK1* promeut la prolifération et la migration des CE via *BMPR2* et la voie canonique. La mutation du gène de l'activin receptor-like kinase 1 (*ACVRL1*) entraîne une diminution d'expression d'*ALK1* ainsi qu'une baisse du signal Smad 1/5/8. [71] L'*endogline*, essentiellement exprimée par les CE, est un co-récepteur qui va stabiliser l'hétérocomplexe formé par les récepteurs de type 1 et 2, et réguler la spécificité de la transduction du signal. La mutation du site d'épissage provoque une haploinsuffisance, empêchant une bonne signalisation, et cause une dérégulation de l'angiogenèse et une prolifération aberrante des CE. [71] La mutation de *SMAD9*, codant pour Smad 8, est également observée dans des cas HTAPh.

Cependant les conséquences de cette mutation ne sont pas bien établies puisque la perte de fonction de Smad 8 peut être compensée par Smad 1 et 5. Enfin la mutation de *BMPRIIB* a également été détectée dans 2 cas d'HTAP. [72]

L'ensemble de ces études montre l'importance de la voie BMPR-II dans la pathologie de l'HTAP.

Plus récemment, en 2012, une mutation du gène caveolin 1 (*CAV1*), a également été identifiée. La cavéoline 1 est une protéine membranaire qui régule notamment la fonction endothéliale ainsi que la perméabilité des CE pulmonaires, en se liant à l'eNOS grâce à son domaine d'ancrage, inhibant ainsi son activité enzymatique. [73] De plus, son expression est réduite dans les vaisseaux remodelés des patients HTAP, suggérant que sa perte participe au phénotype prolifératif et apoptose résistant des CE pulmonaires. [71] En 2013, c'est une mutation dans le gène codant pour le canal potassique à 2 pores *KCNK3* qui est découverte. Ce canal est exprimé par les CML pulmonaires et favorise la vasodilatation et active l'apoptose. Sa perte de fonction favorise ainsi une vasoconstriction et la prolifération des CML. [66]

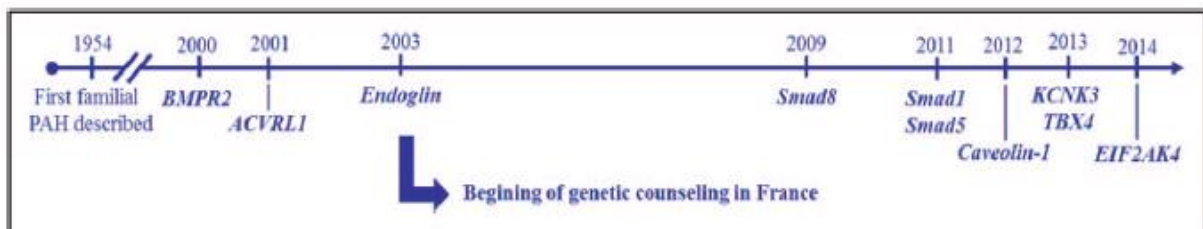


Figure 9 : Chronologie de la découverte des différents gènes mutés impliqués dans l'HTAPh.

(D'après Girerd *et al.* 2017) [67]

V. Traitements

Actuellement, il n'existe aucun traitement curatif de l'HTAP, cependant des thérapies permettent de ralentir sa progression et/ou d'améliorer la qualité de vie des patients, en améliorant les constantes hémodynamiques des patients. Les principales thérapies ciblent les 3 voies majeures impliquées dans le développement de l'HTAP : (Fig 10) [4]

- Voie de l'endothéline
- Voie du monoxyde d'azote
- Voie de la prostacycline

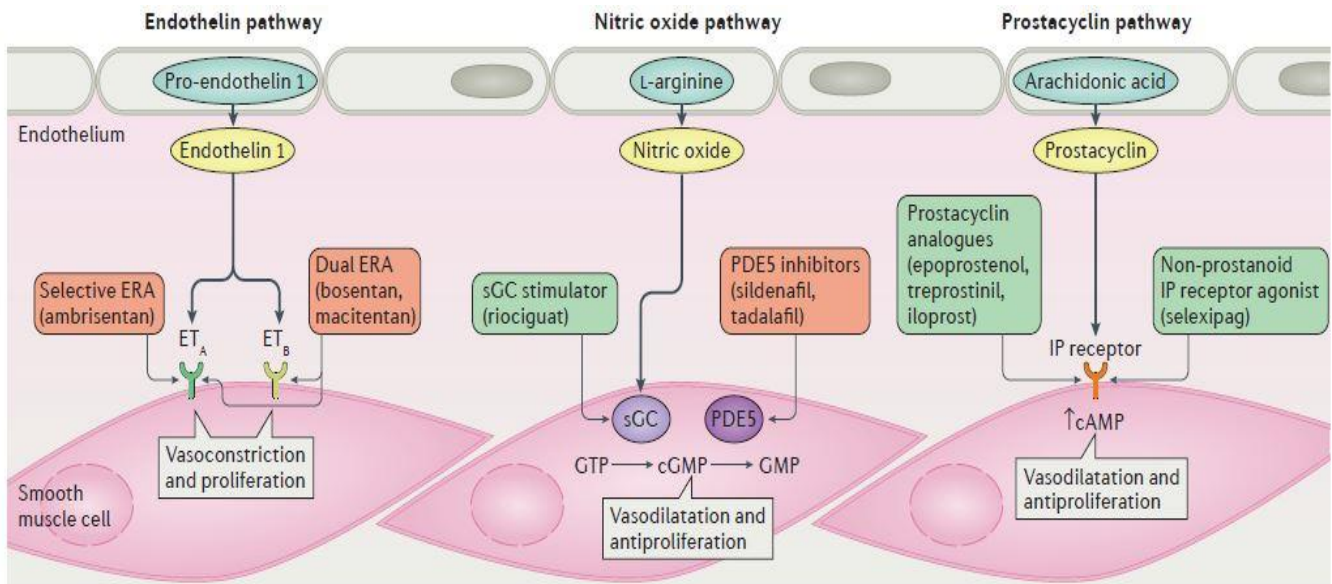


Figure 10 : Cibles moléculaires des différentes thérapies utilisées dans l'HTAP.

La dysfonction endothéliale et la communication altérée entre CE et CML qui en découle, impactent 3 voies principales : la voie de l'endothéline, la voie du monoxyde d'azote et la voie de la prostacycline. Les traitements actuels sont dirigés contre ces 3 voies afin : 1) d'inhiber la vasoconstriction et la prolifération des CML : antagonistes des récepteurs à l'endothéline, inhibiteurs de PDE5, et 2) de favoriser la vasodilatation et l'inhibition de la prolifération des CML : prostacycline et dérivés, et stimulateur de la guanylate cyclase soluble (sGC). (D'après Lau *et al.* 2017) [4]

Le traitement de l'HTAP et le choix des thérapies suivent un algorithme précis, en fonction de la réaction du patient à ces dernières. (Fig 11)

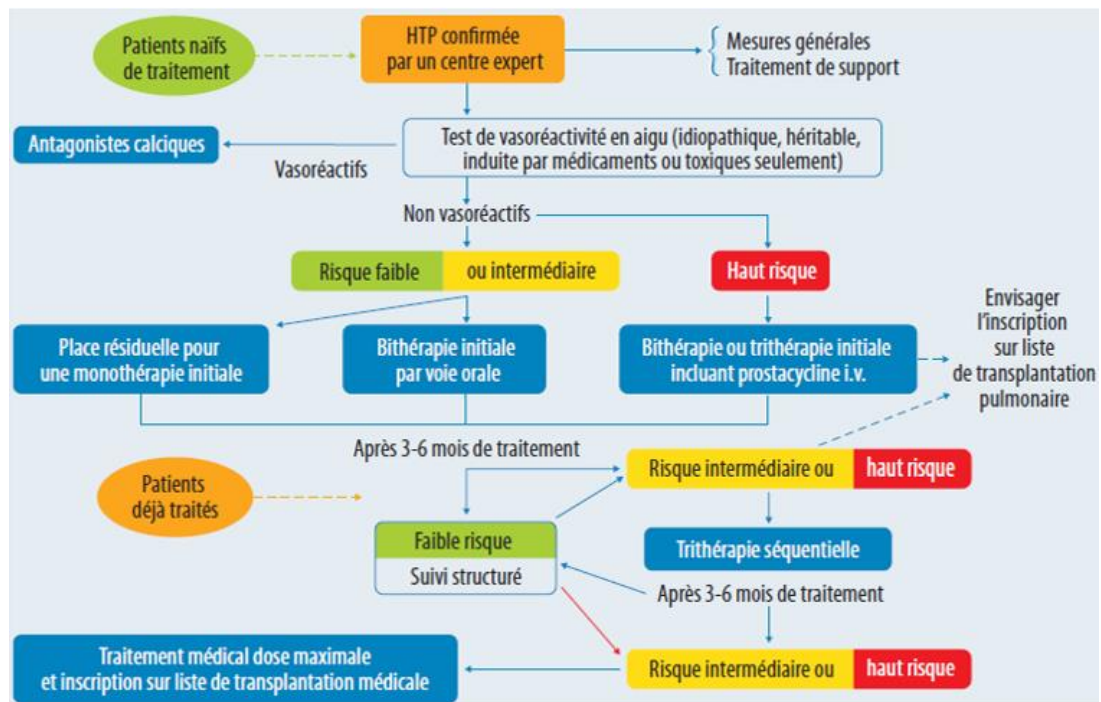


Figure 11 : Algorithme de traitement dans l'HTAP.

Une fois le diagnostic de l'HTAP confirmé, un test de vasoréactivité va être réalisé afin d'adapter la stratégie thérapeutique. Selon l'évolution de la réponse du patient au traitement, cette stratégie peut évoluer. [3]

1. Analogues de la prostacycline

La PGI2 synthétisée par les CE est un puissant vasodilatateur permettant la relaxation des CML, inhibant leur prolifération et diminuant l'agrégation plaquettaire. Or, dans le cadre du dysfonctionnement endothélial observé au cours de l'HTAP, une diminution de sa synthèse par les CE est constatée. Ainsi, l'utilisation de prostacycline ou de dérivés (Epoprosténol, Tréprostinil...) a montré leur efficacité dans l'amélioration des paramètres hémodynamiques. Cependant, la demi-vie courte de l'Epoprosténol nécessite un mode d'administration conséquent. En effet, il s'agit d'une administration continue par voie intra veineuse, à l'aide d'une pompe connectée à un cathéter introduit dans la veine sous clavière. Ce traitement est préconisé essentiellement pour les patients de la classe fonctionnelle IV. Bien que sa demi-vie soit quelque peu plus longue (2-4h), l'administration du Tréprostinil se fait également en continue par perfusion sous cutanée à l'aide d'une pompe.

Plus récemment, un agoniste non prostanoïde du récepteur IP est venu renforcer l'arsenal thérapeutiques (Selexipag).

2. Antagonistes des récepteurs à l'ET-1

L'ET-1 est un vasoconstricteur synthétisé par les CE qui stimule aussi la prolifération des CML et dont le taux est augmenté chez les patients HTAP. Les inhibiteurs de l'ET-1 (Bosentan, Ambrisentan, Macitentan) sont administrés par voie orale, et sont mieux tolérés que les analogues de la PGI2. Ils sont conseillés pour les HTAP de classe fonctionnelle II-III.

3. Inhibiteurs des phosphodiésterases 5 et stimulateur de la guanylate cyclase

Au cours de l'HTAP, les CML présentent de faibles quantités de GMPc dues à la baisse de production de NO par les CE et une plus grande quantité de PDE5 qui dégrade la GMPc. Cette faible quantité de GMPc induit la prolifération des CML ainsi que leur contraction. L'utilisation d'inhibiteur de PDE5 (Sildénafil, Tadalafil) permet donc d'augmenter la quantité de GMPc entraînant la relaxation des CML et réduisant leur prolifération. Afin d'augmenter la quantité de GMPc, la sGC sert également de cible thérapeutique grâce au Riociguat qui stimule directement l'enzyme et améliore sa sensibilité au NO.

4. Antagonistes calciques

Depuis le 6^e symposium mondial de l'HP, un nouveau sous-groupe d'HTAP a été décrit : les répondeurs à long terme aux inhibiteurs calciques. En effet, dans certains cas, le phénomène de vasoconstriction est supérieur aux effets du remodelage vasculaire. L'utilisation d'antagonistes calciques (Diltiazem, Nifédipine, Amlodipine) n'a aucun impact sur le remodelage vasculaire pulmonaire mais permet la relaxation des CML, offrant un bénéfice clinique significatif à ces patients.

Malgré les avancées et les améliorations des traitements, l'efficacité de ceux-ci reste limitée à 2-3 ans, l'ultime solution restant la transplantation cardio-pulmonaire.

VI. Les modèles animaux

Différentes causes peuvent être à l'origine d'une élévation de la pression dans la circulation pulmonaire. En effet, le développement de l'hypertension pulmonaire peut être associé à un environnement inflammatoire chronique (sclérodémie, lupus, VIH), à une hypoxie (maladie pulmonaire obstructive chronique, fibrose pulmonaire idiopathique, vie en haute altitude), à des embolies (drépanocytose, thrombose chronique), ou être une conséquence d'un défaut cardiaque congénital ou d'une insuffisance cardiaque aiguë avec fraction d'éjection préservée. Il y a aussi les HTAPh (cause génétique) et HTAPi dont l'étiologie exacte n'est pas totalement élucidée. Ainsi, il n'existe pas une forme d'HTAP mais des HTAP. Par conséquent, différents modèles animaux ont été développés afin de mimer au mieux la pathologie humaine, et selon l'aspect à étudier, on privilégiera un modèle plutôt qu'un autre. Par convention, le terme HTAP est réservé à la pathologie humaine, tandis que pour les modèles expérimentaux, on utilisera uniquement le terme d'hypertension pulmonaire (HP).

1. Le modèle d'hypoxie chronique

L'exposition de souris ou de rats à une HC (10-12% d'oxygène) est le modèle le plus commun utilisé dans l'étude de l'HP, les rats étant plus sensibles que les souris. [74] Les rongeurs sont généralement exposés à l'HC pendant 2 à 4 semaines, bien qu'ils puissent survivre sous cette condition. Les animaux présentent une perte de poids, une augmentation de l'hématocrite, une altération des propriétés mécaniques de l'os, une hypertrophie du ventricule droit et un remodelage des vaisseaux pulmonaires. Le remodelage vasculaire est similaire à celui des patients HTAP. En effet, les poumons des rongeurs exposés à l'HC présentent une augmentation du nombre de petits vaisseaux muscularisés dès 4 jours d'HC (principalement non muscularisés en normoxie) [12], un épaississement de la media dès 10 jours d'HC (hypertrophie et hyperplasie des CML) et de l'adventice (hyperplasie et hypertrophie des fibroblastes) des vaisseaux muscularisés, une inflammation périvasculaire avec une forte présence de cellules et médiateurs pro-inflammatoires, et développent une fibrose autour des larges vaisseaux. [75], [76] Cependant, contrairement à l'Homme, aucune lésion de type plexiforme ne se développe.

Le modèle de l'HC présente également des similarités moléculaires avec la pathologie humaine puisque les CE surexpriment l'ET-1 et son récepteur ET_B [77], [78], et les CML expriment davantage de PDE5 [79] et de 5-HTT [80] mais présentent moins de canaux potassiques voltage-dépendants à leur surface. [81] De plus, la signalisation BMPR2 est diminuée. En revanche, l'HC s'accompagne d'une augmentation d'expression d'eNOS (contrairement au rat MCT) [82] et d'une augmentation de la synthèse de prostacycline. [83] De plus, après retour à la normoxie, l'essentiel de ces changements est réversible et revient à des valeurs normales : poids, hypertrophie ventricule droit, épaissement de la media et de l'adventice. [84]

Le modèle de l'HC peut être couplé avec l'utilisation d'un inhibiteur de l'angiogenèse (inhibiteur du VEGFR2) : Sugen5416 (SU546). Le remodelage vasculaire devient alors plus important et surtout, chez le rat, des lésions vasculaires complexes apparaissent, similairement aux lésions plexiformes qui se développent chez l'Homme.

2. Le modèle monocrotaline

La MCT est un alcaloïde toxique issu de la plante *Crotalaria spectabilis* dont l'injection chez le rat provoque une hypertension pulmonaire. Bien que le mécanisme d'action précis selon lequel agit la MCT reste inconnu, ses effets se produisent avec une unique injection en sous-cutanée ou intrapéritonéale de 60-80 mg/kg chez le rat. Quelques heures après l'injection, les premiers dommages vasculaires pulmonaires surviennent. Au bout d'1 semaine, l'endothélium est atteint à grande échelle, de nombreuses cellules inflammatoires sont présentes et des œdèmes se forment. Cependant, il faut attendre 2 semaines post-injection pour observer une augmentation significative de la résistance vasculaire pulmonaire et de la PAPm, (30 à 50 mmHg versus 16-18 mmHg chez les rats contrôles) et 3 semaines post-injection pour que cette augmentation des résistances induise une hypertrophie du ventricule droit. C'est également à 3 semaines qu'une diminution du nombre de vaisseaux périphériques est observée, et que l'augmentation de la proportion de vaisseaux pulmonaires muscularisés et l'augmentation de l'épaisseur de la media deviennent significatives. En plus du remodelage vasculaire, ce modèle est particulièrement adapté pour étudier le versant inflammatoire de la pathologie et son impact sur les dommages et le remodelage vasculaires pulmonaires puisqu'il est associé à une importante accumulation de différents types de cellules et cytokines pro-inflammatoires. Similairement à l'HC et la pathologie humaine, ce modèle présente une altération des voies de l'ET-1, du NO, de la sérotonine et du BMPR2, et les CML sous-expriment les canaux potassiques Kv1.5.

Contrairement à l'HC, il s'agit d'un modèle d'HP plus sévère (inflammation plus marquée, développement de lésions), non réversible et conduisant à la mort des animaux (5-6 semaines post-injection, 50% des rats meurent). [85] De plus, la combinaison de la MCT à une pneumectomie induit la formation de lésions intimes comparables aux lésions plexiformes. [86]

Ce modèle d'induction est très peu voire pas du tout utilisé chez la souris qui semble bien plus protégée contre les effets toxiques de la monocrotaline que le rat. Bien qu'elle ne développe pas les mêmes symptômes que ce dernier, la souris présente tout de même des lésions pulmonaires aiguës 7 à 10 jours post-induction, suivi d'une résorption de l'œdème pulmonaire entre le 14^e et 21^e jour post-induction. L'une des explications serait liée à une forte métabolisation de la monocrotaline par les CYP3A4, impliqués dans le métabolisme des médicaments. [85]

3. *BMPR2* mutation et combinaison

La mutation du gène *BMPR2* est retrouvée dans près de 75% des cas d'HTAPh. Cependant, cette mutation a une pénétrance faible puisqu'environ 30% des femmes et 10% des hommes développent la maladie. Cette faible pénétrance est retrouvée dans les modèles de rongeurs.

En effet, bien que les souris homozygotes KO *BMPR2* soient non viables, en absence de facteurs complémentaires, la majorité des souris hétérozygotes ne présentent pas de symptômes. [87] Malgré l'absence ou le faible développement spontanée d'HP chez les souris *BMPR2*^{+/-}, ces dernières répondent de manière plus sévère à l'HC, à la sérotonine ou à un épisode inflammatoire. Récemment, une lignée de rat *BMPR2* muté (monoallélique) a été développée. Tout comme l'Homme et la souris, ces animaux développent spontanément une HP avec une faible pénétrance (16-27%). Cependant, similairement aux souris *BMPR2* mutées, ces rats sont plus sensibles à l'HC que les rats wild type (WT). [88]

VII. Cellules souches et progéniteurs dans l'hypertension artérielle pulmonaire

1. Notion de cellules souches et progéniteurs

La cellule souche (CS) se caractérise selon 2 grandes capacités : son auto-renouvellement et son importante plasticité. [89] L'auto renouvellement permet à la cellule de maintenir presque indéfiniment un pool stable de cellules souches pouvant se différencier en 1 ou plusieurs types cellulaires afin de maintenir l'intégrité et d'assurer le renouvellement d'un tissu. Selon leur degré de plasticité, c'est-à-dire la capacité des CS à se différencier en différents types cellulaires, on distingue les cellules souches :

- totipotentes : capables de donner tout type cellulaire et donc de former un organisme
- pluripotentes : capables de donner tout type cellulaire, excepté les annexes embryonnaires
- multipotentes : capables de donner tout type cellulaire issu d'un lignage spécifique
- unipotentes : capables de donner un unique type cellulaire

Les progéniteurs présentent un état intermédiaire entre la cellule souche unipotente et la cellule mature spécialisée. Ils ont une forte capacité proliférative mais une capacité d'auto-renouvellement limitée. [90]

Les progéniteurs vasculaires, résidents ou circulants, sont retrouvés notamment dans les 3 tuniques du vaisseau (adventice, media, intima). Selon les signaux émis dans le micro-environnement, ils peuvent se différencier en un ou plusieurs types cellulaires vasculaires : CE, CML, myofibroblaste.

Il est donc primordial d'étudier et de caractériser ces progéniteurs vasculaires qui sont à l'origine de cellules matures et actrices du remodelage vasculaire lors de l'HTAP, afin de mettre en évidence leur potentiel thérapeutique.

2. Les progéniteurs vasculaires et le remodelage vasculaire au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire

a. Les cellules progénitrices endothéliales

Les cellules progénitrices endothéliales (CPE) ont été identifiées et isolées de la circulation sanguine pour la première fois en 1997 par Asahara *et al.*, grâce à l'expression de 2 antigènes : le cluster of differentiation 34 (CD34) et le VEGFR-2. [91]

Les CPE, dont la définition ne cesse d'évoluer et reste controversée, participent à l'homéostasie vasculaire en intervenant dans la régénération physiologique ou pathologique (lésion) de l'endothélium ainsi que dans la néo-angiogenèse. [92] On distingue les CPE circulantes, issues de la moelle osseuse (MO) et les CPE résidentes, localisées dans la zone subendothéliale de l'intima ou dans la zone vasculogénique entre la media et l'adventice. [93], [94] Les CPE peuvent donc être isolées à partir de la MO, du sang périphérique et de la paroi des vaisseaux sanguins. *In vitro*, elles ont la capacité de former des colonies, des structures angiogéniques et de se différencier en CE matures exprimant : platelet endothelial cell adhesion molecule 1 (PECAM1/CD31), VE-cadhérine, von willebrand factor (VWF). De plus, les CPE résidentes ont la capacité de se différencier en CML. [95], [96] Ces progéniteurs forment donc une population hétérogène rendant difficile l'établissement d'une classification des marqueurs. D'un point de vue expérimental, on considère généralement comme CPE les cellules : CD34⁺/VEGFR-2⁺ ; CD133⁺/VEGFR-2⁺ ; CD133⁺/CD34⁺/VEGFR-2⁺ associé ou non au marqueur tyrosine-protein kinase Kit (c-kit). (Fig 12) [94]

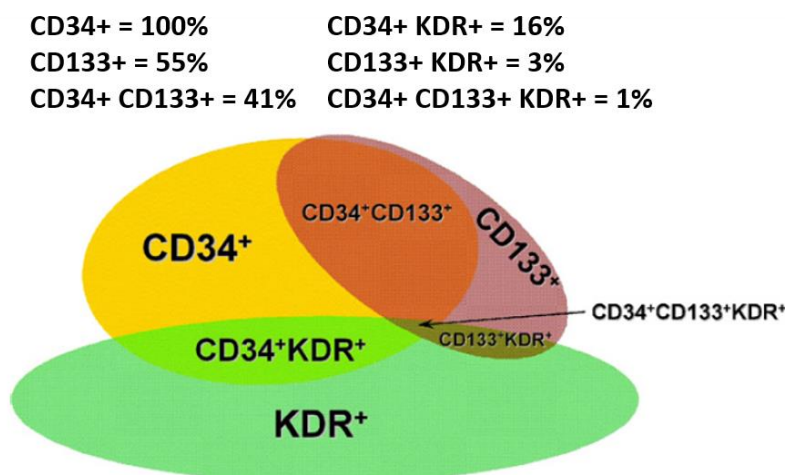


Figure 12 : Diagramme de Venn simplifié représentant les différents sous type de CPE.

Ce diagramme présente la répartition et la fréquence des différentes CPE identifiées chez 439 sujets sains et atteints de pathologies cardiovasculaires. Les fréquences ont été calculées relativement au nombre de cellules CD34 (arbitrairement à 100). CD34, CD133 : cluster of differentiation 34, 133 ; KDR : kinase insert domain receptor (VEGFR-2) (D'après Fadini *et al.* 2008) [97]

Le rôle des CPE dans l'HTAP reste à être clairement défini et les données scientifiques peuvent paraître contradictoires. En effet, certaines études indiquent une diminution du nombre de CPE circulantes dans le sang de patients HTAP, en association à de mauvais paramètres hémodynamiques et à une concentration anormalement élevée de marqueurs inflammatoires. [98]–[101] En plus d'être diminuées *in vivo*, les CPE isolées de chiens de race beagles ayant reçu une injection de MCT ne présentent plus d'activité de vasculogénèse *in vitro*. [102] La diminution du nombre de CPE pourrait donc être un biomarqueur de sévérité et de mauvais pronostic de la pathologie, les CPE ne pouvant plus contribuer à la réparation de l'endothélium. A l'inverse, d'autres études constatent une augmentation des CPE chez les patients [103]–[107] ainsi que leur présence dans les lésions plexiformes, [108] suggérant leur implication dans le remodelage vasculaire à un stade tardif. [98] Ces différences de résultats peuvent notamment s'expliquer par les différentes méthodes et combinaisons de marqueurs utilisés pour détecter les CPE ainsi que le stade de la pathologie chez les patients.

b. Les progéniteurs de cellules musculaires lisses

La néomuscularisation des artéioles pulmonaires normalement non muscularisées et la muscularisation anormale des vaisseaux partiellement muscularisés sont caractéristiques de l'HTAP. Les CML présentes dans la media des artères pulmonaires sont l'un des acteurs majeurs intervenant dans ce processus. [109], [110] Sheikh *et al.* ont identifié et caractérisé une population spécifique de CML localisée à la bordure de la zone muscularisée-non muscularisée des artéioles saines. Chez la souris exposée à une HC, ces CML $\alpha\text{SMA}^+/\text{SM-MHC}^+/\text{PDGFR-}\beta^+$ (platelet derived growth factor receptor β) vont suivre un programme séquentiel de dédifférenciation/redifférenciation afin de s'épandre le long de la zone initialement non muscularisée. En effet, au cours de l'HC, on observe une baisse d'expression de SM-MHC (marqueur terminal de différenciation) associée à l'acquisition d'un phénotype progéniteur grâce à l'expression du facteur pluripotentiel kruppel-like factor 4 (KLF4). Cette dernière est induite par l'activation de PDGFR- β suite à l'augmentation de l'expression et sécrétion du PDGF-B par les CE pulmonaires. Leurs expériences ont montré que PDGF-B et KLF4 sont nécessaires à la migration distale des progéniteurs. Dans un second temps, PDGF-B va entraîner l'augmentation de l'expression d'*HIF1- α* par les progéniteurs $\alpha\text{SMA}^+/\text{PDGFR-}\beta^+/\text{KLF4}^+$, permettant ainsi leur prolifération. Après expansion, les progéniteurs se redifférencient : expression de SM-MHC et perte d'expression de PDGFR- β . (**Fig 13**) Chez les patients HP et HTAP, on observe également une augmentation du nombre de CML PDGFR- $\beta^+/\text{KLF4}^+$ ainsi qu'une forte corrélation avec les CML prolifératives. [109], [111], [112]

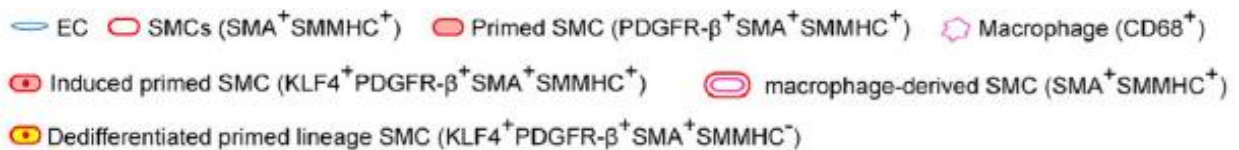
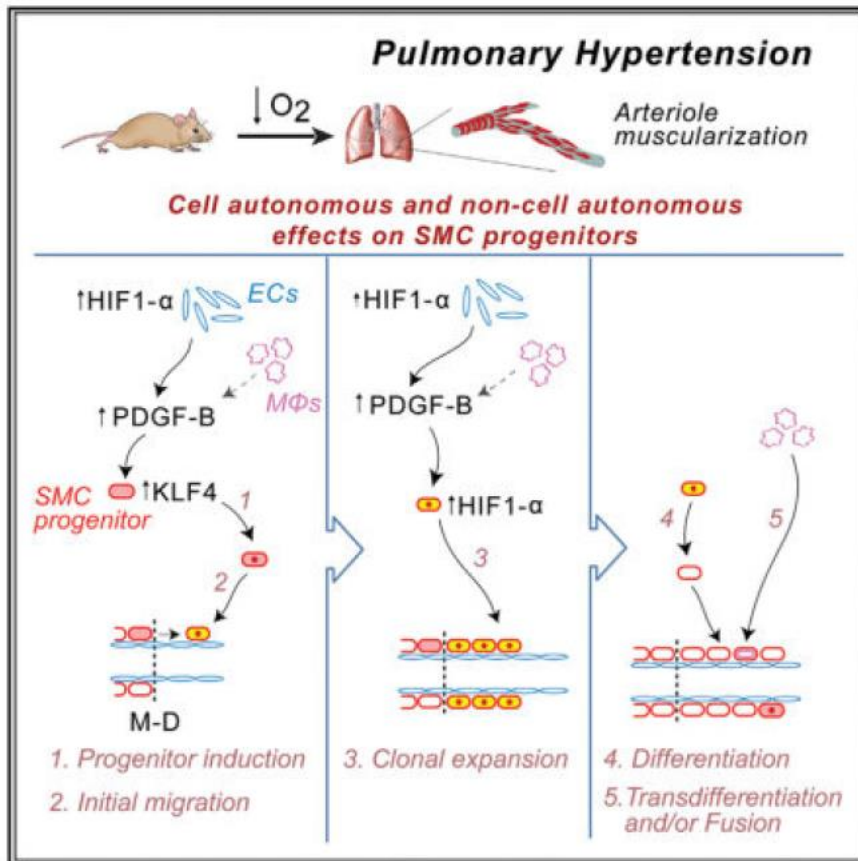


Figure 13 : Régulation de la prolifération des CML localisées à la bordure de la zone muscularisée-non muscularisée, induite par l'HC.

Au cours des 3 premiers jours d'HC, l'expression d' $HIF-1\alpha$ et de $PDGF-BB$ par les cellules endothéliales (EC) et les macrophages (MΦ) induisent l'expression de $PDGFR\beta$ et $KLF4$ dans les cellules musculaires lisses (SMC) distales, leur conférant un phénotype de progéniteur (induced primed SMC) (1) et leur permettant une migration initiale (dedifferentiated primed lineage SMC) (2). Entre le 5^e et 7^e jour d'HC, ces progéniteurs expriment à leur tour $HIF-1\alpha$, induisant leur expansion clonale (3). Enfin, ces progéniteurs se redifférencient en CML matures (SMC $SMA^+ SMMHC^+$) (4). De plus, certains macrophages se transdifférencient en CML ou fusionnent avec des CML existantes (5). (D'après Sheikh *et al.* 2018) [112]

Les nouvelles CML sont également issues de la différenciation de différentes CS/progénéiteurs.

- Les péricytes

Les péricytes forment une population hétérogène, identifiée comme étant une sous-population de cellules souches mésenchymateuses (CSM). En effet, des péricytes isolés de poumons présentent *in vitro* les mêmes propriétés (établies par la société internationale de recherche sur les cellules souches) que les CSM, comme l'adhérence au plastique et la capacité de différenciation en chondrocytes, adipocytes et ostéoblastes. [113], [114] C'est à la fin des années 70, grâce à leurs travaux sur le rat exposé à une HC, que Meyrick *et al.* ont découvert que les péricytes participaient à la néomuscularisation des artérioles non muscularisées en se différenciant en CML. [115] En 2004, il a également été proposé qu'une dérégulation du recrutement des péricytes soit à l'origine du développement d'une HP chez 2 nourrissons atteints du syndrome d'Adams-Oliver. [116] Plus récemment, ce sont les travaux du groupe de C. Guignabert qui ont renforcé le rôle des péricytes comme source de CML au cours du remodelage vasculaire pulmonaire. Ils ont en effet montré une augmentation de la couverture péricytaire des vaisseaux pulmonaires dans les modèles d'HP induit par HC ou injection de monocrotaline. [43] De plus, ces nouveaux péricytes adoptent un phénotype contractile en exprimant l' α SMA. [43], [117], [118] Différents facteurs interviennent dans ce recrutement. Les taux élevés de FGF2 et d'IL-6 sécrétés par les CE, le taux élevé de stromal cell-derived factor 1 (SDF1) (tant chez les patients que dans les modèles animaux), tout comme la surexpression du C-X-C chemokine receptor 7 (CXCR7) par les péricytes de patients HTAPi contribuent ensemble à la prolifération excessive ainsi qu'à la migration des péricytes. [43], [117], [118] *In vitro*, en présence de TGF- β , les péricytes acquièrent un phénotype contractile en exprimant α SMA, SM22 α et la calponine, se différenciant en CML-like. [117] Ce phénotype contractile a pu être observé *in vivo* suite à une HC et une HC+SU5416, avec une augmentation du pourcentage de péricytes α SMA⁺. [43], [117], [118] L'augmentation de la couverture péricytaire exprimant le marqueur 3G5-defined ganglioside (3G5⁺) est également retrouvée dans les poumons de patients HTAPi et HTAPh avec une faible proportion de péricytes α SMA⁺/SM22⁺, contrairement aux péricytes de poumons contrôles, négatifs pour ces 2 marqueurs de CML. [43] De plus, les péricytes de patients HTAPi présentent une surexpression du récepteur au TGF- β de type 2, renforçant l'implication de la voie TGF- β dans l'acquisition du phénotype contractile. [117]

Récemment, une étude a montré un chevauchement important du profil transcriptomique des CML et des péricytes de patients HTAP, en comparaison de donneurs sains, renforçant le rôle des péricytes comme source de CML. [118] L'ensemble de ces études démontrent ainsi que les péricytes participent à la musculation des vaisseaux pulmonaires au cours de l'HTAP comme progéniteurs de CML.

- Les cellules souches/progénitrices mésenchymateuses

Les CSM ont été localisées dans de nombreux organes tel que la MO, le tissu adipeux, le muscle, la pulpe dentaire [119] mais se situent aussi de façon périvasculaire. [120], [121] Elles forment une population très hétérogène (expression de nombreux marqueurs de CS non spécifiques aux CSM) partageant des caractéristiques communes. *In vitro*, elles sont capables d'adhérer au plastique, de former des colonies à partir d'une cellule unique (colony-forming-unit fibroblast : CFU-F) et sont capables de se différencier en ostéoblastes, chondrocytes et adipocytes dans les conditions de culture adéquates. [122]

In vivo, selon le tissu et leur micro environnement, les CSM peuvent également se différencier en d'autres types cellulaires (myocytes, ténocytes, fibroblastes). (Fig 14)

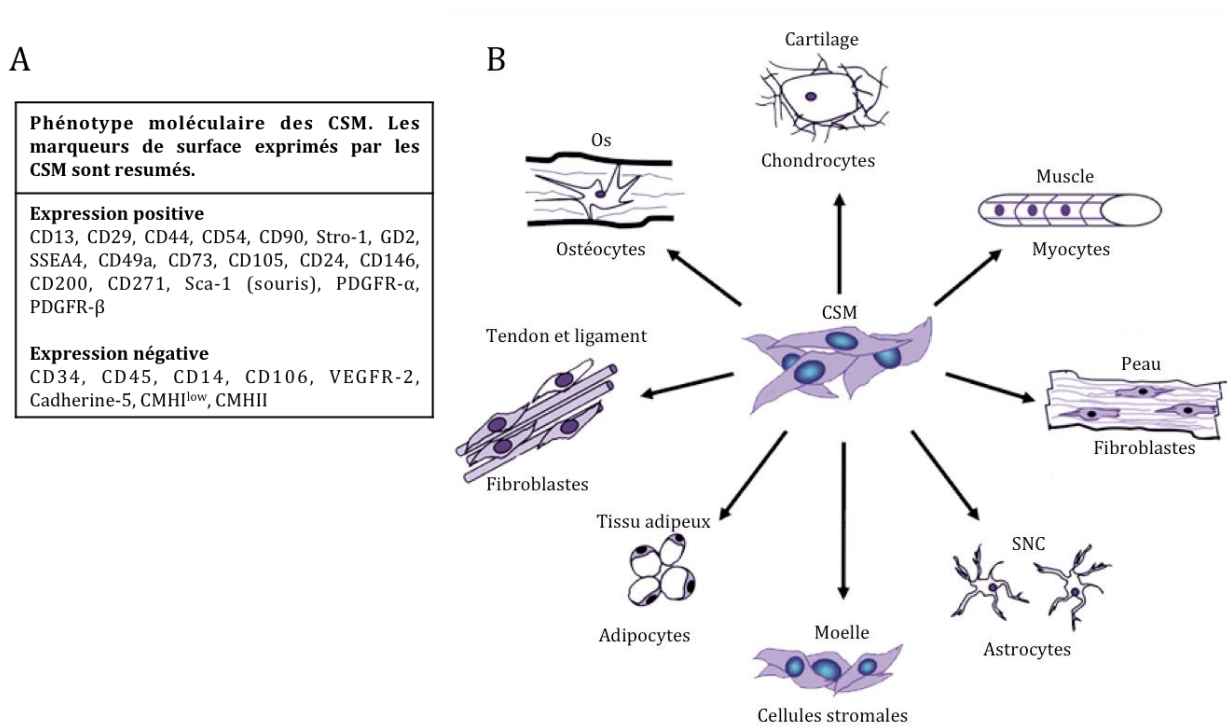


Figure 14 : Récapitulatif du phénotype moléculaire (A) et schéma du potentiel de différenciation (B) des CSM.

SNC : système nerveux central (D'après Dierick F. 2015) [123]

Des études montrent l'existence de CSM pulmonaires résidentes ainsi que leur potentiel de différenciation en CML-like. En étudiant les cellules ATP-binding cassette super-family G member 2 positives (ABCG2⁺) (« side population »), Chow *et al.* ont identifié une population de CSM périvasculaire positive pour les marqueurs suivants : CD90, CD73, CD44, endogline, vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), stem cell antigen 1 (Sca1). *In vitro*, cette population est capable de se différencier en CML/myofibroblastes (α SMA⁺) et en péricytes positifs pour le marqueur neural/glial antigen 2 (NG2). De plus, *in vivo*, lorsqu'elles sont spécifiquement déplétées de l'enzyme antioxydante extracellulaire superoxyde dismutase (EC-SOD), elles contribuent au remodelage vasculaire pulmonaire induit par HC en adoptant un phénotype contractile (α SMA⁺). L'acquisition d'un phénotype contractile par ces cellules serait donc liée à un micro environnement oxydatif et à une altération de la voie canonique Wnt/ β -caténine. Ces cellules ABCG2⁺ forment ainsi un potentiel réservoir de progéniteurs de cellules vasculaires pouvant participer au remodelage vasculaire pulmonaire. [68]

Récemment, notre équipe a également identifié une nouvelle population de progéniteurs mésenchymateux résidents caractérisés par l'expression de la Protein Widely 1 (PW1), présents à la fois chez la souris et l'Homme et dont je vous décrirais le rôle dans un paragraphe dédié.

- Les cellules souches hématopoïétiques

Des expériences de transplantation de MO ont également permis de mettre en évidence le recrutement de CS/progéniteurs hématopoïétiques circulants lors du remodelage vasculaire pulmonaire au cours de l'HP. En effet, suite à une HC, les poumons des souris chimères présentent une accumulation de cellules dérivées de la MO, dont certaines co-expriment α SMA, indiquant l'acquisition d'un profil de CML-like. [124], [125] Cependant, il semblerait que dans le modèle du rat MCT+pneumectomie, ce recrutement soit moins important/conséquent. [126] Actuellement, il n'existe pas de marqueurs consensus de ces progéniteurs, mais c-kit est couramment utilisé pour les définir. Ainsi, dans des poumons hypoxiques, une accumulation de cellules c-kit⁺/Sca1⁺/ α SMA⁺ est observée au niveau des vaisseaux, cette dernière pouvant être prévenue par l'inhibition des voies CXCR4/CXCR7. [127]–[129] Lors de l'HC, Sheikh *et al.* ont également observé des macrophages CD68⁺/ α SMA⁺ suggérant le recrutement de macrophages se transdifférenciant en CML-like ou fusionnant avec certaines CML. [112] Dans les poumons de patients HTAPi, Montani *et al.* ont identifié et montré l'accumulation de 2 populations de progéniteurs circulants dérivés de la MO : CD34^{high}/CD133^{high}/c-kit^{high}/CXCR4^{low} et CD34^{low}/CD133^{low}/c-kit^{low}/CXCR4^{high} avec une localisation périvasculaire ainsi que dans les lésions plexiformes. Tout comme dans les modèles animaux, certaines de ces cellules co-expriment α SMA, suggérant un potentiel de différenciation en myofibroblastes/CML. [130]

- Cellules endothéliales et transition endothélio-mésenchymateuse

Différentes études *in vitro* ont montré la capacité des CE à suivre une transition endothélio-mésenchymateuse (EndoMT) et à se transdifférencier en CML-like. [131], [132] Ce mécanisme participe à l'épaississement de l'intima au cours de l'embryogenèse, [133], [134] et intervient également dans certains contextes pathologiques (fibrose cardiaque, fibrose rénale...) contribuant ainsi à l'excès de cellules α SMA⁺. [135] Différentes études *in vitro* suggèrent ainsi l'implication de l'EndoMT comme source de CML-like lors du remodelage vasculaire au cours de l'HTAP. En effet, après exposition à une HC, ou au SU546, les CE adoptent un phénotype transitoire de co-expression de marqueurs endothéliaux et de marqueurs de CML : α SMA et calponine. L'acquisition de ce phénotype mixte est associée à la surexpression de différents facteurs tel que la myocardine (impliquée dans la différenciation des CML) et/ou la Galectine 3 (Gal3) (impliquée dans différents processus tel que la prolifération et différenciation cellulaire, l'angiogenèse et notamment dans la prolifération des CML lors de l'HTAP). [136]–[138]

L'EndoMT *in vitro* peut également être déclenchée par différents facteurs surexprimés *in vivo* et chez les patients, tel que l'ET-1, [139] ou des cytokines pro-inflammatoires TNF α /IL-1 β associé au TGF- β . [140] Cette transdifférenciation est aussi décrite *in vivo* dans les modèles d'HP induite par MCT ou par HC/SU5416. En effet, on observe dans l'endothélium de ces animaux des cellules transitoires, co-exprimant α SMA avec PECAM1 (CD31), [139] CD34, [141] VWF [140] ainsi que des cellules α SMA⁺/SMMHC⁺ dérivées de cellules Tie2⁺ (tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) et de cellules VE-cadherine⁺ dans la néointima. [142] Dans ces modèles, l'EndoMT serait médiée par HIF1 α et la Twist related protein 1 (Twist1). [141], [143] Enfin, l'EndoMT est décrite dans les poumons HTAP, au niveau de l'intima et des lésions plexiformes, avec des cellules co-exprimant CD31/CD34/VE-cadherine avec α SMA [141], [142] ou au niveau de l'endothélium : VWF/ α SMA. [140] Bien qu'il ne s'agisse pas à proprement parler de CML, les CE, via l'EndoMT, contribuent au remodelage vasculaire au cours de l'HTAP, comme source de progéniteurs de CML-like. Cependant, la compréhension des mécanismes régulant ce phénomène au cours de l'HTAP nécessite plus d'investigation.

- Les fibrocytes et fibroblastes

Les fibrocytes sont des progéniteurs mésenchymateux du lignage des monocytes/macrophages. Ils co-expriment ainsi CD34, des marqueurs monocytaires : CD45, CD14, CD11, et des marqueurs de fibroblastes : collagène-I, collagène-III et vimentine. [144]

Ils produisent et sécrètent des composants de la MEC et contribuent à la fibrogenèse pulmonaire dans différentes pathologies fibrotiques telles que la fibrose pulmonaire idiopathique, la sclérodermie et l'HP. [144], [145] En réponse à l'hypoxie, les fibrocytes circulants sont recrutés et s'accumulent dans l'adventice des vaisseaux pulmonaires. La déplétion de ces cellules circulantes atténue fortement l'épaississement de l'adventice induit par HC, et diminue l'accumulation de myofibroblastes ainsi que le développement de la fibrose adventitielle. [145], [146] De plus, le nombre de fibrocytes circulants est significativement augmenté chez les individus HP par rapport aux individus sains. [147]

Les fibroblastes adventitiels contribuent à la fibrose et à l'épaississement adventiciel, et participent également au remodelage vasculaire en se transdifférenciant en myofibroblastes impliqués dans la formation de la néointima. [38], [148]

c. Les progéniteurs mésenchymateux PW1⁺

Récemment, notre équipe a découvert dans le poumon une nouvelle population de progéniteurs mésenchymateux résidents identifiée par l'expression du marqueur de CS PW1. [149] Les progéniteurs pulmonaires PW1⁺ sont présents aussi bien chez l'Homme que le rongeur. Chez les 2 espèces, ils sont périvasculaires, cependant ils sont dispersés chez la souris tandis qu'ils sont organisés en clusters chez l'Homme. (Fig 15) [12]

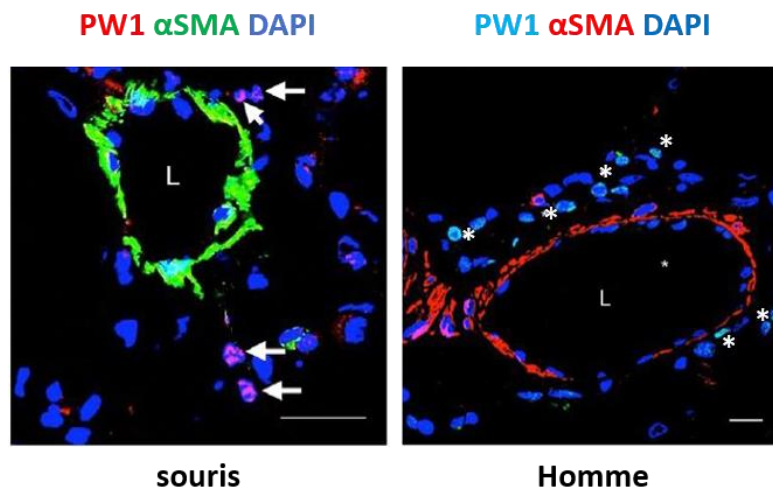


Figure 15 : Progéniteurs périvasculaires pulmonaires PW1⁺.

Immunofluorescences représentatives de vaisseaux pulmonaires musclarisés (α SMA⁺) et des progéniteurs PW1⁺ chez la souris et chez l'Homme (indiqué par des flèches ou étoiles). Echelle : 20 μ m ; L : lumière. (D'après Dierick *et al.* 2016) [12]

Chez la souris, grâce à une analyse par cytométrie en flux, 3 sous-populations de progéniteurs PW1⁺ ont été identifiées dans le poumon : PW1⁺/CD34⁺/c-kit⁺, PW1⁺/CD34⁺/c-kit⁻/PDGFRα⁺ et PW1⁺/CD34⁻/CD146⁺ correspondant à des péricytes. Afin de les étudier et de suivre leur devenir, une souris transgénique exprimant la β-galactosidase (β-gal) sous contrôle du promoteur PW1 a été utilisée. [149] La demi-vie de la β-gal étant supérieure à celle de PW1, elle permet d'identifier les cellules PW1⁺ ainsi que les cellules issues de leur différenciation même lorsque PW1 n'est plus exprimé.

En sortie de Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), les progéniteurs PW1⁺ de poumons de souris n'expriment pas les marqueurs de CML αSMA et SM-MHC. [12] Cependant, *in vitro*, la population PW1⁺/CD34⁺/c-kit⁻/PDGFRα⁺ se différencie spontanément en CML-like. En revanche, la différenciation de la population PW1⁺/CD34⁺/c-kit⁺ nécessite d'être induite par du TGF-β et du PDGF-BB dans le milieu de culture.

In vivo et en normoxie, de nombreuses CML co-expriment la β-gal dans ce modèle transgénique : β-gal⁺/αSMA⁺ : 35±2,2% ; β-gal⁺/CNN1⁺ : 44±3,3% ; β-gal⁺/SM-MHC⁺ : 54±7,3%. De plus, suite à 4 jours d'HC, l'augmentation significative de ces 2 populations de progéniteurs (également observée chez le rat MCT) s'accompagne d'une néomuscularisation et d'une augmentation du nombre de CML β-gal⁺/PW1⁻. Ces résultats confirment le rôle de progéniteurs de CML de ces 2 populations. Ce rôle est également fortement suggéré chez l'Homme puisque dans les poumons de patients HTAP, de nombreuses cellules PW1⁺/αSMA⁺ sont retrouvées dans la néo-intima et la media des vaisseaux remodelés.

Concernant le recrutement des progéniteurs PW1⁺, cette étude a démontré l'implication de la voie SDF-1/CXCR4 dans leur différenciation en CML mais pas dans leur prolifération. Or ces cellules expriment également un marqueur fortement mitogène et impliqué dans la différenciation cellulaire : PDGFRα dont l'activation pourrait induire/réguler la prolifération et différenciation des progéniteurs PW1⁺.

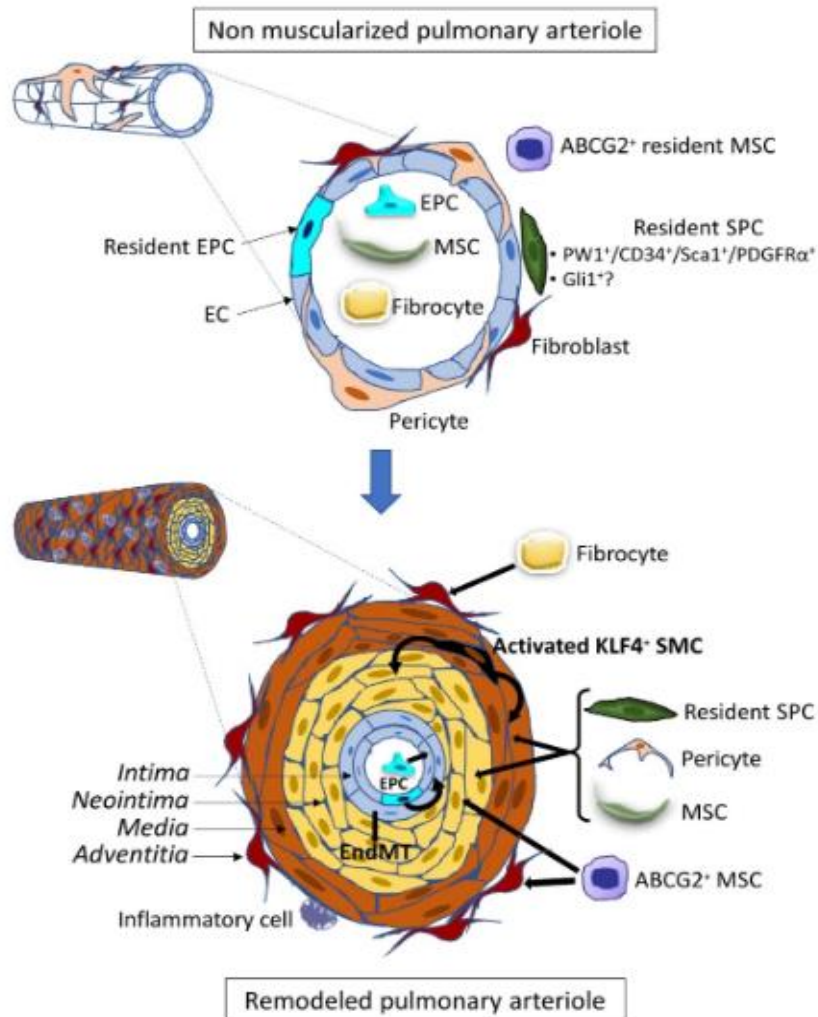


Figure 16 : Implication des cellules souches et progéniteurs au cours du remodelage vasculaire lors de l'HTAP.

EPC : cellule progénitrice endothéliale ; EC : cellule endothéliale ; MSC : cellules souches mésenchymateuses ; SPC : progéniteur de cellules musculaires lisses. (D'après Dierick *et al.* 2021) [150]

3. Aspects thérapeutiques des cellules souches et progénitrices dans l'hypertension pulmonaire

Différentes études *in vivo* ont analysé les effets d'une thérapie cellulaire par injection intra veineuse de CPE. Il s'avère que ces effets sont très mitigés. Certaines études ont montré l'apport bénéfique d'une inoculation de CPE dans le modèle du rat MCT mais pas chez la souris en HC. Cependant, chez la souris, des CPE dérivées de la MO limitent le remodelage vasculaire pulmonaire suite à une lésion vasculaire. De même, des CPE à croissance tardive issues de la MO participent à la réparation vasculaire systémique suite à une lésion, mais pas à la régénération vasculaire pulmonaire suite à l'injection de MCT. De plus, l'injection de CPE dérivées de la MO n'a aucun impact sur l'HP induite suite à une pneumectomie. Ces différents aspects peuvent s'expliquer par les différences sources de CPE et les différents mécanismes impliqués selon le modèle d'étude.

Cependant, les CPE constituent un outil biologique important, permettant différentes manipulations pré-injection afin d'optimiser leur capacité régénérative.

En effet, leur conditionnement avec de la pinocembrine conduit à une augmentation de la production de NO et de VEGF par les CPE qui, après transplantation, réduisent l'inflammation induite par la MCT et améliorent la fonction endothéliale. L'injection de CPE produisant de l'adrénomédulline améliore l'hémodynamique pulmonaire et augmente la survie par rapport à des CPE « WT ». L'interruption de la voie CD40 dans les CPE augmente leur incorporation dans l'intima et réduit leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, chez l'Homme, l'essai clinique PHACeT (Pulmonary Hypertension and Angiogenic Cell Therapy) a également montré un apport bénéfique à court terme de l'innoculation de CPE surexprimant l'eNOS sur les paramètres hémodynamiques de patients HTAP. [150]

L'administration de CSM dans les modèles expérimentaux d'HP a démontré un véritable potentiel thérapeutique en inversant le remodelage vasculaire, en réduisant la PAPm, l'inflammation et l'hypertrophie du VD. Du fait de leur faible incorporation dans les poumons, il semblerait que les effets des CSM se fassent principalement par action paracrine. Plus récemment, des études se sont portées sur les exosomes sécrétés par les CSM. Il s'avère que l'injection de ces exosomes atténue également le développement de l'HP expérimentale renforçant l'idée d'une action paracrine des CSM lors de l'HP. L'analyse du contenu de ces exosomes permettrait l'identification de nouveaux facteurs thérapeutiques contre l'HP. [151]

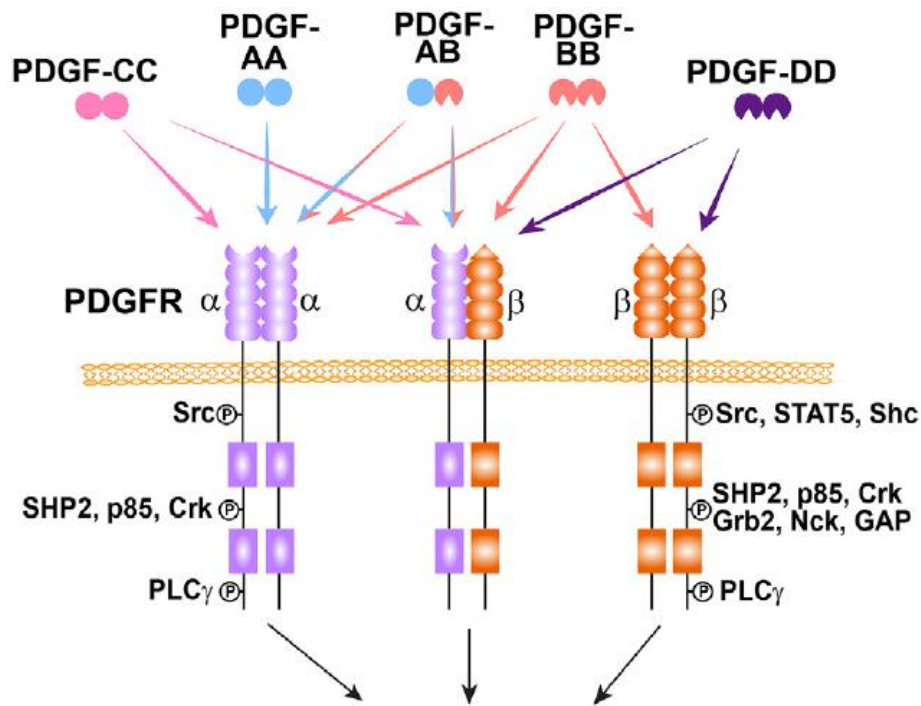
VIII. Voies des Platelet-Derived Growth Factor Receptors : PDGFR

1. Présentation

Les Platelet-derived growth factors (PDGF) furent initialement purifiés à partir de plaquettes humaines ce qui leur conféra leur nom. Lors de leur découverte aux débuts des années 70 par Balk, seul 2 PDGF furent identifiés : PDGF-A et PDGF-B. De nos jours, la famille des PDGF est composée de 4 membres :

- PDGF-A codé par le gène *PDGFA* situé sur le chromosome 7 humain (chromosome 5 chez la souris)
- PDGF-B codé par le gène *PDGFB* situé sur le chromosome 22 humain (chromosome 15 chez la souris)
- PDGF-C codé par le gène *PDGFC* situé sur le chromosome 4 humain (chromosome 3 chez la souris)
- PDGF-D codé par le gène *PDGFD* situé sur le chromosome 11 humain (chromosome 9 chez la souris) [152]–[154]

Synthétisés sous forme de précurseur inactif, ces protéines à motif cystine-knot agissent sous forme d'homo ou hétéro dimère : PDGF-AA, -BB, -AB, (environ 30 kDA) [155] -CC (36,7 kDA) [154], -DD (40,2 kDA) [154]. PDGF-A et PDGF-B présentent près de 60% d'homologie dans leur séquence en acide aminé [156] et sont activés par clivage protéolytique dans la cellule avant d'être sécrétés. La principale enzyme responsable de l'activation du PDGF-A est la proprotéine furine convertase, tandis que celle responsable de l'activation du PDGF-B reste inconnue. [157] A l'inverse, PDGF-C et PDGF-D sont activés par clivage protéolytique extra cellulièrement. [152] PDGF-C peut être activé par la plasmine, la teneur plasminogen activator, la matriptase et l'urokinase plasminogen activator [154] tandis que PDGF-D peut être activé que par la plasmine ou l'urokinase plasminogen activator. [158], [159] Ces dimères présentent différentes affinités pour leurs récepteurs : Platelet-derived growth factor receptor α et β (PDGFR α ou β), ainsi PDGF-AA et PDGF-CC se lient uniquement à PDGFR α , PDGF-DD uniquement à PDGFR β tandis que PDGF-BB peut se lier aux 2 isoformes. (**Fig 17**)



Cell proliferation, migration, differentiation, and survival

Figure 17 : Schéma d'activation des PDGFR par les PDGF.

Lors de la liaison du ligand au récepteur, celui-ci se dimérise et s'active par autophosphorylation pour transduire son signal. Les PDGF présentent différentes affinités avec les 2 isoformes de récepteur. Ainsi, l'homodimère PDGFR α est activé par PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-AB, l'homodimère PDGFR β est activé par PDGF-BB, PDGF-DD, et l'hétérodimère PDGFR α/β est activé par PDGF-AB, PDGF-BB, PDGF-CC, PDGF-DD. (D'après Lee et Li 2018) [154]

Les PDGFR sont des récepteurs transmembranaires appartenant à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III (RTK). Il existe 2 isoformes présentant 30% d'homologie dans leurs séquences d'acides aminés : [154]

- PDGFR α (CD140a) : \approx 170 kDA, codé par le gène *PDGFRA* situé sur le chromosome 4 humain (chromosome 5 chez la souris)
- PDGFR β (CD140b) : \approx 180 kDA) codé par le gène *PDGFRB* situé sur le chromosome 5 humain (chromosome 18 chez la souris) [156], [160]

La région extracellulaire du récepteur est constituée de 5 domaines de type immunoglobuline (Ig) et un domaine hélicoïdal. Un unique domaine transmembranaire la sépare de la région intracellulaire constituée d'un domaine juxtamembranaire et d'un domaine kinase séparé en 2 séquences par une région hydrophobe, caractéristique des RTK de classe III. [161].

Ces récepteurs se dimérisent en homo ou hétéro dimère lors de la liaison du ligand aux domaines Ig 2 et 3, le dimère étant ensuite stabilisé par des interactions électrostatiques entre les domaines Ig 4 et 5. [162] (Fig 18)

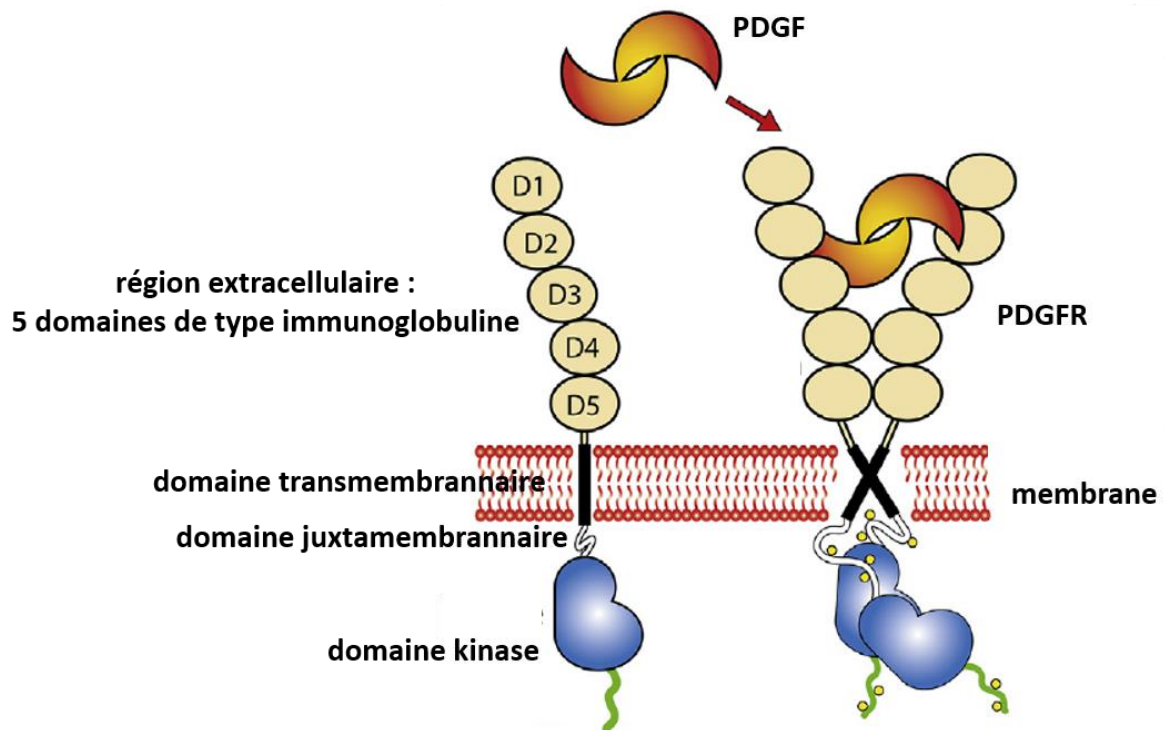


Figure 18 : Structure et dimérisation du PDGFR.

Le PDGF entraîne la dimérisation du récepteur en se liant aux domaines de type immunoglobuline Ig2 et 3 (D2 et D3). Le dimère, stabilisé par des interactions électrostatiques entre les domaines Ig4 et 5 (D4 et D5), s'autophosphoryle pour transduire son signal. (D'après Shang *et al.* 2017) [161]

Suite à cette liaison, le récepteur change de conformation afin de libérer l'accès du domaine de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) et s'autophosphoryle sur différents résidus tyrosine (Tyr). Cette autophosphorylation a 2 fonctions. La première est l'amélioration de l'effet catalytique de la kinase, grâce à la phosphorylation de la Tyr-849 pour le récepteur α et de la Tyr-857 pour le récepteur β . La seconde est de permettre le recrutement de différentes protéines adaptatrices contenant un domaine src homology 2 (SH2) afin d'assurer la transduction du signal via différentes voies de signalisation cellulaire. PDGFR β possède 13 sites d'autophosphorylation et PDGFR α en possède 10. (**Tableau 3**) La spécificité de liaison entre la protéine SH2 et la phosphotyrosine dépend des séquences d'acides aminés qui bordent cette dernière. Cette spécificité joue un rôle primordial dans la différence d'activité signalétique entre les 2 isoformes. [93], [156], [160]

PDGFR α	PDGFR β
Y572	Y562
Y574	Y579
Y720	Y581
Y731	Y716
Y742	Y740
Y754	Y751
Y762	Y763
Y849	Y771
Y988	Y775
Y1018	Y778
	Y857
	Y1009
	Y1021

Tableau 3 : Liste des sites de phosphorylation de PDGFR α et PDGFR β .

(D'après Heldin et Lennartsson 2013 et Shang *et al.* 2017) [161], [163]

Cette signalisation est contrôlée par différents mécanismes de rétrocontrôle négatif. Après activation, différentes tyrosines phosphatases peuvent se lier au récepteur pour le déphosphoryler ainsi que ses substrats : SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2), protein-tyrosin phosphatase 1B (PTP1B), T-cell protein tyrosine phosphatase (TC-PTP), density-enhanced phosphatase 1 (DEP-1) [156], [164]–[166] De plus, contrairement à PDGFR α , PDGFR β activé peut recruter Ras-GAP qui aura des effets similaires aux tyrosines phosphatases concernant sa désactivation. [167]. Enfin, la liaison du ligand au récepteur entraîne son internalisation par endocytose clathrine-dépendante, sa déphosphorylation et sa dégradation ubiquitine-dépendante dans les lysosomes [156], [168], [169] ou un retour à la membrane pour PDGFR β . [170] Le récepteur inactivé a une demi vie supérieure à 2h, tandis qu'activés, PDGFR α et β ont respectivement une demi vie de 5 et 30 min. [153]

PDGFR α peut également être activé indépendamment des PDGF. En effet, dans le cas de la vitréo-rétinopathie proliférante, le récepteur est activé indirectement par des facteurs de croissance autre que les PDGF. Ces facteurs de croissance activent leurs propres récepteurs qui, entre autres, augmentent le taux ROS dans la cellule.

Ce niveau élevé de ROS active un médiateur intracellulaire : la Src family kinase (SFK), qui a son tour active PDGFR α . Dans ce contexte, il s'agit d'une activation monomérique de PDGFR α dont l'internalisation sera beaucoup plus lente que celle du récepteur dimérisé. Cela a pour conséquence le maintien d'un récepteur actif avec une signalisation persistante. [171]

Contrairement à PDGFR α , PDGFR β ne peut être activé de cette manière du fait du recrutement de Ras-GAP qui inactive Ras et prévient l'établissement d'une telle signalisation. [172] Cependant, il peut être transactivé par l'angiotensine II [173] et la dopamine. [174] De plus, dans le sérum de patients atteints de sclérose systémique, des anticorps dirigés contre PDGFR α ont été découverts, permettant son activation de manière PDGF-indépendante et contribuant ainsi au développement de la maladie. [175] Enfin, des mutations génétiques peuvent entraîner la production de PDGFR α constitutivement actif dans certaines formes de tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). [176], [177]

De manière plus subtile, VEGFA peut se lier aux 2 isoformes de récepteurs en tant qu'antagoniste et avoir un rôle d'agoniste faible à une concentration supraphysiologique. [178]

Historiquement, les PDGF/PDGFR sont connus comme de puissants acteurs mitogènes pour les cellules mésenchymateuses (CML, fibroblastes, cellules gliales...). Cependant, différentes études ont également montré leurs effets dans de nombreux autres types cellulaires (**Tableau 4**): CS, progéniteurs, cellules neuronales, CE, cellules inflammatoires etc. [154]

PDGF Ligand	Tissue	Cell Type
PDGF-A	Kidney	Fibroblasts
	Brain, neural tissue	Vascular smooth muscle cells
	Heart	Vascular endothelial cells
	Liver	Neurons
	Testis	Macrophages
	Uterus	Platelets/megakaryocytes
	Vascular system	Epithelial cells
	Skeleton	Uterus endometrium/myometrium
	Lung	Skeletal myoblasts
		tLTs
PDGF-B	Vascular system	Fibroblasts
	Kidney	Vascular smooth muscle cells
	Neural tissue	Vascular endothelial cells
	Uterus	Neurons
		Macrophages
		Platelets/megakaryocytes
PDGF-C	Heart	Uterus endometrium/myometrium
	Pancreas	tLTs
	Kidney	Epithelial cells
	Ovary	Skeletal myoblasts
	Adrenal glands	Neurons
	Prostate	Vascular endothelial cells
	Uterus, placenta	Vascular smooth muscle cells
PDGF-D	Nervous system	
	Heart	Fibroblasts
	Pancreas	Smooth muscle cells
	Kidney	
	Ovary	
	Adipose tissue	
	Stomach	
	Bladder	
	Testis	
	Lung	

Tableau 4 : Profil tissulaire et cellulaire d'expression des PDGF chez l'Homme et la souris.

(D'après Noskovicova *et al.* 2015) [157]

3 principales voies sont notamment activées par les PDGF : (**Fig 19**) [154], [156], [157], [179]

- PI3K/Akt/mTOR : impliquée dans la réorganisation de l'actine, la prolifération, la croissance, la survie cellulaire et l'activité métabolique
- Ras-MAPK : impliquée dans la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire
- PLC γ /PKC : impliquée dans la mobilisation du calcium intracellulaire, la prolifération et la migration cellulaire

De par leurs actions, la voie des PDGF/PDGFR joue un rôle important au cours du développement embryonnaire ainsi que dans certains processus dans le tissu adulte.

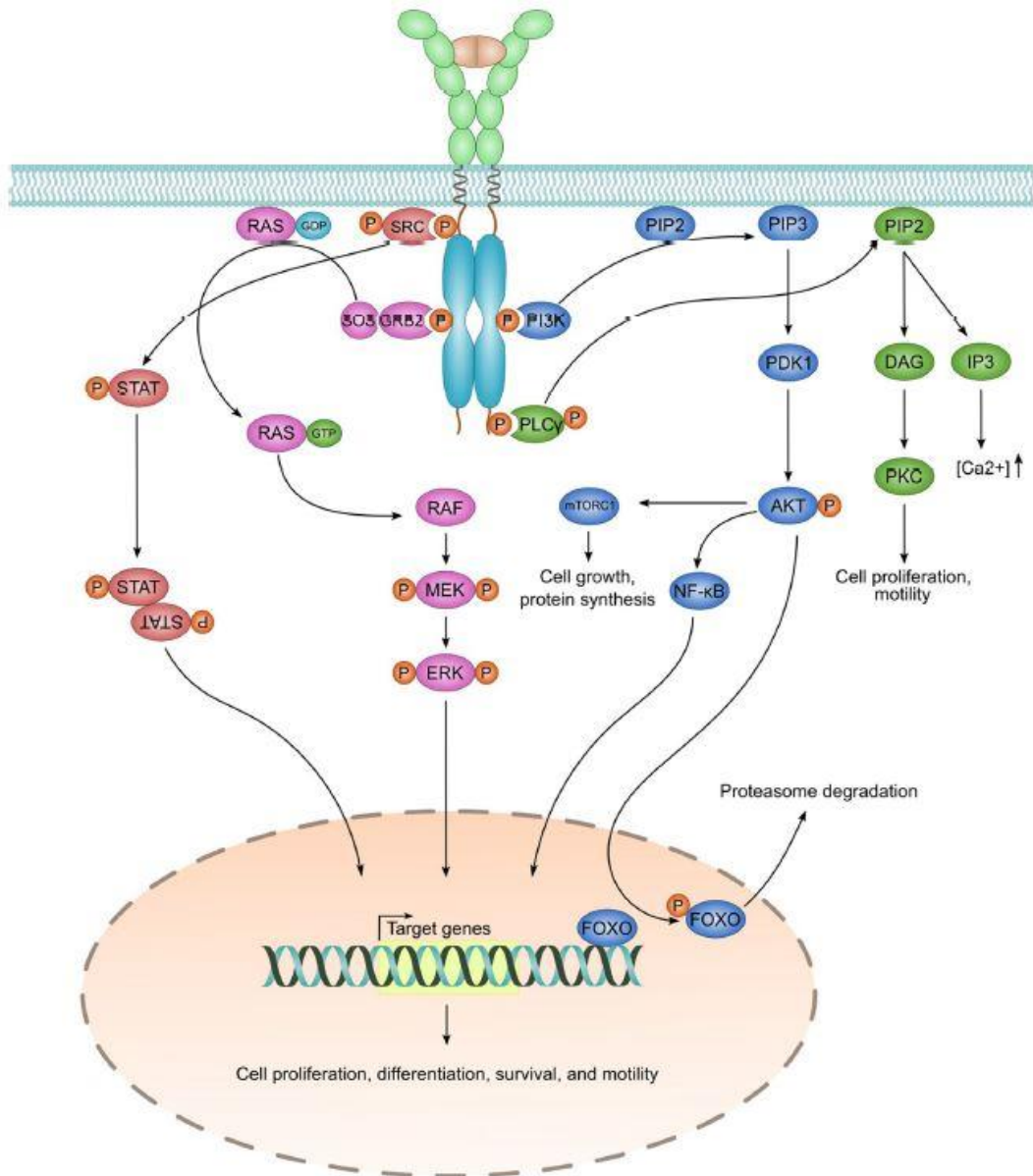


Figure 19 : Schéma des voies de signalisation des PDGF/PDGFR.

Selon les tyrosines phosphorylées, le récepteur va recruter différentes protéines partenaires et activer leur voie de signalisation respective (PI3K/AKT, MAPK, STAT, PLCγ) afin de promouvoir la prolifération, la différenciation, la migration et la survie cellulaire. (D'après Guérit *et al.* 2021) [180]

2. Rôle des PDGFR dans l'embryogenèse

a. Rôle de PDGFR α

PDGFR α joue un rôle important et capital dès les premiers stades du développement embryonnaire. En effet, la présence de PDGF-A et d'ARNm de PDGFR α est détectée dès le stade E6.5 chez la souris. De plus, la délétion de PDGFR α par mutation du gène (mutation *Patch (Ph)*) entraîne la mort des embryons *Ph/Ph* entre E8 et E16. [181] Afin de confirmer la contribution de PDGFR α dans le développement embryonnaire, des expériences d'hybridation *in situ* ont permis de déterminer le profil d'expression de PDGFR α au cours de l'embryogenèse et les embryons WT ont été comparés aux embryons *Ph/Ph*. [182] Aux stades E6 et E6.5, l'ARNm de PDGFR α est détecté uniquement dans l'endoderme extra-embryonnaire et aucune anomalie phénotypique n'est observée à ce stade dans les embryons *Ph/Ph*. Le premier tissu embryonnaire à exprimer le récepteur est le mésoderme lors de la gastrulation au stade E7. Une expression régionalisée et temporelle commence alors à être observée selon les stades de développement. L'expression du récepteur commence à être observée au stade E7.5 dans le tube neural, dérivé de l'ectoderme, tandis que dans l'endoderme et ses dérivés, PDGFR α n'est exprimé à aucun stade du développement. [182], [183]

Globalement, au cours du développement embryonnaire, PDGFR α est majoritairement exprimé dans les structures mésodermes et dans une moindre mesure dans certaines structures ectodermes. (**Fig 20**) De plus, son profil d'expression est corrélé avec les premières anomalies observées chez les embryons *Ph/Ph* (E9.5).

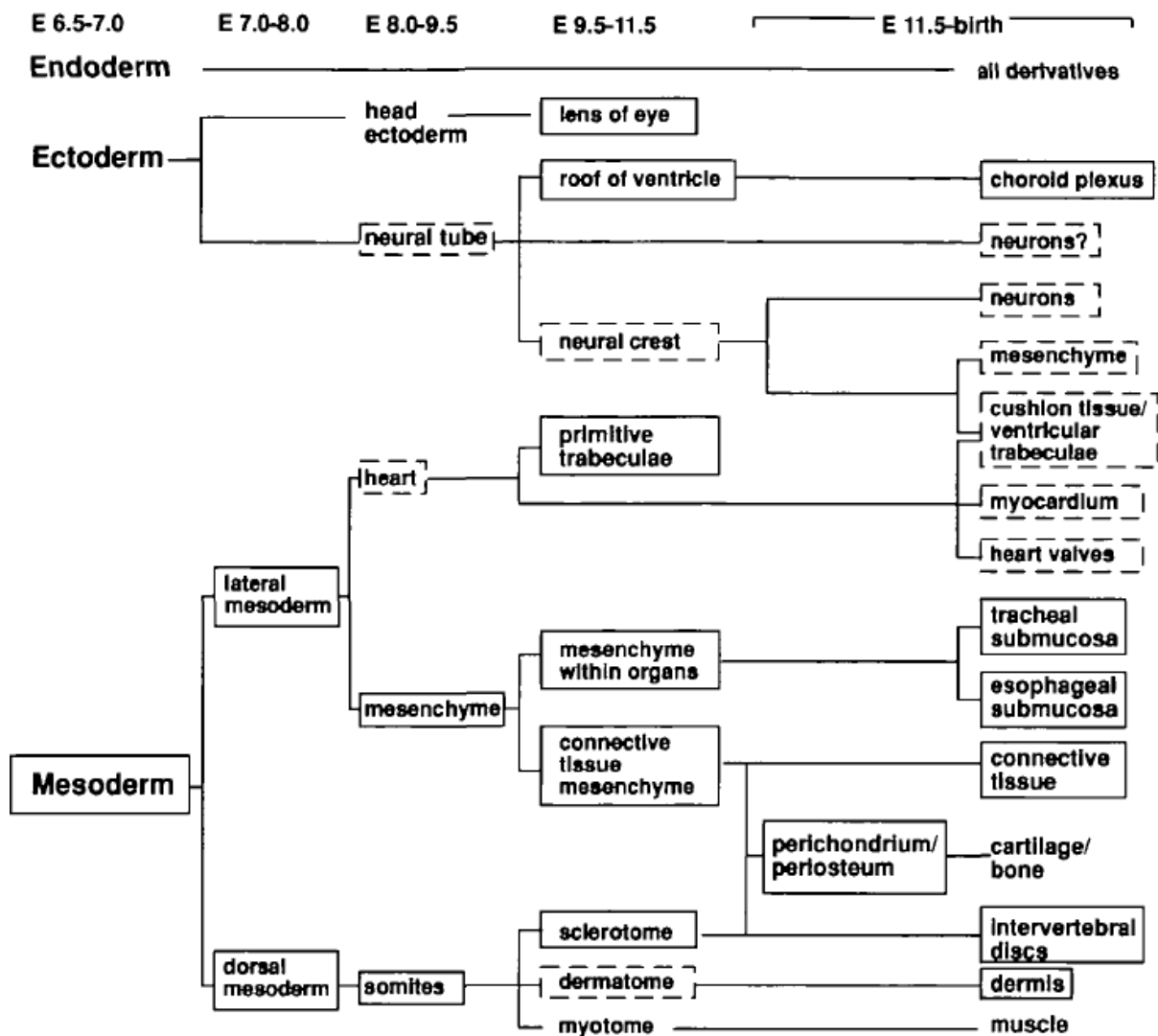


Figure 20 : Profil d'expression de pdgfra au cours de l'embryogenèse chez la souris.

Les tissus encadrés expriment le récepteur pendant toute la durée (ou en partie) développementale indiquée. Les cadres pleins indiquent que toutes les cellules du tissu expriment PDGFR α tandis que ceux en pointillés indiquent une expression localisée dans des zones précises du tissu. (D'après Schatteman *et al.* 1992) [182]

Enfin, le profil d'expression de l'ARNm de PDGFR α obtenu par différentes études d'hybridation *in situ* menées aux débuts des années 90 [182] a été confirmé et précisé en 1997 en utilisant cette fois-ci un anticorps (Ac) monoclonal dirigé spécifiquement contre le récepteur : APA5. [184], [185] (Tableau 5)

Stage and area	In situ hybridization	APA5 staining
Egg cylinder stage		
Ectoplacental cone	+	+
Parietal endoderm	+	+
Extraembryonic visceral endoderm	+	+
Embryonic endoderm	Faint	Faint
Early primitive streak		
Nascent mesoderm	+	+
Extraembryonic visceral endoderm	+	+
Late primitive streak		
Paraxial mesoderm	+	+
Lateral mesoderm	+	-
Extraembryonic mesoderm	-	-
Allantois	+	+
Extraembryonic visceral endoderm	+	+
Early somitogenesis		
Somite	+	+
Head mesenchyme	+	+
Blood island	+	-
Heart anlage	+	+

Tableau 5 : Profil d'expression de *pdgfra* au cours des premiers stades de l'embryogenèse chez la souris. Comparaison entre ARNm et protéine.

(D'après Takakura *et al.* 1997) [185]

De manière générale, la délétion de PDGFR α va impacter l'organogenèse à différents stades embryonnaires puisque les embryons Ph/Ph présentent : [160], [182], [183], [186], [187]

- une atteinte du développement du tube neural qui est plié et flanqué de bulles sous-épidermiques qui déforment les somites
- une atteinte cardiaque : dilatation, absence de septation, malformation des valves
- des anomalies de l'axe squelettique : ossification, fusion de vertèbres et/ou de côtes, absences de disques vertébraux...
- une absence de tissus conjonctifs
- un épiderme désorganisé
- un impact sur la vasculogenèse : dilatation des vaisseaux suite à un défaut de formation du mur vasculaire
- retard du développement pulmonaire : taille réduite, septation alvéolaire incomplète

Cependant, les embryons hétérozygotes PDGFR α ^{+/-} sont viables et donnent des souris fertiles. [187]

De même, l'activation constitutive de PDGFR α (mutation D842V dans le domaine de liaison de l'ATP ou mutation V561D dans le domaine juxta-membranaire) altère le développement embryonnaire de la souris et ne permet pas d'obtenir des embryons viables.

En effet, ces derniers présentent différentes anomalies de développement comme une malformation de la cage thoracique, un développement incomplet des sacs alvéolaires, l'apparition d'œdèmes, une atteinte rénale (uretère, hyperplasie du tissu conjonctif etc.). [188]

L'ensemble de ces expériences démontre l'importance de PDGFR α au cours de l'embryogenèse, sa délétion (homozygote) par la mutation *Patch* ou une activation constitutive étant létales.

b. Rôles de PDGFR β

PDGFR β joue également un rôle important au cours du développement embryonnaire, et son expression est détectée dès le stade E7.5. Similairement aux études menées sur PDGFR α , des expériences d'hybridation *in situ* ont été menées pour déterminer le profil d'expression de PDGFR β au cours de l'organogenèse. Ce récepteur est globalement exprimé dans le mésenchyme et de manière plus élevée dans les cellules mésenchymateuses adjacentes à un épithélium. Au stade E10.5, on l'observe dans le bourgeon des membres, le mésenchyme facial et périaortique. De manière générale, PDGFR β est exprimé dans le mésenchyme des organes tubulaires en formation (œsophage, trachée, tube intestinal, estomac). Il est également retrouvé dans les cellules mésenchymateuses présentes dans le parenchyme des gonades, des reins et des poumons. Il est aussi exprimé dans le cœur en développement (péricardium et endocardium) et participe à la formation des vaisseaux sanguins. En effet, il est exprimé dans le mésenchyme entourant l'endothélium des vaisseaux (petits et larges) ainsi que dans l'endothélium des petits vaisseaux. Cependant, aucune expression du récepteur n'est détectée dans les vaisseaux du foie en formation. [189] Après différenciation des cellules mésenchymateuses, il s'éteint dans la plupart des cellules matures. En effet, une fois l'épiderme pluristratifié en place (E16.5), PDGFR β est exprimé uniquement au niveau du derme. De même, lorsque les cellules mésenchymateuses entourant le tube intestinal se différencient en CML, ces dernières n'expriment plus le récepteur. [189] Il s'avère donc qu'au cours du développement embryonnaire, PDGFR α et β sont co-exprimés dans les cellules mésenchymateuses cranofaciales (hétérodimère) des organes en formation et présentes dans le plexus choroïde. [190]

Tout comme pour la mutation *Patch*, les embryons PDGFR β ^{-/-} ne sont pas viables et meurent juste avant la naissance d'hémorragies générales et d'œdèmes. [191] Ils présentent ainsi des atteintes vasculaires dans différents organes comme les reins (glomérule) [192], le cerveau, la peau et les yeux ainsi que des anomalies hématologiques (anémie, érythrocytes nucléés, thrombocytopenie etc.). [192], [193]

Les atteintes vasculaires sont liées à un défaut de recrutement de CML vasculaires et de péricytes affectant l'intégrité et/ou le fonctionnement vasculaire. [181], [192], [194], [195]. En revanche, les embryons PDGFR $\beta^{+/-}$ sont totalement viables. [181], [192]

Concernant l'activation constitutive de PDGFR β (D849V ou V536A), 2 études présentent des résultats contradictoires. Chiara *et al.* et Olson and Soriano s'accordent sur la viabilité des embryons et l'absence d'effet notable au cours de l'embryogenèse. Cependant, les premiers décrivent des souris saines et viables, comparables à des souris WT tandis qu'Olson and Soriano décrivent un retard de croissance dès la 2^e semaine et une mortalité importante à P14. [196], [197] Ce retard de croissance et cette mortalité sont associés à un phénotype immature des cellules vasculaires murales et à une adipogenèse inhibée. [197]

Il s'avère ainsi que les PDGFR sont nécessaires et indispensables au développement embryonnaire puisque la délétion homozygote d'une des deux isoformes est létale.

3. Les PDGFR dans les tissus adultes

a. Conditions physiologiques

En condition physiologique, la signalisation PDGF/PDGFR semble essentiellement impliquée dans la cicatrisation et l'homéostasie des tissus.

Différentes études ont montré leur participation dans la cicatrisation. En effet, les PDGF sont sécrétés au niveau de la lésion par les plaquettes lors de l'hémostase et la formation du caillot de fibrine. Ils recrutent des fibroblastes et des cellules vasculaires murales et stimulent la formation de matrice extracellulaire, afin de générer la cicatrisation du tissu. [198] *In vitro*, la délétion de *pdgfrb* ou l'inhibition de PDGFR β par l'imatinib (inhibiteur pharmacologique des PDGFR, c-abl, c-kit) altèrent la prolifération et la survie des fibroblastes, et diminuent leur capacité migratoire lors d'un wound healing/scratch assay. [199], [200]

L'implication du récepteur dans la cicatrisation a également été observée *in vivo*. En effet, suite à des lésions cutanées dorsales sur des souris, l'utilisation d'imatinib ralentit la cicatrisation, réduit la prolifération des fibroblastes et des péricytes ainsi que la différenciation en myofibroblastes. [200] A l'inverse, l'introduction, chez la souris, de CSM PDGFR β^+ , issues de placenta humain, au niveau des lésions cutanées accélère la cicatrisation et favorise la néovascularisation en comparaison de CSM PDGFR β^- . [201]

D'autres études suggèrent également un rôle protecteur de PDGFR β dans le système nerveux central (SNC). Suite à une ischémie cérébrale, la délétion de PDGFR β dans les neurones, les péricytes et CML vasculaires murins, perturbe la réponse gliale et la revascularisation (problème de stabilité et intégrité des nouveaux vaisseaux). [202] Cette étude fait écho aux travaux de Ishii *et al*, qui indiquent que les souris PDGFR $\beta^{-/-}$, spécifiquement dans les neurones, présentaient des dommages cérébraux plus importants suite à des lésions cérébrales. [203]

Similairement à l'embryogenèse, PDGFR β régule l'angiogenèse chez l'adulte. En 1994, Battegay *et al*, ont montré *in vitro* l'existence de 2 populations de CE aortiques bovines différenciées en fonction de leur potentiel angiogénique, ce dernier étant lié à la signalisation PDGF-BB/PDGFR β . En effet, les CE angiogéniques exprimaient PDGFR β tandis que les CE non angiogéniques étaient négatives pour l'expression du récepteur. En revanche, celles-ci sécrétaient du PDGF-BB, indiquant un effet paracrine entre les 2 populations de CE. [204] L'importance du récepteur dans le potentiel angiogénique a également été démontrée suite à son inhibition spécifique sur des cellules HUVECS (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) et des cellules aortiques porcines. [205] De plus, *in vivo*, l'implantation de CPE surexprimant PDGFR β chez des souris ayant subi une lésion de la carotide, accélère la réendothélialisation et limite la formation d'une néointima. [206] Différentes expériences ont également démontré le rôle crucial de PDGFR β dans la stabilité des vaisseaux nouvellement formés grâce au recrutement des péricytes et CML. [194], [207], [208]

Enfin, PDGFR β est impliqué dans le maintien de la pression des fluides interstitiels. [209], [210]

La majorité des études semble s'être focalisée sur l'étude de PDGFR β et moins sur PDGFR α . Cependant, ce dernier est impliqué dans des processus similaires à PDGFR β . Lors d'un wound healing/scratch assay, l'activation de PDGFR α permet la prolifération des fibroblastes, mais pas leur motilité. Afin que la « lésion » dans le tapis cellulaire se referme, l'activation de PDGFR β semble donc nécessaire. [199] De plus, suite à une lésion cutanée, le tumor endothelial marker 1 (TEM1) (glycoprotéine transmembranaire de type1), présent à la surface des fibroblastes, s'associe à PDGFR α . Cette association augmente l'effet mitogénique et chémoattractant du PDGF-BB sur les fibroblastes, favorisant leur différenciation en myofibroblastes et la production de collagène, impliquée dans la cicatrisation. [211] PDGFR α est ainsi nécessaire mais pas suffisant au processus de cicatrisation.

Concernant le SNC, Allamargot *et al*. ont montré chez des rats présentant des lésions démyélinisantes (injection dans le corps calleux de lysophosphatidylcholine) que l'activation de PDGFR α , par injection de PDGF-AA, induisait une prolifération des oligodendrocytes et de leurs progéniteurs, et activait la remyélinisation des axones atteints. [212] Cependant, des résultats plus mitigés ont été obtenus chez la souris par Woodruff *et al*.

Suite à l'induction d'une démyélinisation chez des souris surexprimant PDGFA spécifiquement par les astrocytes, ils ont également observé une augmentation de la densité des progéniteurs d'oligodendrocytes au niveau des lésions par rapport aux souris WT, mais pas de remyélinisation. [213] Concernant le système nerveux périphérique, il a également été observé *in vivo* une augmentation du nombre de cellules mésenchymateuses PDGFR α ⁺ lors d'une lésion du nerf sciatique. Ces cellules ont été divisées en sous-populations par analyse single cell, dont deux présentant un profil de cellules progénitrices. La prolifération de ces cellules, leur potentiel de différenciation et leur localisation au niveau de la lésion suggèrent ainsi une contribution à la régénération nerveuse. [214]

PDGFR α peut également avoir un effet pro-angiogénique. En effet, suite à son activation dans le modèle murin angiogénique de la cornée, la formation de nouveaux vaisseaux est observée. Cependant en absence d'activation de PDGFR β , ces vaisseaux ne perdurent pas et régressent, en raison probablement d'un défaut de recrutement de péricytes et/ou de CML nécessaires à leur stabilité. [208] Récemment, de nouveaux progéniteurs vasculaires résidents PDGFR α ⁺/Sca1⁺ ont été identifiés dans l'adventice de l'artère fémorale de souris. Contrairement aux progéniteurs PDGFR β ⁺/Sca1⁺, les progéniteurs adventitiels PDGFR α ⁺/Sca1⁺ migrent vers la media afin de générer de nouvelles CML suite à une lésion vasculaire sévère. [215]

Chez la souris, une étude montre également l'implication de cellules mésenchymateuses pulmonaires PDGFR α ⁺, potentiellement progénitrices, au cours de la réalvéolarisation, sans toutefois définir le rôle précis du récepteur dans ce processus. [216]

PDGFR α semble ainsi impliqué dans différents processus de recrutement de cellules potentiellement progénitrices, au cours de différents processus de « réparation ».

b. Conditions pathologiques

Une signalisation altérée des PDGF/PDGFR (suractivation) est impliquée dans de nombreuses pathologies. Ces différentes pathologies peuvent être divisées en 3 groupes : fibrotiques, vasculaires et cancers, bien que certains processus puissent être commun aux 3 groupes.

De manière générale, 2 principaux types cellulaires répondent à la signalisation des PDGF au cours de ces maladies : les CML impliquées dans les atteintes vasculaires et les fibroblastes lors de la fibrose. [179]

- Maladies fibrotiques [179], [217]

Une suractivation des PDGFR peut être associée à un phénomène de fibrose exacerbée. Dans les modèles murins d'activation constitutive inductible de PDGFR α , Soriano *et al.* observent effectivement le développement d'une fibrose systémique dans de nombreux organes [188] qui n'est cependant pas induite lors de l'activation constitutive de PDGFR β . [196] Chez l'Homme, cette signalisation joue un rôle important dans le processus de fibrose chronique de nombreuses pathologies (**Fig 21**) en induisant le recrutement de (myo)fibroblastes et le dépôt de protéines de la matrice extracellulaire, entraînant à terme une perte de fonction de l'organe impacté.

Dans les maladies pulmonaires fibrotiques, les macrophages alvéolaires sont la principale source de PDGF (principalement PDGF-B) en réponse à la libération de cytokines pro-inflammatoires. Cet environnement pro-inflammatoire entraîne également une surexpression de PDGFR α sans impacter celle de PDGFR β , bien que celui-ci soit également régulée à la hausse, suggérant l'implication d'autres mécanismes régulateurs. [179], [218] Dans le modèle murin de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine, on observe ainsi une forte expansion des fibroblastes PDGFR α ⁺ dans les zones de parenchyme atteintes. [219], [220]

Dans ce même modèle, PDGFR β , associé à la signalisation de Notch1, régule la prolifération des péricytes et leur différenciation en myofibroblastes, contribuant également au remodelage fibrosant. [218] Bien que les 2 récepteurs soient activés et impliqués, seule l'inhibition de PDGFR β permet d'inhiber la fibrose induite par la bléomycine, confirmant des rôles distincts mais obscures des 2 récepteurs dans le développement de la fibrose pulmonaire. [221] Des essais cliniques d'inhibition des PDGFR ont donc été menés sur des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique. Cependant, l'utilisation d'imatinib n'a pas montré d'amélioration de la fibrose chez ces patients [222], contrairement à celle de nintedanib. [223] Il faut cependant noter que ces 2 inhibiteurs ciblent de multiples RTKs et ne sont pas spécifiques de l'une ou des deux isoformes de PDGFR. (**Tableau 6**)

Imatinib	nintedanib	
RTK	RTK	Non RTK
PDGFR α/β	PDGFR α/β	Lck
Bcr-Abl	VEGFR 1 2 3	Lyn
c-kit	FGFR 1 2 3	Src
	FLT3	

Tableau 6 : Cibles des inhibiteurs imatinib et nintedanib

Dans le foie, les cellules étoilées (péricytes) sont normalement quiescentes et n'expriment pas PDGFR β . [207] Cependant, au cours de la fibrose hépatique et notamment lors du stade cirrhotique, TGF β induit l'expression de PDGFR β dans ces cellules [224] qui deviennent alors la principale source de fibroblastes. En parallèle, les cellules de Kupffer (macrophages résidents) s'activent, devenant la principale source de PDGF-B dont la sécrétion va induire la prolifération des péricytes PDGFR β^+ , la sécrétion de composants de la matrice extracellulaire et par conséquent la fibrogenèse. [217], [225]

Bien que les premières études se soient concentrées sur le rôle de PDGFR β , des études plus récentes ont également montré le rôle de PDGFR α dans la fibrose hépatique puisqu'au cours de la fibrose, les cellules étoilées surexpriment les 2 isoformes de PDGFR. Ainsi, après injection de carbon tetrachloride chez la souris (modèle de fibrose hépatique), l'inhibition de PDGFR α diminue la réponse fibrotique. [226] Cette réponse réduite s'explique probablement par une diminution de la réponse proliférative des cellules. En effet, *in vitro*, l'inhibition de PDGFR α réduit la prolifération et la migration des cellules étoilées humaines. [227] Plus récemment, il a été montré que des hépatocytes lésés surexprimaient également PDGFR α , contribuant à la prolifération des cellules étoilées et à la fibrogenèse. [228]

De manière similaire à la fibrose hépatique, les péricytes sont la principale source de (myo)fibroblaste au cours de la fibrose rénale. [229]–[231] De plus, une surexpression et une suractivation de PDGFR β ont été observées aussi bien dans les reins fibrotiques de souris que de patients, le récepteur étant notamment exprimé par les péricytes. [232] Il a ainsi été montré chez la souris, que l'activation de PDGFR β entraîne la prolifération des cellules rénales mésenchymateuses et conduit au développement d'une fibrose rénale. A l'inverse, son inhibition permet une réversion partielle de la fibrose. [232]

Plus récemment, une étude a montré une dualité d'expression des 2 isoformes de PDGFR par les (myo)fibroblastes impliqués dans la fibrose rénale, suggérant ainsi un rôle complémentaire de PDGFR α . [231] Cette implication est renforcée par l'étude du modèle inducible d'activation constitutive de PDGFR α dans lequel une fibrose rénale est également observée. [188]

La surexpression des PDGF/PDGFR et leur implication dans le développement de la sclérodémie ont également été démontrées. [233]–[235] La prolifération des fibroblastes est essentiellement due à une boucle autocrine PDGF-AA/PDGFR α stimulée par TGF- β 1, la thrombine et IL-1 α . [217], [236], [237] De plus, le sérum de patients atteints de sclérodémie présente des anticorps stimulants les PDGFR, participant ainsi à la prolifération des fibroblastes. [175]

Suite à un infarctus, de l'hypertension ou des désordres endocriniens, une prolifération des fibroblastes cardiaques interstitiels et un dépôt excessif de collagène peuvent causer une fibrose cardiaque. L'activation de ces fibroblastes serait induite par PDGFR α .

En effet, *in vitro*, PDGF-AA est un puissant mitogène pour les fibroblastes cardiaques, [238] et une surexpression de PDGF-A ou de PDGF-C (ligands spécifiques de PDGFR α) spécifiquement dans le cœur entraîne une fibrose cardiaque excessive. [239], [240] A l'inverse, l'inhibition de PDGFR α diminue le dépôt de collagène chez la souris suite à un infarctus. [241] L'activation des fibroblastes est notamment due à l'activation de c-kit par PDGFR α . [242] Paradoxalement, aucune fibrose cardiaque n'a été observée chez les souris exprimant PDGFR α constitutivement actif. [188] Bien que PDGFR β soit plus particulièrement impliqué dans l'angiogenèse, il contribue également au dépôt excessif de collagène. [241]

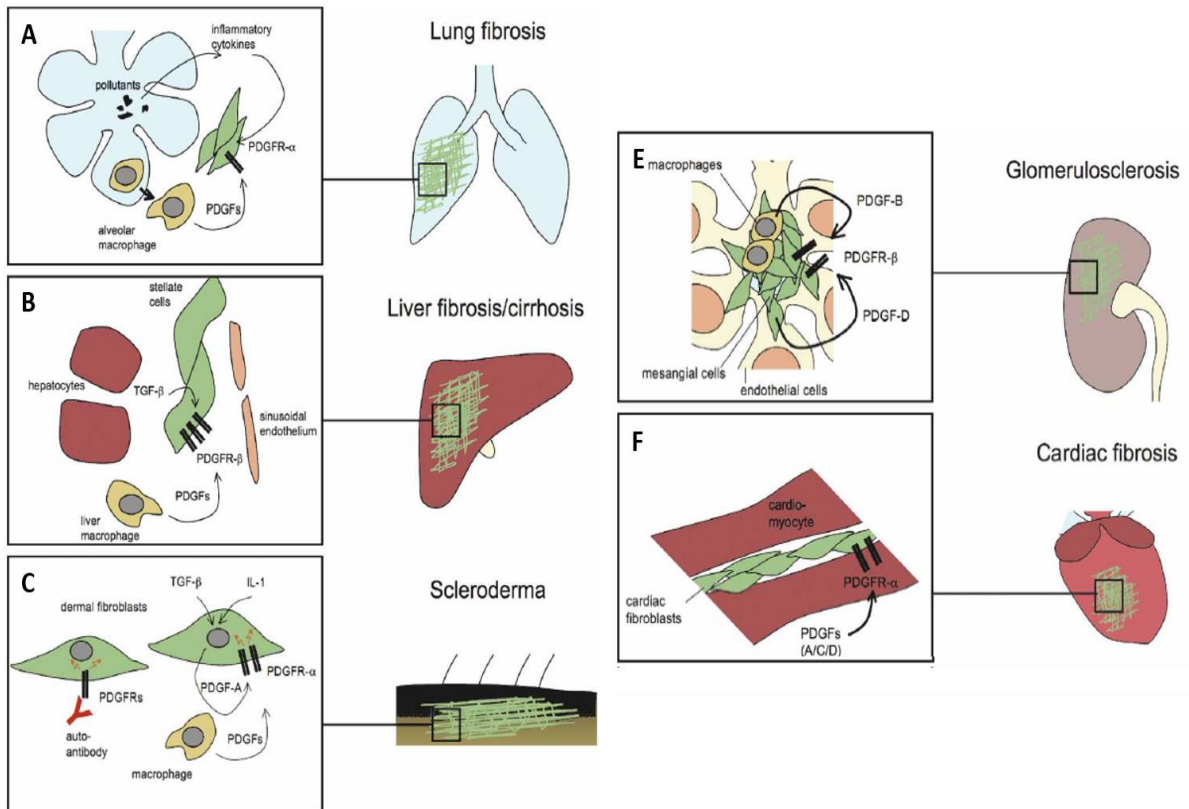


Figure 21 : Rôle des PDGF/PDGFR dans les maladies fibrotiques.

A : Lors de la fibrose pulmonaire, la sécrétion de PDGF par les macrophages stimule la prolifération des (my)fibroblastes qui expriment PDGFR α et dont l'expression est régulée par les cytokines inflammatoires. **B :** Suite à une atteinte hépatique et en réponse au TGF β , les cellules étoilées hépatiques sur-expriment PDGFR β qui est alors activé par les PDGF sécrétés par les macrophages, promouvant la prolifération cellulaire et la fibrose hépatique. **C :** Au cours de la sclérodemie, l'IL-1 et le TGF β induisent une surexpression de PDGFR α et du PDGF-A par les fibroblastes. Ces surexpressions associées à une sécrétion de PDGF par les macrophages stimulent alors la prolifération des fibroblastes. **D :** Dans de nombreuses maladies rénales, la sécrétion de PDGF-B par les macrophages et de PDGF-D par les cellules mésangiales peut induire la prolifération de ces cellules et le dépôt de matrice, conduisant à une sclérose glomérulaire. **E :** Dans les modèles expérimentaux, l'expression de PDGF par les cellules myocardiques promeut la prolifération des fibroblastes cardiaques PDGFR α^+ ainsi que le dépôt de collagènes, menant à une fibrose cardiaque. (D'après Andrae *et al.* 2008) [179]

- Maladies vasculaires

Au niveau des lésions sclérotiques, on observe une prolifération importante des CML [243], [244], un niveau élevé des PDGF (surtout A et B) dans la paroi vasculaire, ainsi qu'une expression augmentée des PDGFR par les CML des vaisseaux lésés. [245], [246]

Différentes conditions associées à des pathologies cardiovasculaires peuvent expliquer l'augmentation de production des PDGF : augmentation de la pression sanguine, stimulation α -adrénergique, hypercholestérolémie. [247], [248]

Il est proposé que la sécrétion de PDGF par les plaquettes sur le site de lésion joue un rôle primordial dans le recrutement des CML : migration de la media vers l'intima et prolifération. [244], [247], [249] L'inflammation chronique locale observée dans le micro-environnement de la lésion athérosclérotique contribue également au niveau élevé de PDGF puisque ces derniers font partie des nombreux facteurs sécrétés par les cellules immunes actives. [247] Le rôle de la signalisation PDGF/PDGFR dans le recrutement des CML est décrit dans différents modèles de lésions vasculaires aiguës. En effet, dans ces modèles, l'accumulation de CML dans la néointima est fortement réduite suite à l'inoculation d'inhibiteur de cette signalisation (anti PDGF ou anti PDGFR). Des résultats similaires sont obtenus en utilisant des souris transgéniques ayant une délétion de PDGFR β . A l'inverse, *in vivo*, l'infusion de PDGF-BB ou la transfection locale de vecteur d'expression de PDGF-B augmente la prolifération des CML et induit une hypertrophie de l'intima. Il est à noter que PDGF-BB peut activer les 2 isoformes de PDGFR, et que ces études ne permettent pas de déterminer l'implication respective de l'une ou l'autre isoforme du récepteur. [179] L'implication de PDGFR β dans la migration des CML a également été confirmée grâce à l'utilisation de souris chimérique pour le récepteur. En effet, après ligature de la carotide gauche, on observe une prolifération importante des CML PDGFR $\beta^{-/-}$ dans la media, mais une très faible proportion de ces cellules au niveau de la néointima. [250] Ces études montrent une forte implication de PDGFR β , dont la signalisation est également modulée par la Scavenger Receptor Class A member 5 (Scara5) ou la Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1 (LRP1), respectivement en la favorisant ou en l'inhibant, régulant ainsi le recrutement des CML et le développement de l'athérosclérose. [251], [252]

Des études sur les maladies vasculaires rétiniennes montrent également l'implication de la signalisation PDGF/PDGFR dans ces pathologies. Chez la souris, l'inhibition de PDGF-B protège du détachement de la rétine lors d'une rétinopathie proliférative. [253] De plus l'inhibition de PDGFR β dans des modèles murins de néovascularisation oculaire améliore l'effet thérapeutique d'anti VEGF/VEGFR. [254]–[256] Cependant, des résultats contraires ont pu être observés.

En effet, l'utilisation d'imatinib dans le modèle de rétinopathie du prématuré chez le rat provoque une perte des péricytes (stabilité des vaisseaux) et une élévation du niveau de VEGF et VEGFR conduisant à une angiogenèse exacerbée. [257] La déstabilisation des vaisseaux rétiens suite à l'inhibition de PDGFR β peut être réduite par un traitement à l'acide ursodéoxycholique qui diminue les niveaux de facteurs angiogéniques et pro-inflammatoires : VEGF, InterCellular Adhesion Molecule 1 (ICAM-1) et MCP-1. [258] Il semblerait donc que selon le contexte pathologique, PDGFR β ait des rôles différents. De plus, il s'avère que le VEGF promeut également le développement de la vitréorétinopathie par l'activation de PDGFR α . [259]

- Cancers

L'altération de la signalisation des PDGF/PDGFR due à une mutation des gènes *PDGFRA* ou *PDGFRB* est également impliquée dans différents cancers. Une surexpression de *PDGFRA* est ainsi retrouvée dans certains cas de glioblastomes, les tumeurs les plus malines étant celles présentant la plus forte expression du récepteur. [260], [261]

Dans la majorité de ces tumeurs PDGFR α^+ , la suractivation de PDGFR α n'est cependant pas associée à une mutation du gène mais à une surexpression des PDGF. [261]–[263] En effet, seuls 15% des cas sont dus à une amplification du gène [264] et dans une moindre proportion à l'expression d'un récepteur constitutivement actif. [265] En revanche, différentes mutations conduisant à la production d'une protéine PDGFR α constitutivement active ont été observées dans certaines tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST). Ces mutations ont été localisées soit dans le domaine juxtamembranaire soit dans l'un des 2 domaines tyrosine kinase, entraînant une activation constitutive du récepteur. [176], [177] De plus, dans certains cas de syndrome d'hyperéosinophilie ou de mastocytose systémique, la translocation et la fusion de *PDGFRA* avec *FIP1L1* (Factor Interacting with PAPOLA and CPSF1) conduisent également à la production d'un récepteur constitutivement actif. [266], [267] Cette activation constitutive est due à la perte d'un domaine d'auto inhibition du récepteur dans le domaine juxtamembranaire. [268] En 1994, la translocation et la fusion de *PDGFRB* avec *ETV6* (ETS Variant Transcription factor 6) ont été identifiées chez des patients atteints de désordres myéloïdes. Cette translocation conduit également à la production d'un récepteur constitutivement actif, sans domaine de liaison au ligand mais contenant le domaine catalytique intracellulaire de PDGFR β . [269] Depuis, ce sont près de 30 partenaires de fusion avec *PDGFRB* qui ont été identifiés. [270] Ces mutations conduisent à une boucle de stimulation autocrine qui contribue à la tumorigenèse en promouvant l'expansion clonale des cellules génétiquement altérées.

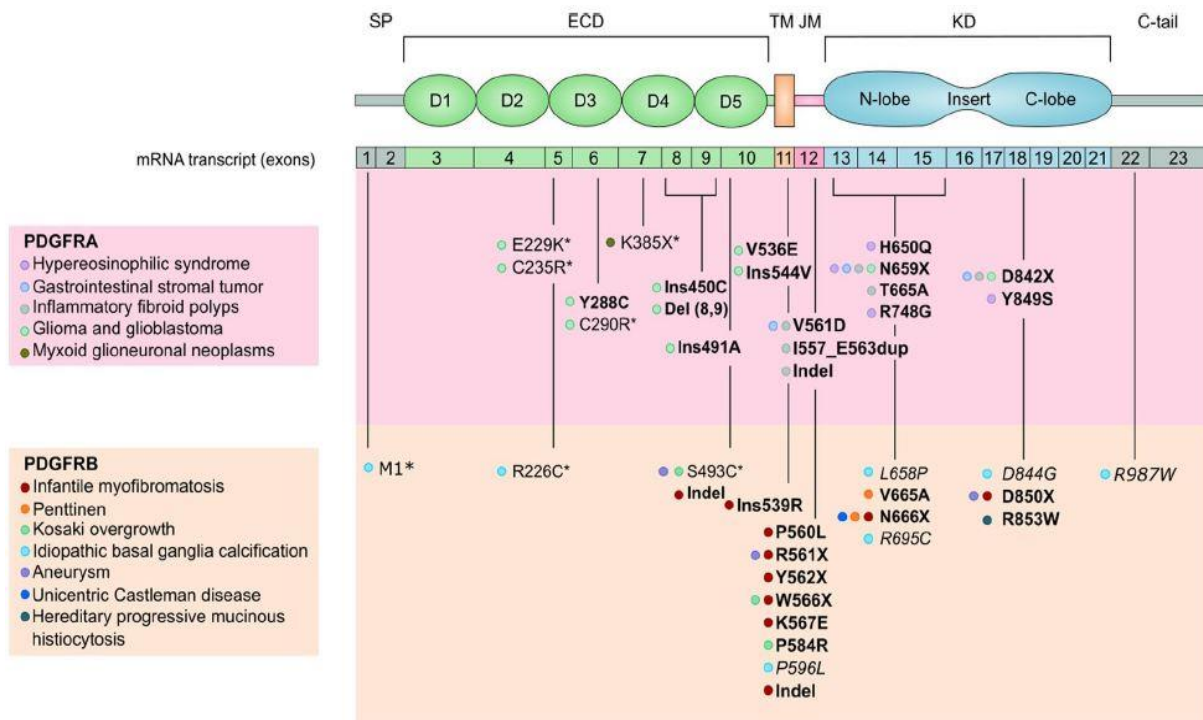
Des mutations gain de fonction de PDGFR β ont également été décrites dans des cas de myofibromatose infantile sporadique et sont plus fréquentes dans la forme multicentrique que solitaire. [271], [272]

En parallèle de la stimulation autocrine, les PDGF continuent leur action paracrine en induisant le recrutement de cellules stromales. [273]–[277] Le stroma tumoral est conventionnellement divisé en 2 parties : une partie vasculaire constituée de CE et péricytes pour assurer les apports en nutriments et en oxygène à la tumeur, et une partie fibreuse constituée de cellules mésenchymateuses. Cette signalisation promeut ainsi directement ou indirectement la perfusion sanguine de la tumeur, sa croissance, sa dissémination métastatique et une résistance thérapeutique.

- Calcification cérébrale familiale primaire

Il s'agit d'une maladie rare caractérisée par des calcifications intracérébrales bilatérales et symétriques, localisées dans les noyaux gris centraux, le plus souvent associées à des troubles du métabolisme phosphocalcique. Des mutations dans 5 gènes sont associées à cette maladie : *SLC20A2* (codant pour un transporteur de phosphate sodium dépendant), *XPR1* (récepteur couplé à une protéine G), *MYORG* (glycosidase), *PDGFB*, et *PDGFRb*. Les mutations de *PDGFB* n'ont pas totalement été caractérisées expérimentalement. Cependant, il a été observé chez la souris possédant un allèle hypomorphe de *PDGFB*, une altération de la barrière hémato-encéphalique ainsi qu'une calcification du cerveau, semblables à la maladie humaine. Concernant *PDGFRb*, une dizaine de mutations a été identifiée et certaines caractérisées. Ainsi, il s'avère que la mutation L658P dans le domaine kinase abolit toute signalisation par le récepteur, et la mutation R987W en C-terminal empêche la signalisation PLC γ /STAT3 et augmente la dégradation du récepteur post-activation. [278]

Pour conclure, des mutations des PDGFR ont été identifiées dans diverses pathologies humaines et sont présentées dans la Figure 22.



4. PDGFR et hypertension artérielle pulmonaire

Les PDGF/PDGFR sont de puissants mitogènes et chémoattractants surexprimés dans les biopsies pulmonaires de patients HTAP. [50], [279]–[281] Ils ont ainsi rapidement été considérés comme des acteurs clés au cours du développement de la pathologie, et dont l'étude semblait nécessaire pour une meilleure compréhension des mécanismes pathologiques.

Leur implication a pu être démontrée grâce à différents modèles expérimentaux. Similairement à l'Homme, une surexpression et une suractivation de PDGFR β ont été observées dans 2 modèles d'HP : le rat MCT et la souris en HC. [280] Or, l'utilisation d'imatinib améliore la survie des rats MCT et réduit le remodelage pulmonaire vasculaire ainsi que l'hypertrophie du ventricule droit dans ces 2 modèles. [280] De plus, le remodelage vasculaire et l'hypertrophie du ventricule droit chez la souris en HC sont également fortement réduits lorsqu'on inhibe de manière spécifique, uniquement la transduction du signal de PDGFR β . [282] A l'inverse, une souris exprimant PDGFR β constitutivement actif ne développe pas spontanément d'HP, indiquant que sa signalisation n'est pas suffisante pour déclencher la pathologie.

Cependant, cette souris transgénique est plus sensible à l'HC et présente une musculation des vaisseaux pulmonaires plus importante que celle d'une souris WT dans des conditions équivalentes, seule différence notable entre souris WT et mutée sous HC. [283] Afin de confirmer le lien entre signalisation PDGFR β , remodelage vasculaire (musculation des artérioles) et CML, il a été démontré *in vitro* que l'inhibition de PDGFR β inhibe la prolifération et la migration des CML vasculaires pulmonaires humaines et de rongeurs. [50], [280], [282]

Les CML des patients HTAP sous-expriment la sous-unité GluN2B du récepteur NMDAR (acide N-méthyl-D-aspartique receptor). Or, physiologiquement, il s'avère que la phosphorylation par SFK, elle-même recrutée par PDGFR β , de cette sous-unité et la relocalisation du NMDAR enclenchent un rétrocontrôle négatif de la signalisation de PDGFR β , inhibant la prolifération et la migration des CML. Ainsi la faible expression de GluN2B dans les CML de patients ne peut plus assumer ce rôle de rétrocontrôle négatif et contribue à la prolifération cellulaire. [284]

De plus, les CML vasculaires pulmonaires de patients HTAPi expriment fortement le senseur/récepteur au calcium : CaSR. Celui-ci est impliqué dans la prolifération et la migration cellulaire et son inhibition ou sa délétion *in vivo* protège du développement de l'HP expérimentale. [285], [286] Or, *in vitro*, la déplétion par siARN ou l'inhibition par l'imatinib de PDGFR β réduit la surexpression de CaSR dans les CML vasculaires pulmonaires HTAPi.

Il semblerait donc que la prolifération des CML induite par la suractivation de PDGFR β soit en partie liée à une surexpression de CaSR induite par PDGFR β , et à une augmentation de la signalisation calcique qui induit, entre autres, leur prolifération. [287] Les expériences d'inhibition de PDGFR β sont généralement réalisées avec de l'imatinib. Or cet inhibiteur pharmacologique n'est pas spécifique de ce récepteur et peut également cibler PDGFR α (ou c-kit et c-abl).

Yamamura *et al.* ont ainsi rapporté pour la première fois la surexpression de PDGFR α par les CML vasculaires pulmonaires HTAPi, et l'utilisation, *in vitro*, d'un siARN dirigé contre PDGFR α réduit également la surexpression de CaSR, la signalisation calcique et la prolifération cellulaire. Il semblerait donc que la prolifération des CML vasculaires pulmonaires passe aussi bien par une activation de PDGFR β que PDGFR α . [287]

Concernant l'origine de la stimulation de PDGFR β , une étude très récente a montré le rôle prépondérant du PDGF-B sécrété par les macrophages au cours de l'HP expérimentale. *In vivo*, la déplétion des macrophages par du clodronate atténue le remodelage vasculaire (musculation distale), l'hypertrophie ventriculaire droite et l'HP induits par HC, tout comme la délétion ou l'inhibition de *Pdgf-b* spécifiquement dans les macrophages. L'implication du PDGF-B sécrété par les macrophages dans la prolifération des CML est très probablement présente chez l'Homme.

En effet, PDGF-B est également surexprimé dans les macrophages de patients HTAPi, et le milieu de culture conditionné de ces cellules, riche en PDGF-B, accroît *in vitro* la prolifération et la migration des CML. L'ajout, dans le milieu conditionné, d'un anticorps bloquant spécifiquement PDGF-B confirme sa responsabilité dans ces 2 processus. Ainsi, au cours de l'HP expérimentale induite par HC, la sécrétion de PDGF-B par les macrophages infiltrés joue un rôle primordial dans la stimulation des CML et leur prolifération induite par PDGFR β , rôle probablement important également chez les patients HTAP. [288]

De manière plus inattendue, Ciucan *et al.* ont observé *in vivo* que l'imatinib diminuait également le taux élevé de 5-HT induit par HC/SU546, en diminuant l'expression de la tryptophane hydroxylase 1 (TPH1). *In vitro*, sur une lignée de cellules endothéliales humaines d'artères pulmonaires, la surexpression de TPH1 induite par HC est inhibée par l'imatinib ou par un siARN spécifique de PDGFR β , mais n'est pas impactée par un siARN anti PDGFR α . Cependant, l'imatinib n'affecte pas l'activité enzymatique de TPH1. De plus, *in vivo*, la délétion de TPH1 s'accompagne notamment d'une abolition de l'élévation du taux de 5-HT et une diminution de la fibrose périvasculaire, induits par HC/SU546, sans effet supérieur d'un traitement à l'imatinib. Une diminution de 5-HT est également observée chez les patients HTAP traités à l'imatinib. Cette étude montre ainsi que PDGFR β est impliqué dans la surproduction de 5-HT par les CE induite par HC/SU546, en induisant une surexpression de TPH1, participant ainsi à la fibrose périvasculaire pulmonaire. [289] De plus, bien que cela n'ait pas été observé dans cette étude, l'inhibition de la prolifération des CML par l'imatinib, pourrait, dans une certaine mesure, être également due à la diminution du taux de 5-HT.

En effet, la sérotonine régule positivement la prolifération des CML tant dans l'HP expérimentale que chez les patients HTAP [46], [80] en se fixant à son transporteur membranaire qui transactive PDGFR β par interaction physique à la surface des CML. [290], [291]

Au cours du remodelage vasculaire, une plus forte expression de *PDGFRB* est également observée dans l'adventice des vaisseaux pulmonaires des patients HTAP [292], [293] ainsi qu'une prolifération des fibroblastes adventitiels [76]. Cette surexpression et suractivation de PDGFR β est ainsi retrouvée dans les fibroblastes adventitiels de veau maintenu 2 semaines en chambre hypobarique. *In vitro*, après isolement, ces fibroblastes prolifèrent plus fortement suite à une stimulation au PDGF-BB que des fibroblastes adventitiels isolés de veau maintenu en normoxie. De plus, la signalisation de PDGFR β et leur prolifération sont modulées par la production de ROS, elle-même stimulée par l'activation de PDGFR β . [294]

D'autres études ont également montré l'implication des ROS dans le remodelage vasculaire en stimulant la prolifération des CML [295], [296], lors d'une HC et hypoxie intermittente chronique, ainsi que dans la dérégulation du tonus vasculaire en empêchant la relaxation NO-dépendante des artérioles pulmonaires. [297] De plus, l'abolition de l'élévation de ROS induite par hypoxie atténue l'activation de PDGFR β [296] et inhibe la transduction du signal suite à la transactivation de PDGFR β par SERT dans les CML [290]. Il semblerait donc que les ROS soient impliquées dans différents mécanismes au cours du développement de la pathologie, dont la modulation de l'activité de PDGFR β .

Finalement l'essentiel des travaux sur le rôle des PDGFR dans le développement de la pathologie est basée sur le rôle de PDGFR β . Il s'avère ainsi que PDGFR β joue un rôle important mais plus complexe que simple activateur direct de la prolifération cellulaire, pour lequel je vous propose un schéma récapitulatif. (Fig 23)

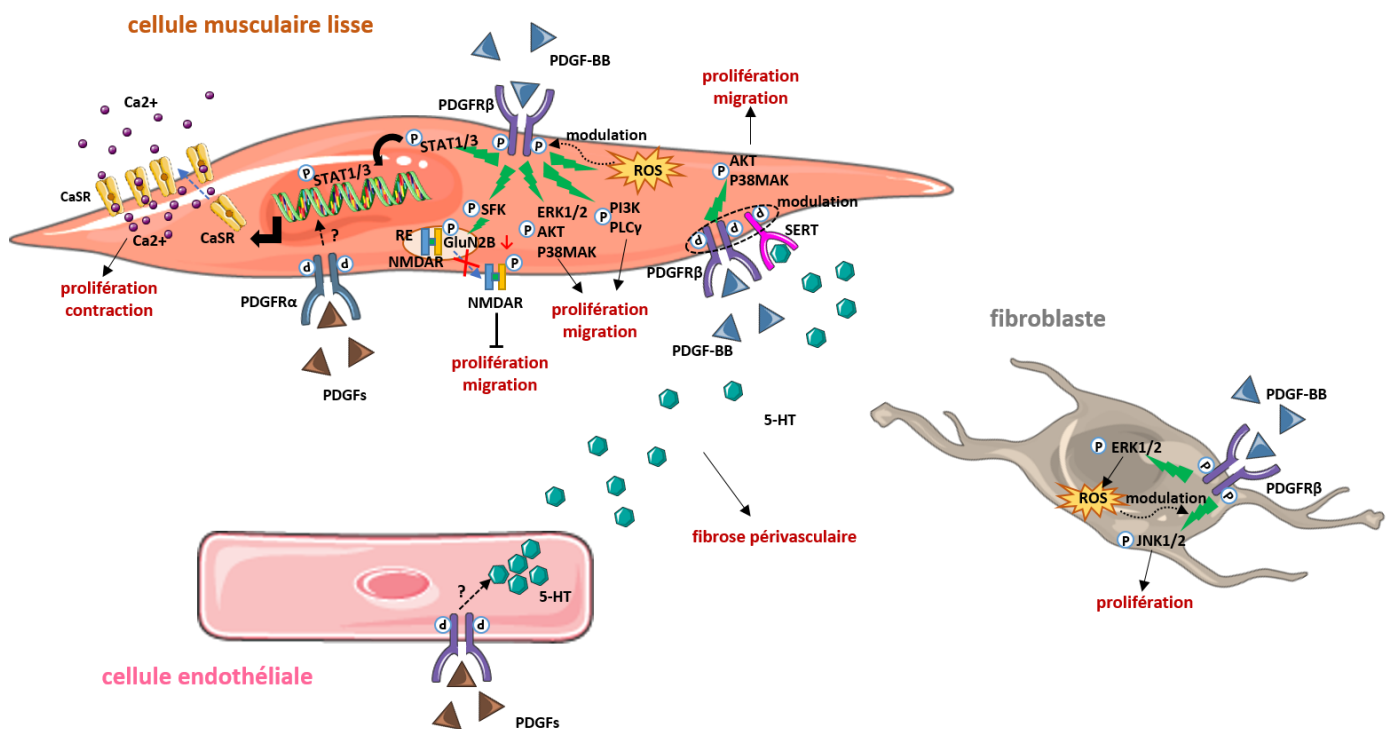


Figure 23 : Schéma récapitulatif des rôles de PDGFR α et PDGFR β dans l'HTAP.

Au vu de la contribution des PDGFR dans la pathologie et des résultats expérimentaux obtenus avec l'imatinib, différents essais cliniques ont été réalisés avec ce dernier. Au cours de l'étude IMPRES (essai clinique phase III de 24 semaines), l'utilisation d'imatinib, en addition d'autres thérapies, a montré une amélioration au test de 6 minutes de marche et une amélioration des constantes hémodynamiques des patients avec une forme avancée d'HTAP. Cependant, le groupe de patients traités a présenté une plus grande discontinuité dans la prise du traitement à cause d'effets secondaires et également une fréquence plus importante de ces effets (nausée, diarrhée, œdème périphérique...) que le groupe placebo.

De plus, bien que rares, des effets secondaires graves sont survenus chez les patients traités : insuffisance cardiaque (potentiellement liée à l'inhibition de c-abl par l'imatinib), hématome sous-dural, dyspnée, syncope. Malgré les effets secondaires graves mais rares, l'imatinib présente un fort potentiel thérapeutique pour les formes avancées d'HTAP. [298]–[300] Cependant, suite à l'extension de cet essai à 204 semaines, il s'avère que l'imatinib procure une amélioration notable chez peu de patients traités, et cause, dans de rares cas, des effets secondaires graves contrebalançant les effets positifs observés. Ainsi malgré des résultats encourageants *in vivo*, l'imatinib ne présente pas un apport bénéfique et une sécurité suffisante pour être utilisé comme traitement de l'HTAP. [301], [302]

Plus récemment, des résultats, présentés uniquement en congrès, ont également montré *in vivo* les effets bénéfiques d'une autre molécule inhibitrice de PDGFR α/β (ainsi que CSF1R, c-kit) : le seralutinib (GB002). En effet, cette molécule améliore les mesures hémodynamiques dans le modèle d'HP HC/SU5416, diminue la muscularisation des artérioles pulmonaires et régule positivement l'expression de BMPR2. [303] Au vu de son potentiel thérapeutique, un essai clinique de phase 2 portant sur 80 patients est actuellement en cours. Afin de diminuer les effets hors cibles (hors poumons) et donc les effets secondaires délétères, comme ceux observés avec l'imatinib, ce traitement est administré par inhalation. [304]

Au vu des données bibliographiques actuelles, il semble donc important d'approfondir nos connaissances sur les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués au cours de l'HTAP. Mes travaux de thèse répondent à ce constat, avec pour but général l'étude des progéniteurs pulmonaires vasculaires PW1⁺. L'essentiel de mes travaux s'est ainsi focalisé sur la régulation *in vivo* et *in vitro* de ces progéniteurs au cours de l'HP. Suite à la précédente étude de l'équipe [12] et au vu de l'ensemble de la littérature, ces travaux avaient pour ligne directrice l'hypothèse suivante : PDGFR α régule la prolifération des progéniteurs PW1⁺ et induit leur différenciation en CML, participant ainsi à la musculation des artérioles pulmonaires au cours de l'HTAP. Afin de valider cette hypothèse, différents objectifs détaillés ultérieurement ont été établis afin d'étudier les effets *in vivo* et *in vitro* d'une inhibition ou à l'inverse d'une activation de PDGFR α sur ces progéniteurs. Dans un second temps, une étude transcriptomique de l'ensemble des cellules pulmonaires PW1⁺ et des cellules issues de leur différenciation par analyse single-cell RNAseq a été initiée. Le but de cette seconde étude est d'identifier l'ensemble des sous-populations de progéniteurs PW1⁺ et leur devenir *in vivo*, et de déterminer si l'hypoxie impacte leur profil transcriptionnel ainsi que la dynamique du processus de différenciation cellulaire.

MATERIELS ET METHODES

I. Souris transgéniques et modèles expérimentaux de l'hypertension pulmonaire

1. Modèles de souris transgéniques

Afin d'explorer notre hypothèse, nous utilisons 2 modèles de souris transgéniques, mâles et femelles âgés de 6 à 10 semaines.

La souris transgénique $PW1^{IRESnLacZ}$ porte un transgène (transgénèse additive) formé d'une cassette IRESnLacZ (Internal Ribosome Entry Site nuclear β -galactosidase) insérée dans l'exon 9 du gène entier $Pw1$, en amont de sa séquence codante. Ce transgène, régulé comme le gène $Pw1$ endogène, génère un ARNm codant pour la β -galactosidase (β -gal) qui permet de suivre et d'isoler par cytométrie de flux les progéniteurs $PW1^+$. Grâce à la longue demi-vie de la β -gal, nous pouvons également suivre leur lignage durant quelques jours post-différenciation alors même que $PW1$ n'est plus exprimé.

Le second modèle est la souris $PW1^{IRESnLacZ}/Rosa\ cre-ERT2/PDGFR\alpha^{+(S)/k}$. Dans ce modèle, un allèle du gène natif $Pdgfra$ a été remplacé par un ADNc codant pour une forme mutée du récepteur (D842V dans le domaine kinase) qui est constitutivement active. L'expression du gène muté est placée sous le contrôle du promoteur endogène de $PDGFR\alpha$. L'injection intra péritonéale (i.p) de tamoxifène (2mg/jour/souris durant 5 jours consécutifs ; Sigma Aldrich, France) va permettre à la Cre recombinase d'exciser le codon STOP de l'ADNc et permettre l'expression du récepteur constitutivement actif dans toutes les cellules exprimant habituellement le récepteur. Cette souris permet également le suivi du lignage des progéniteurs $PW1^+$ grâce à la β -gal.

2. Modèle d'hypertension induit par hypoxie chronique

Afin de développer une HP, les souris $PW1^{IRESnLacZ}$ sont soumises à une HC normobarique (10% O_2). En effet, l'HC entraîne une augmentation de la PVD (entre 20 et 30 mmHg), reflet de la pression pulmonaire, une hypertrophie du VD, ainsi qu'un remodelage des vaisseaux pulmonaires. Les souris sont placées 4 jours (où la néomuscularisation est déjà mise en place) ou 21 jours (modèle classique d'HP) dans une enceinte à hypoxie, disponible au centre d'exploration fonctionnel de la Pitié-Salpêtrière. L'hypoxie est obtenue par injection d'azote dans l'enceinte afin d'abaisser le niveau d' O_2 . Les niveaux d' O_2 et de CO_2 sont maintenus respectivement par injection et absorption par granules de chaux sodée. L'excès d'humidité est prévenu par l'utilisation de dessiccant.

Après 21 jours, l'hypoxie est confirmée par mesure de la concentration de l'hémoglobine dans le sang périphérique grâce à un HemoCue (Hb 20+).

3. Modèle d'hypertension induit par activation de PDGFR α

Ces modèles d'HP ne sont pas conventionnels et sont issus de nos expérimentations et observations. Afin d'activer PDGFR α , nous avons utilisé 2 stratégies. La première consiste à induire l'activation constitutive du récepteur chez la souris *PW1^{IRESnLacZ}/Rosa cre-ERT2/PDGFR α ^{+(S)/k}* et d'observer les effets 5 semaines post induction. La seconde consiste à injecter en i.p le ligand spécifique du récepteur : le PDGF-AA (PeproTech, France), 6 jours/semaines à 150ng/souris pendant 5 semaines. Ces modèles d'HP, au temps observé, ne sont valables que chez les mâles.

II. Mesure hémodynamique

Afin de confirmer le développement de l'HP, la mesure de la PVD, reflet de la PAP, a été réalisée sous anesthésie (ketamine/Xylazine respectivement à 100 et 10 mg/kg i.p.) et sous assistance respiratoire : fréquence respiratoire de 170/min et volume respiratoire de 200 μ l (Minivent Mouse ventilator type 845, Harvard Apparatus). Après incision de l'abdomen et du diaphragme, une sonde Millar avec capteur de pression (Millar Micro-tip catheter transducer, model SPR-671; Millar Instruments, Inc, Houston, TX, USA) a été introduite dans le VD afin de mesurer sa pression systolique. L'hypertrophie du VD a été déterminée par l'indice de Fulton : rapport poids VD sur poids VG+septum.

III. Traitements des souris

PDGFR α a été inhibé de 2 manières. En effet, les souris *PW1^{IRESnLacZ}* sous HC ont reçu :

- Soit une injection i.p quotidienne d'imatinib (50 mg/kg/jour, dissous dans du DMSO puis dilué dans du PBS 1X ; Sigma Aldrich, France) ou de solution véhicule : DMSO 2% dans du PBS 1X.
- Soit une injection i.p initiale d'APA5 (500 μ g) ou d'isotype contrôle 3 jours avant la mise en hypoxie, suivi d'injection tous les 3 jours de 100 μ g jusqu'à la fin de l'expérience.

Concernant l'activation de PDGFR α par injection de PDGF-AA, les souris contrôles ont reçu de l'albumine sérique de souris 0.03%/PBS (Sigma Aldrich), en parallèle des injections du ligand chez les souris traitées.

Concernant les mesures de prolifération cellulaire, les souris ont également été injectées en i.p avec de l'éthynyl-déoxyuridine (EdU, 1mg/souris dans du PBS) 24h avant le sacrifice.

IV. Cytométrie de flux

Préalablement à leur prélèvement, les poumons ont été lavés par injection à faible pression de 1-2ml de PBS 1X via un cathéter introduit dans le VD. Ils ont ensuite été découpés finement à l'aide de scalpel puis de ciseaux de microdissection avant d'être digérés dans un falcon de 50ml contenant 5ml d'HBSS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, France) complété par 3 % de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF dec ; Thermo Fisher Scientific), 0,5 mg/mL de collagénases IA-S, II-S, IV-S (Sigma Aldrich), 2,2 mg/ml d'élastase (Worthington) et 2,2 mg/ml de DNase (Worthington) pendant 35 min dans un bain marie à 37°C et sous agitation. Les collagénases ont été préparées extemporanément et dissoutes dans de l'HBSS 3% SVF dec. Après digestion enzymatique, le lysat tissulaire/cellulaire a été passé sur un filtre de 100 μ m et les gros fragments de tissu restants sur le filtre ont été transférés dans une boîte de pétri contenant 2ml d'HBSS 1% SVF dec puis désagrégés mécaniquement entre deux lames superfrost+ (Thermo Fisher Scientific), afin de séparer les cellules progénitrices de la matrice extracellulaire. Après centrifugation (10min à 4°C et 1440 rpm), le surnageant a été éliminé et le culot a été resuspendu par tapotement léger. Les globules rouges encore présents ont été lysés avec 2 ml de Red Blood Cell Lysis 1X (Invitrogen) pendant 40s et sous agitation. La réaction de lyse est stoppée par 10ml d'HBSS 1% SVF dec. Après centrifugation (10min à 4°C et 1440 rpm), le surnageant a été éliminé puis le culot resuspendu dans 150 μ l d'HBSS 1% SVF dec avant d'être filtré et transféré dans un tube eppendorf de 2ml. Les cellules ont ensuite été incubées pendant 20 min avec les anticorps d'intérêt à 4°C dans l'obscurité : 200 μ l de solution pour 5 000 000 de cellules comptées au bleu trypan et à la cellule de Malassez. Les anticorps utilisés étaient CD45 PEcy7 (1/100^e ; Invitrogen), CD34 Brilliant Violet421 (1/25^e ; Biolegend), c-kit PE 3 (1/100^e ; Biolegend) dilués dans de l'HBSS 1% SVF dec. L'incubation a été stoppée par ajout de 1ml de SVF 1% SVF dec. Le DDAO-G (Life Technologies) a été utilisé pour détecter l'activité β -gal. Après centrifugation (10 min à 4°C et 1440 rpm), le surnageant a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans 1,5 ml de DDAO-G (3,3 μ g/ml) puis séparés dans 2 tubes eppendorf afin d'optimiser la réaction enzymatique.

Cette dernière s'est effectuée durant 35min dans un bain marie à 37°C, sous agitation et a été stoppée par ajout de 1ml d'HBSS 1% SVF dec. Après centrifugation (10min à 4°C et 1440 rpm) et élimination du surnageant, les cellules séparées à l'étape précédente ont été resuspendues dans un même tube eppendorf avec 1ml d'HBSS 1% SVF dec. Les cellules mortes ont été marquées en utilisant le Zombie Green Fixable Viability (Biolegend, San Diego) (3µl dans 1ml de suspension cellulaire) pendant 30min sur roue et à température ambiante. La réaction a été stoppée avec 1ml d'HBSS 1% SVF dec. Après centrifugation et élimination du surnageant, chaque culot cellulaire a été resuspendu avec 200µl de DMEM (4,5g/L de glucose ; Thermo Fisher Scientific) complété avec 20% de SVF et 2% de pénicilline/streptomycine (PS) (Thermo Fisher Scientific). L'ensemble des cellules a été placé dans un même tube pour le tri cellulaire.

Les cellules ont ensuite été triées à l'aide du FACS Aria (Becton Dickinson) avec des contrôles de correspondance isotypique appropriés et les contrôles Fluorescence Minus One (FMO) ont été utilisés pour identifier et séparer les différentes populations cellulaires. La stratégie de marquage FACS est décrite dans la figure 24. L'équipe a précédemment montré que les cellules CD45⁻/CD34⁺/β-gal⁺/c-kit⁻ pulmonaires de souris sont des cellules progénitrices vasculaires exprimant PDGFRα⁺ et PW1⁺. [12]

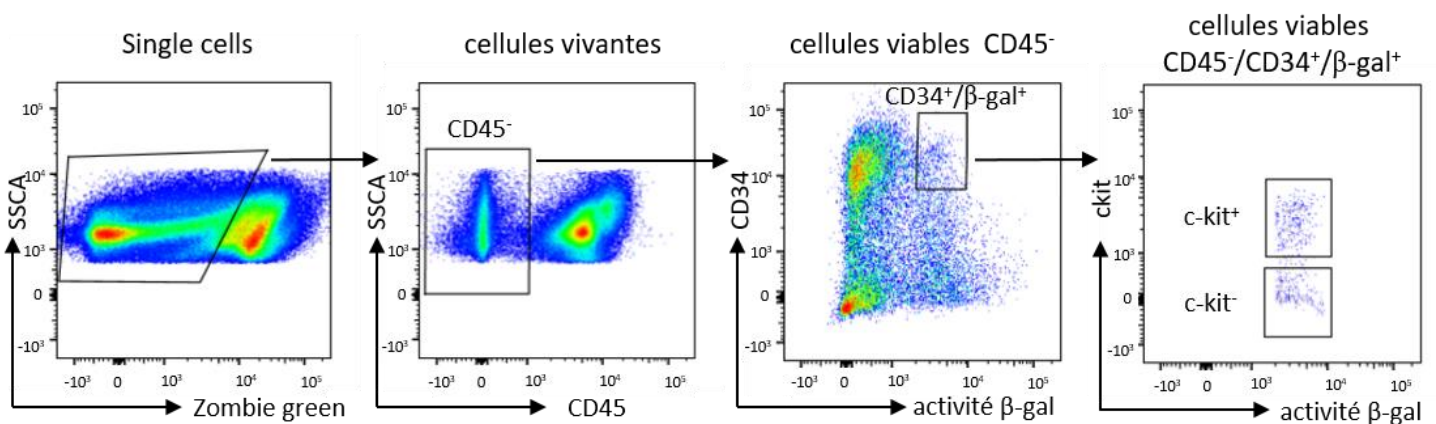


Figure 24 : Profil représentatif du FACS des cellules pulmonaires totales de souris indiquant la stratégie de sélection pour trier les populations PDGFRα⁺/PW1⁺.

Le tri s'effectue en fonction du Zombie green (marqueur de viabilité), du DDAO-G (activité β-galactosidase) et de l'expression des marqueurs CD45, CD34 et c-kit. Les cellules CD45⁻/CD34⁺/c-kit⁺ et c-kit⁻ sont PDGFRα⁺ et ont été triées pour la culture cellulaire.

V. Culture cellulaire

Les cellules progénitrices pulmonaires CD45⁻/CD34⁺/β-gal⁺/c-kit⁻ isolées par FACS ont été utilisées pour tester l'effet *in vitro* de l'activation ou de l'inhibition de PDGFRα sur leur prolifération et différenciation en CML. En sortie de FACS, les cellules ont été mises en culture à une densité de 2000 cellules/cm² dans un milieu DMEM (4.5g/L de glucose, Thermo Fisher Scientific), complémenté de 20% de SVF et 1% PS (Thermo Fisher Scientific) pendant 24 heures.

Pour les expériences d'activation de PDGFRα, les cellules ont ensuite été incubées dans un milieu DMEM (4.5g/L de glucose) supplémenté avec 1% de SVF, 1% de PS et ont été stimulées ou non avec 20ng/ml de ligands de PDGFRα (PDGF-AA ; -AB et -BB, R&D Systems). Pour les expériences d'inhibition du récepteur, les cellules ont été incubées avec du DMEM contenant 5% de SVF, 1% de PS et l'anticorps bloquant APA5 ou l'IgG contrôle (150μg/mL). Dans les 2 cas, le milieu a été changé tous les deux jours puis la culture arrêtée au 5^e jour pour l'analyse par immunofluorescence.

Les populations c-kit⁺ et péricytes sont plus difficiles à cultiver. En effet, les péricytes mettent 3-4 jours à adhérer au plastique (nous n'avons pas trouvé de matrice particulière pour améliorer ce paramètre) puis plusieurs semaines avant de s'étaler et proliférer. Les c-kit⁺ adhèrent rapidement mais mettent plusieurs jours (7 à 10jours) avant de s'étaler. Elles sont également très sensibles à la concentration en SVF du milieu, qui ne peut être abaissée en dessous de 15%.

Afin de différencier les cellules c-kit⁺ en cellules endothéliales, différentes conditions de culture ont été testées. Les cellules ont étéensemencées sur une matrice : fibronectine (fournisseur) ou matrigel (fournisseur), avec du DMEM 20% SVF pendant 24h et pour chaque matrice, 2 milieux ont été testés : Stempro 34 (Thermo Fisher Scientific) et EBM2 microvasculaire complet (Lonza). Les milieux ont été complémenté avec du VEGF (200ng/puit), de la forskoline (4μM) et de l'acide ascorbique (5μg/puit). Le milieu est changé tous les 2 jours et la quantité de VEGF progressivement diminuée : à J5 100ng, à J7 50ng, à J9 0ng. Le protocole de différenciation est arrêté à J12 pour réaliser des marquages immunofluorescent et détecter des marqueurs endothéliaux.

VI. Séquençage de cellules uniques (Single-cell)

1. Principe du Single cell

La technique de Single-cell RNA-Seq permet de séparer des populations cellulaires distinctes en mesurant l'expression des gènes (transcriptome) dans chaque cellule. Elle permet également d'estimer le niveau de différenciation de chaque cellule au sein d'un tissu et par conséquent d'estimer la dynamique du processus de différenciation cellulaire. Le principe de cette technique est basé sur l'isolement des cellules par microfluidique. Chaque cellule est isolée dans une gouttelette d'huile contenant des réactifs (polymérase, oligonucléotides, rétrotranscriptase...) et une bille recouverte de séquences adaptatrices uniques contenant :

- un barcode qui est un identifiant unique à chaque bille et donc à la cellule
- une courte séquence aléatoire : UMI (Unique Molecular Identifier) unique à chaque séquence adaptatrice. Chaque bille présente donc plusieurs UMI. Cette séquence est utilisée pour éviter les biais d'amplification
- une séquence polyT permettant la fixation des ARNm par complémentarité avec leurs queues polyA.

Après lyse des cellules, les séquences barcode+UMI+ARNm sont converties en ADNc. Le transcriptome de ces cellules est ensuite séquencé (environ 2000 ADNc/cellules) (constitution de bibliothèques) puis par une analyse bio-informatique, les cellules sont regroupées selon la proximité de leur transcriptome.

L'analyse single-cell RNA-seq a été réalisée sur un groupe contrôle de 4 souris en normoxie versus un groupe de 4 souris placées 4 jours en HC. Pour chaque groupe, les cellules isolées par FACS ont été poolées.

2. Tri cellulaire et obtention des ADNc

La digestion des poumons de souris pour obtenir des cellules pulmonaires isolées est identique à la description du paragraphe « IV Cytométrie de flux ». Les cellules ont ensuite été incubées avec l'Ac anti CD45, puis le DDAO-G et enfin le Zombie green (voir précédemment). Le tri cellulaire a été effectué de manière à récupérer les cellules vivantes CD45-/ β -gal+, réceptionnées dans du DMEM 5% SVF, 1% PS. Les cellules ont ensuite été conditionnées à une concentration de 1000 cellules/ μ l.

Les ARN et ADNc de chaque cellule ont été obtenus selon le protocole fourni par 10X genomics (version3). La prestation a été réalisée par Thierry Jaffredo de l'Institut de Biologie Paris-Seine (IBPS, Paris, France). La qualité des ADNc a été vérifiée après migration et analyse sur TapeStation (software A.02.02 (SR1)) puis les librairies ont été générées grâce au système Novaseq6000 (Illumina). La qualification des ADNc et la génération des librairies (normoxie et hypoxie) ont été réalisées par Yannick Marie et Emeline Mundwiler de la plateforme de génotypage séquençage de l'Institut du Cerveau et de la Moelle (ICM, Paris, France).

3. Analyses bio informatiques

Les analyses bio informatiques ont été réalisées par Justine Guégan et Mathilde Bertrand de la plateforme Bioinformatique/Biostatistiques : Data Analysis Core, de l'ICM.

Le logiciel Cell Ranger Single-cell (version 3.0.2) [305] a été utilisé pour générer des matrices d'expression de gène par cellule, à partir du génome murin de référence « mm10 », auquel a été ajoutée la séquence de la β -galactosidase (notre gène rapporteur). Ensuite, le package bioconducteur Seurat (version 3.0.2) [306] a été appliqué pour filtrer les données et identifier les différents types de cellule. Les gènes exprimés dans au moins 5 cellules, et les cellules exprimant au moins 200 gènes ont été conservés.

Les cellules présentant moins de 400 UMI, plus de 50 000 UMI ou celles ayant plus de 10% de gènes mitochondriaux ont été écartées de l'analyse car probablement mortes ou agrégées. Chaque échantillon (normoxie et hypoxie) a été normalisé de manière indépendante à l'aide de la méthode de régression binomiale négative mise en œuvre dans la fonction SCTransform de Seurat, via la sélection des 3000 principaux gènes variables et la régression du pourcentage d'expression des gènes mitochondriaux. Les échantillons ont ensuite été fusionnés et l'intégration a été effectuée en suivant la « vignette » CCA de Seurat. Les données finales étaient composées de 17568 gènes exprimés et 9742 cellules (5341 cellules en Normoxie et 4401 cellules en Hypoxie). Pour regrouper les cellules, une analyse en composantes principales (PCA) a été effectuée sur les niveaux d'expression des principaux gènes variables entre les cellules grâce à la fonction RunPCA de Seurat puis une Uniform Manifold Approximation and Projection (UMAP) a été calculée grâce à la fonction RunUMAP de Seurat afin de visualiser les différents clusters déterminés. Nous avons ensuite attribué une identité aux différents clusters en nous basant sur des combinaisons d'expression de gènes. L'analyse de trajectoire a été réalisée en utilisant une partition graph abstraction (PAGA) [307] avec le package scanpy.

RESULTATS

Partie 1 : PDGFR α activation drives pulmonary vascular remodeling via progenitor cell proliferation and induces pulmonary hypertension

I. Introduction de l'article

La muscularisation et la néomuscularisation des artérioles pulmonaires sont des phénomènes majeurs du remodelage vasculaire au cours de l'HTAP. Actuellement, aucun traitement ne permet d'inverser ni même ralentir ce processus. Différentes études se sont intéressées à l'origine de ces nouvelles CML, ainsi qu'aux voies impliquées dans leur recrutement, leur prolifération et leur différenciation [150]. Précédemment, l'équipe a ainsi découvert, aussi bien chez les patients que dans les modèles expérimentaux, de nouveaux progéniteurs pulmonaires vasculaires résidents, caractérisés par l'expression des marqueurs CD34, PW1 et PDGFR α . [12] Ces progéniteurs prolifèrent dans 2 modèles expérimentaux d'HP (HC et MCT) et se différencient précocement en CML, participant ainsi à la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires. L'étude avait également permis de déterminer que la voie SDF1/CXCR4 était impliquée dans leur différenciation mais pas dans leur prolifération. Déterminer la voie de signalisation responsable de leur recrutement est un enjeu crucial pour la compréhension des mécanismes régulant le développement de l'HTAP, et représenterait une éventuelle cible thérapeutique supplémentaire. Parmi les marqueurs exprimés par ces progéniteurs, PDGFR α est apparu comme un candidat à fort potentiel. En effet, il présente un fort pouvoir mitogénique et a été décrit comme régulateur de la prolifération et différenciation de plusieurs populations de CS adultes. [183] **L'hypothèse de ces travaux est donc que la voie PDGFR α serait responsable/impliquée dans la prolifération des progéniteurs PW1⁺ et dans leur différenciation en CML, participant ainsi à la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires et au développement de l'HTAP.** Cette hypothèse est renforcée par les données de la littérature qui montrent l'activation des voies des PDGF/PDGFR au cours de l'HTAP chez l'Homme et dans les modèles expérimentaux. D'autre part, l'inhibition de ces 2 récepteurs par l'imatinib protège contre le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chronique [280]. Cependant, l'implication spécifique de la voie PDGFR α n'a pas été étudiée. De plus, cibler uniquement PDGFR α pourrait peut-être permettre de contourner les effets cardiotoxiques de l'imatinib observés pendant l'étude IMPRES. [301]

Le but de ce projet est d'étudier l'implication de la voie PDGFR α dans le recrutement précoce des progéniteurs PW1⁺ au cours de l'HTAP. Pour mener à bien cette étude, les expériences ont été principalement réalisées avec des souris exprimant la β -galactosidase (souris PW1^{nLacZ}) comme rapporteur des cellules PW1⁺ et de leur descendance.

Ce gène rapporteur permet d'isoler les progéniteurs par FACS afin de les cultiver et de les étudier *in vitro*. De plus, la β -galactosidase est très stable et son expression perdure lors de la différenciation, ce qui permet de détecter les CML nouvellement formées β -gal⁺ issues des progéniteurs PW1⁺ et de les différencier des CML plus anciennes ou issues d'autres progéniteurs. Le modèle d'hypertension pulmonaire induite par hypoxie chronique a été choisi pour l'étude précoce de la néomuscularisation.

II. Objectifs et résumé de l'article

Afin de confirmer notre hypothèse, les objectifs suivants ont été définis :

Objectif 1 : Etudier *in vivo* l'effet d'une inhibition de la voie PDGFR α sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs, sur la (néo)muscularisation et sur le développement de l'hypertension pulmonaire induite par hypoxie chronique.

Résultats : L'inhibition de PDGFR α par un anticorps bloquant spécifique, APA5, prévient la prolifération des progéniteurs PW1⁺, leur différenciation en CML et réduit la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires, induites par 4 jours d'HC. Suite à 21 jours d'HC, l'inhibition spécifique préventive du récepteur limite la (néo)muscularisation mais n'est pas suffisante pour prévenir le développement de l'hypertrophie du VD, ni l'établissement d'une HP.

Objectif 2 : Déterminer *in vitro* le rôle de la voie PDGFR α dans la prolifération et la différenciation des progéniteurs.

Résultats : L'inhibition de PDGFR α par APA5 inhibe la prolifération et la différenciation *in vitro* des progéniteurs CD34⁺/PDGFR α ⁺/ β -gal⁺/c-kit⁻. Cependant, la stimulation de PDGFR α par son ligand spécifique, PDGF-AA, induit uniquement leur prolifération.

Objectif 3 : Etudier *in vivo* l'effet d'une activation constitutive de la voie PDGFR α sur la prolifération et la différenciation des progéniteurs, sur la (néo)muscularisation et sur le développement de l'hypertension pulmonaire en normoxie.

Résultats : *In vivo*, l'activation constitutive de PDGFR α , en condition de normoxie, cause, après 15 jours, une (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires (chez les mâles et les femelles) suite à la différenciation des progéniteurs PW1⁺ en CML. De plus, après 5 semaines d'activation constitutive, les mâles, uniquement, développent une hypertrophie du VD et une HP.

Objectif 4 : Observer la participation des progéniteurs $PW1^+/PDGFR\alpha^+$ dans le remodelage des artérioles pulmonaires de patients HTAP.

Résultats : Le nombre de cellules périvasculaires $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^-$ est significativement augmenté autour des vaisseaux remodelés chez les patients HTAPi. De plus, on observe également une augmentation du nombre de cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^+$ dans la media et la néointima de ces vaisseaux, suggérant une différenciation des cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^-$. Ces observations associées à une élévation du niveau d'expression des ligands de PDGFR α suggèrent l'implication de sa signalisation dans le recrutement de ces progéniteurs au cours du développement de la pathologie.

III. Conclusion

Dans les poumons de patients HTAP (prélèvements post greffe), on observe une augmentation du nombre de cellules périvasculaires $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^-$ et une augmentation du nombre de cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^+$ dans la media et la néointima des vaisseaux pulmonaires. Notre étude suggère que cette augmentation du nombre de cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+$ chez les patients serait due à l'activation de PDGFR α dont la signalisation promeut, entre autre, la prolifération cellulaire. En effet, dans notre modèle expérimental d'HP, l'HC induit une prolifération des progéniteurs $PW1^+$ ainsi que leur différenciation en CML dès 4 jours, contribuant à la mise en place d'une (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires. Or l'inhibition de PDGFR α par un inhibiteur pharmacologique non spécifique : l'imatinib, ou par un Ac bloquant spécifique : l'APA5, prévient ces phénomènes. A l'inverse, en normoxie, l'induction de l'activation constitutive de PDGFR α conduit à une différenciation des progéniteurs $PW1^+$ en CML ainsi qu'à une (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires, 15 jours post-induction, renforçant le rôle de sa signalisation dans le remodelage vasculaire observé.

Bien qu'APA5 prévienne le remodelage précoce, et ralentisse le remodelage sur 28 jours d'HC (diminution du nombre de vaisseaux totalement muscularisés au profit des vaisseaux partiellement muscularisés), il ne permet pas d'empêcher l'établissement d'une HP et d'une hypertrophie du VD chez la souris. En outre, il semblerait que l'activation constitutive de PDGFR α sur du long terme pourrait devenir un nouveau modèle expérimental de l'HP puisque les mâles développent une HP 5 semaines post-induction.

L'ensemble de nos résultats confirment l'importance de la signalisation médiée par PDGFR α dans le remodelage vasculaire et suggère un potentiel de nouvelle cible thérapeutique en complément des traitements actuels.

L'ensemble de ces travaux a été soumis dans le journal : Journal of the American Heart Association, et vous est présenté selon le format appliqué pour la soumission. L'article a reçu un reviewing favorable (avec révisions mineures) le 11 novembre 2021, ne nécessitant pas d'expériences supplémentaires.

ARTICLE

PDGFR α activation drives pulmonary vascular remodeling via progenitor cells proliferation and induces pulmonary hypertension

Julien Solinc^{1,2*} Msc, Jessica Raimbault-Machado^{1,2*}, France Dierick^{1,3} PhD, Lamiaa El Bernoussi^{1,2} Msc, Ly Tu^{4,5} PhD, Raphaël Thuillet^{4,5} Msc, Nathalie Mougenot⁶ PhD, Bénédicte Hoareau-Coudert⁷, Virginie Monceau^{1,2} PhD, Catherine Pavoine^{1,2} PhD, Fabrice Atassi^{1,2}, David Sassoon⁸ PhD, Giovanna Marazzi⁸ MD, PhD, Richard P. Harvey^{9,10} PhD, Peter Schofield^{10,11} PhD, Daniel Christ^{10,11} PhD, Marc Humbert^{4,5,12} MD, PhD, Christophe Guignabert^{4,5} PhD, Florent Soubrier^{1,2} MD, PhD and Sophie Nadaud^{1,2} PhD.

* Co-first authors

Short Title: PDGFR α drives pulmonary vascular remodeling

Corresponding author: Dr Sophie Nadaud, UMR_S 1166 ICAN, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, 91 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. E-mail sophie.nadaud@sorbonne-universite.fr

ORCID: 0000-0002-1452-6009

Word count: 8403

Subject codes

Pulmonary Hypertension; Animal Models of Human Disease; Smooth Muscle Progenitor Cells; Vascular Remodeling; PDGFR

AFFILIATIONS:

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

² ICAN Institute, F-75013 Paris, France

³ Lady Davis Institute for Medical Research, McGill University, Montréal QC, Canada

⁴ Université Paris-Saclay, School of Medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France

⁵ INSERM UMR_S 999 «Pulmonary Hypertension: Pathophysiology and Novel Therapies», Hôpital Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

⁶ Sorbonne Universités, INSERM, UMS28, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France.

⁷ Sorbonne Universités, INSERM, Plateforme CyPS, Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France.

⁸ Université de Paris, INSERM, Paris Cardiovascular Research Center, Paris, France

⁹ Victor Chang Cardiac Research Institute, Darlinghurst, NSW 2010 Australia

¹⁰ St. Vincent's Clinical School and School of Biotechnology and Biomolecular Science, UNSW Sydney, Sydney, Australia

¹¹ Immunology Division, Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, NSW 2010 Australia

¹² Assistance Publique - Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Respiratory and Intensive Care Medicine, Pulmonary Hypertension National Referral Center, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France.

ABSTRACT

Background: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by vascular remodeling and neomuscularization. We previously showed that PW1⁺ pulmonary vascular progenitor cells expressing PDGFR α (platelet-derived growth factor receptor α) are recruited to participate in early pulmonary vessel neomuscularization during experimental pulmonary hypertension (PH) development. As PDGF is an important pathway in PAH development, we addressed the role of the PDGFR α pathway in progenitor cell-dependent vascular remodeling and in PH development.

Methods: Lung sections from iPAH and control patients were analyzed by immunofluorescence. PW1^{nLacZ} reporter mice were used to isolate PW1⁺ progenitor cells for culture and to follow their fate in a model of chronic hypoxia (CH)-induced pulmonary arteriole muscularization and PH development. PDGFR α was inhibited using a specific blocking antibody and activated either by expressing a constitutively activated PDGFR α mutant protein in tamoxifen-induced PW1^{nLacZ/+} \times RosaCre^{ERT2} \times PDGFR $\alpha^{+/S}K$ mice or by PDGF-AA daily administration. Blood pressure measurements, immunofluorescence analyses of pulmonary vascular smooth muscle cells and progenitor cells were performed to determine alterations in pulmonary hemodynamics, muscularization, fibrosis and progenitor cells recruitment. Fibrosis was analyzed by picrosirius lung staining imaging and RT-PCR quantification of collagen expression.

Results: Lungs from idiopathic PAH (iPAH) patients were characterized by an increased number of vascular PW1⁺ cells expressing both α -smooth muscle actin and PDGFR α mainly localized in remodeled arteries. In mice under CH, PDGFR α inhibition prevented the increase in PW1⁺ progenitor cells proliferation and differentiation into vascular smooth muscle cells and reduced pulmonary vessel neomuscularization without preventing the increase in right ventricular systolic pressure and the right ventricular hypertrophy. Conversely, PDGFR α constitutive activation led to neomuscularization via PW1⁺ progenitor cells differentiation into new smooth muscle cells and to PH development in male mice with an increased right ventricular systolic pressure and a right ventricular hypertrophy without

fibrosis generation. *In vitro*, PW1⁺ progenitor cells proliferation, but not differentiation, was dependent on PDGFR α activity.

Conclusions: These results demonstrate a major role of PDGFR α signaling in progenitor cell-dependent lung vessel neomuscularization and vascular remodeling contributing to PH development including in iPAH patients. Our findings suggest that PDGFR α blockers may offer a therapeutic add-on strategy to combine with current PAH treatments to reduce vascular remodeling. Furthermore, our study highlights PDGFR α constitutive activation as a novel experimental PH model.

KEY WORDS

Vascular remodeling; Hypertension, Pulmonary; Stem cells; Fibrosis; Receptor, Platelet-Derived Growth Factor alpha

NON STANDARD ABBREVIATIONS AND ACRONYMS

iPAH – idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension

PH – Pulmonary Hypertension

SMC – Smooth Muscle Cell

α -SMA – Alpha Smooth Muscle Actin

CH – Chronic Hypoxia

PDGFR- Platelet-Derived Growth factor Receptor

PW1 – Protein Widely 1

β -gal – Beta-Galactosidase

RVSP – Right Ventricular Systolic Pressure

EdU – ethynyl-deoxyuridine

BrdU – Bromo-deoxyuridine

Myh11 – Smooth muscle myosin heavy chain

FGFR – Fibroblast Growth Factor Receptor

Col1 α 1 – Collagen 1 α 1 chain

Col3 α 1 – Collagen 3 α 1 chain

TGF β – Transforming Growth Factor

1 INTRODUCTION

2 Pulmonary arterial hypertension (PAH), a rare and severe disease, is histologically characterized by a
3 pulmonary vascular remodeling which includes endothelial cell proliferation, media thickening,
4 neointima formation and neomuscularization of small pulmonary vessels. This vascular remodeling
5 leads to increased pulmonary vascular resistance and to pulmonary arterial hypertension causing right
6 ventricular hypertrophy and ultimately right heart failure and death. During the development of PAH,
7 pulmonary arterioles, which are mainly non muscularized, become covered by smooth muscle cells
8 (SMC). This neomuscularization, observed in PAH patients and rodent models of PAH, is driven by SMC
9 proliferation but also by the recruitment of pericytes and other SMC progenitor cells¹⁻⁴. We have
10 recently identified, in rodent and human lungs, new perivascular pulmonary progenitor cells
11 characterized by the expression of stem cells markers PW1, PDGFR α and CD34³. During early chronic
12 hypoxia (CH), an experimental PAH model, these PW1⁺ progenitor cells proliferate and differentiate
13 into news SMC, contributing to small pulmonary vessel neomuscularization. We showed that their
14 differentiation into SMC was under the control of the CXCR4/CXCL12 pathway, but the factors
15 regulating their proliferation was still unknown.

16 Studies from the past 25 years have highlighted the platelet-derived growth factor (PDGF) pathway as
17 a major regulator of pulmonary vascular remodeling and PAH development⁵⁻⁷. PDGF receptors
18 (PDGFRs) are transmembrane tyrosine kinase receptors (RTKs) with two isoforms, PDGFR α and
19 PDGFR β , which assemble into homo or hetero-dimers. Four PDGF ligands present as dimers (PDGF-AA,
20 -BB, -AB, -CC, -DD) differentially activate these receptors and play an important paracrine role during
21 embryonic and vascular development (for review see⁸). All PDGFR forms can activate PI3K, PLC γ , Ras-
22 MAPK signaling pathways but trigger distinct cellular responses. Expression of PDGF-A and B and
23 PDGFR α and β was found significantly increased in PAH patients lungs as compared to control lungs⁵.
24 PDGFRs inhibition using imatinib (STI 571), which targets both the PDGFR α and β subtypes but also
25 Bcr/Abl and c-kit, protects against PH development in rodent experimental models⁹. These effects
26 were attributed to the PDGFR β pathway as PDGFR β signaling inhibition or constitutive activation

1 respectively reduced and increased CH-induced PH development in mice ^{10,11}. In contrast the role of
2 PDGFR α during PAH process has not been investigated yet. This receptor is a marker for mesenchymal
3 stem cells in various organs (heart, skeletal muscle, adipose tissue and bone marrow) and of pulmonary
4 vascular progenitor cells ^{3,12}. The PDGF-A/PDGFR α pathway controls stem cells proliferation and
5 differentiation ¹³⁻¹⁶ and is involved in particular in myofibroblasts formation during lung development
6 ¹⁷.

7 Here, we provide evidence that PW1⁺/PDGFR α ⁺ progenitor cells are recruited in human iPAH
8 remodeled arteries. We establish that PDGFR α activation regulates pulmonary vascular remodeling
9 during experimental chronic hypoxia-induced PH. We demonstrate *in vitro* and *in vivo* that this
10 receptor controls the proliferation of PW1⁺/PDGFR α ⁺ pulmonary vascular progenitor cells that
11 contribute to form new SMC during CH. Furthermore, we highlight that PDGFR α activation leads to PH
12 development in a PDGFR α constitutive activation mouse model or after chronic PDGF-AA treatment.

13

1 METHODS

2 Detailed Methods are provided in the Online Data Supplement.

3 Pw1^{IRESnLacZ} transgenic mice (Pw1^{nlacZ/+}) bear a nuclear operon lactose gene expressed under the control
4 of the Pw1 gene locus¹⁸. The stability (produrance) of the β -gal reporter allows to perform short term
5 lineage tracing of cells derived from Pw1⁺/ β -gal⁺ cells. They were crossed with
6 RosaCre^{ERT2}xPDGFR $\alpha^{+/(S)K}$ mice which allow, following tamoxifen administration, expression of a
7 constitutively activated form of PDGFR α (D842V) in PDGFR α -expressing cells¹⁹. Mice (male and female
8 littermates of 7-10 weeks-old) were exposed to room air (normoxia) or chronic normobaric hypoxia
9 (10% O₂) for 4 or 21 days. PDGFR α activity was inhibited *in vivo* using either imatinib or the specific
10 blocking antibody, APA5. Imatinib was injected daily (50mg/kg of body weight i.p.) and the blocking
11 antibody or the control IgG were injected i.p. once (500 μ g/mouse) 3 days before starting CH and
12 overall during the course of CH for 4 or 21 days (100 μ g/mouse) every 3-4 days. PDGF-AA (or vehicle)
13 was injected daily (150ng/mouse, i.p.) for three weeks in Pw1^{nlacZ/+} mice. Following the different
14 treatments, mice were anesthetized to measure hemodynamic parameters, right ventricular
15 hypertrophy and to collect lungs for tissue analysis. Fluorescence activated cell sorting (FACS) was used
16 to isolate the PDGFR α^{+} /Pw1⁺ progenitor cell populations from Pw1^{nlacZ/+} mice based on their β -gal
17 activity and a combination of progenitor cell markers to study them in culture. FACS-isolated CD45⁻
18 /CD34⁺/ β -gal⁺/c-kit⁻ were cultured 5 days in the presence of PDGF ligands (20ng/ml), control IgG or
19 APA5 blocking antibody (150ng/ml) before immunofluorescence analysis.

20

21

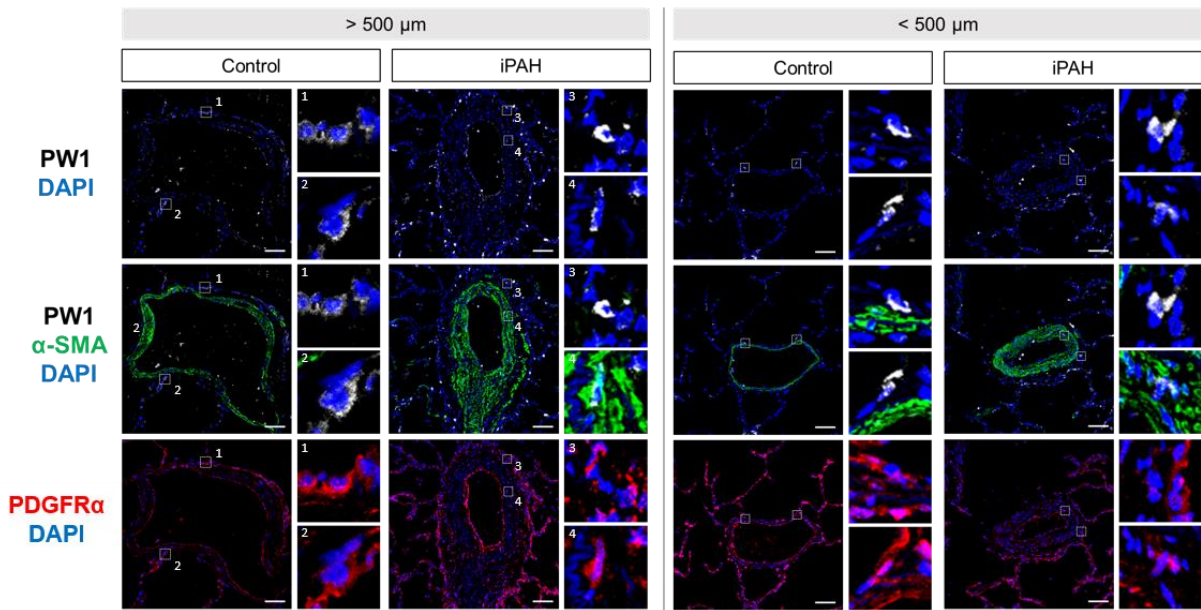
22

1 RESULTS

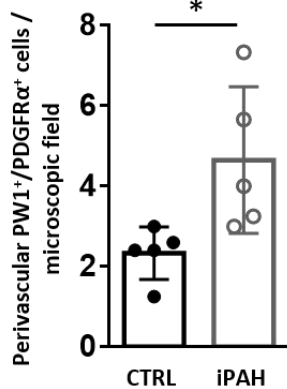
2 **PW1⁺/PDGFR α ⁺/ α -SMA⁺ cells are increased in iPAH patients**

3 Activation of the PDGFR α pathway in human iPAH has been suggested by the increased expression of
4 PDGF-A in patients' lungs ⁵. We first sought to determine whether pulmonary PW1⁺/PDGFR α ⁺
5 progenitor cells are preferentially recruited in human iPAH-associated vascular remodeling. Patients'
6 characteristics are indicated in Online Table II. We measured the number of PW1⁺, α -SMA⁺ and
7 PDGFR α ⁺ cells adjacent to or within pulmonary vessels from control and iPAH patients.
8 Immunofluorescence studies (Fig. 1A) confirmed the presence of PW1⁺ cells organized in clusters in
9 the perivascular zone and their absence in the media of control patients' lungs, as seen previously ³.
10 Importantly, these PW1⁺ cells were positive for PDGFR α expression. In iPAH patients, PW1⁺ cells were
11 found more numerous around remodeled arteries but also within their media and neointima (Fig. 1A-
12 B) confirming their recruitment as in murine experimental models ³. While the number of
13 PW1⁺/PDGFR α ⁺ cells was equivalent in control and iPAH patients, the number of PDGFR α ⁺/PW1⁺/ α -
14 SMA⁺ SMC in arteries of iPAH patients was enhanced (Fig. 1B-C) suggesting that they might derive from
15 PW1⁺/PDGFR α ⁺ progenitor cells, as observed in the mouse PH experimental model ³. These results
16 together with the high expression of PDGFR α ligands observed in remodeled pulmonary arteries from
17 iPAH patients ⁵ indicate that this pathway could drive progenitor cells recruitment during PAH
18 development.

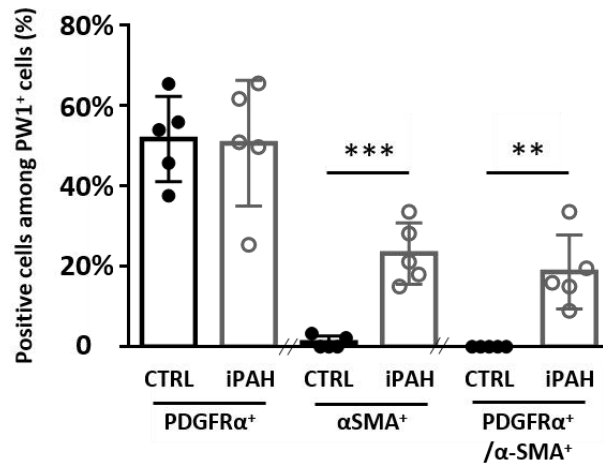
A



B



C



1 **Figure 1. Perivascular PW1⁺/PDGFRα⁺ cells are increased in the perivascular zone and within the**
 2 **vascular wall of remodeled arteries in iPAH patients.** Lung sections from control (CTRL) or iPAH
 3 patients (iPAH) were labeled for PW1 (white), PDGFRα (red), and α-SMA (green). **A**, Representative
 4 confocal images of pulmonary vessels (>500 μm diameter left panels, <500 μm diameter right panels)
 5 from control patients (n=5) and patients with iPAH (n=5). Panels 1, 2, and 3 show details of
 6 perivascular PW1⁺/PDGFRα⁺ cells. Panel 4 shows details of PW1⁺/PDGFRα⁺/α-SMA⁺ cells found
 7 within arteries in iPAH patients. **B**, quantification of perivascular PW1⁺/PDGFRα⁺ cells. **C**,
 8 quantification of PDGFRα⁺ or α-SMA⁺ or PDGFRα⁺/α-SMA⁺ cells among perivascular and vascular
 9 PW1⁺. Scale bar, 50 μm. Values are mean±SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ns= not significant (2-
 10 tailed Mann-Whitney).

1 **Chronic hypoxia induces PDGFR α pathway in mouse lungs.**

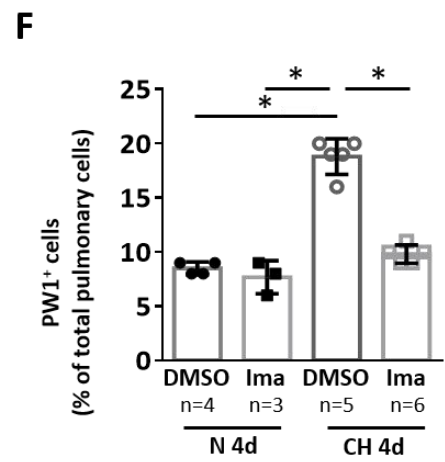
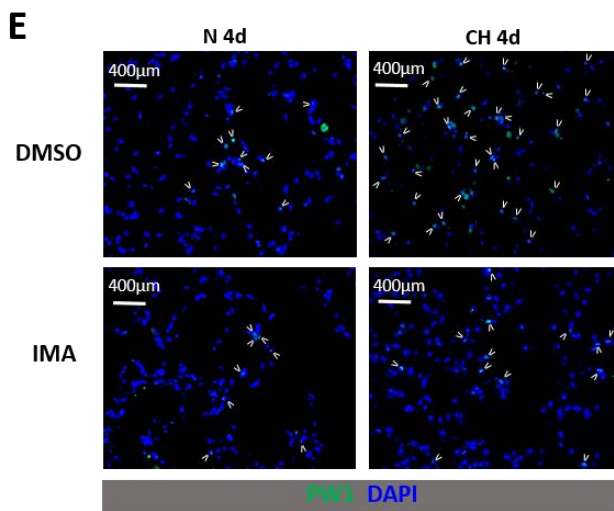
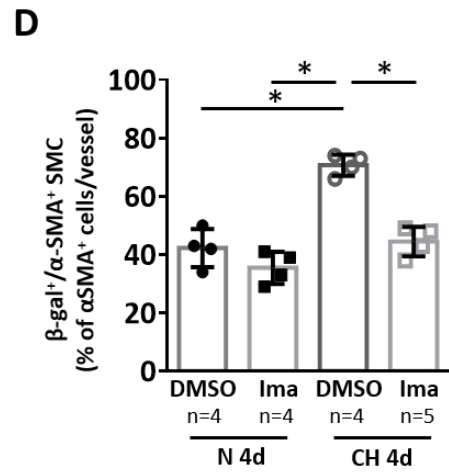
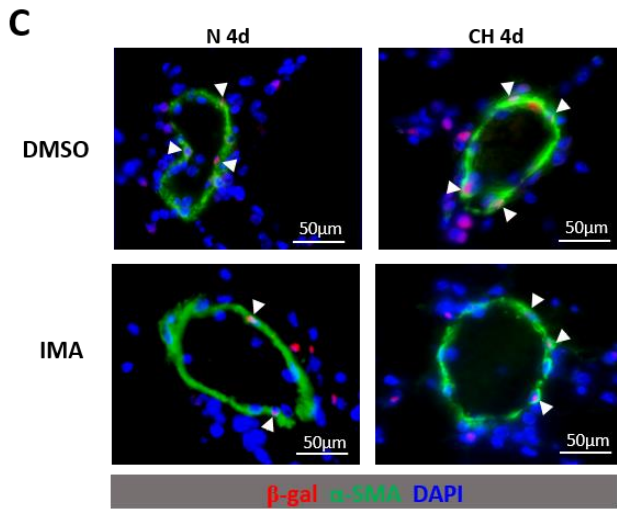
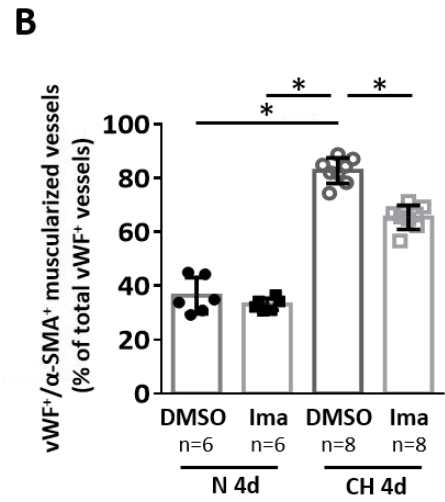
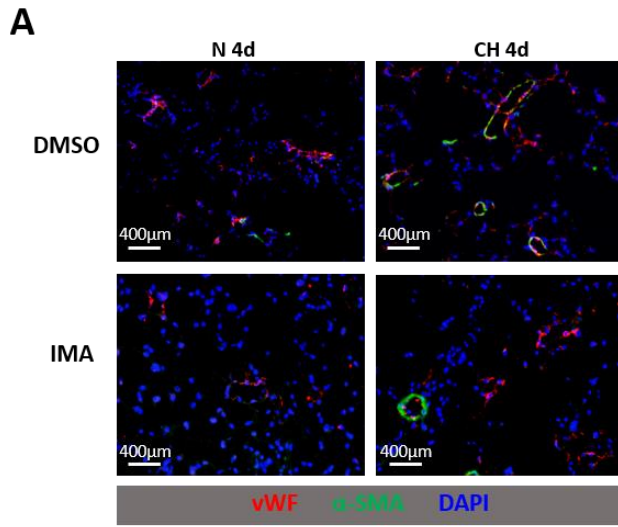
2 We reported previously that early neomuscularization of pulmonary arteries observed in the chronic
3 hypoxic PH experimental model relies on the recruitment of pulmonary resident
4 CD34⁺/PDGFR α ⁺/PW1⁺ progenitor cells³. To study the role of the PDGFR α pathway in the activation of
5 these progenitors and the associated vascular remodeling, we first examined the expression of the 4
6 PDGF ligands and the 2 PDGFR isoforms in total mouse lung extracts during the first days of CH by RT-
7 PCR (supplemental Fig. I). PDGF-A, B and D and PDGFR α and β expression were all increased (x1.3 to
8 x2, p<0.05) after 1 day of CH, suggesting an early overall activation of both PDGFR pathways.
9 Noteworthy, expression of PDGF-A, a specific PDGFR α ligand, remained upregulated after 4 days of CH
10 compared to normoxia. These results suggest an early activation of PDGFR α signaling during CH.

11 **PDGFR α inhibition during CH inhibits PW1⁺ progenitor cells recruitment and pulmonary vascular**
12 **remodeling *in vivo*.**

13 In order to explore the role of PDGFR α in PW1⁺ progenitor cells recruitment and in vascular remodeling
14 during CH, we inhibited PDGFR α using 2 approaches: 1/ i.p. injection of a pharmacological inhibitor,
15 imatinib, which also targets PDGFR β , c-kit and c-abl, and has already been studied in PH models^{9,11}
16 and 2/ i.p. injection of the PDGFR α specific blocking antibody APA5²⁰.

17 Experiments were performed in the PW1^{nLacZ} transgenic mouse model, in which the β -gal reporter
18 stability (produrance) allows short term lineage tracing of PW1⁺-derived cells to study both PW1⁺
19 progenitor cells proliferation and their differentiation into SMC. These mice were maintained under
20 normoxia (N) or CH for 4 days and treated daily with DMSO or imatinib. Pulmonary vessel
21 muscularization (percentage of partially+fully muscularized vessels), measured using α -SMA and vWF
22 co-labelling (Fig. 2A), was increased by CH (83 \pm 4.7% of muscularized arterioles vs 36 \pm 6.7% in normoxia,
23 Fig. 2B). As previously shown³, this neomuscularization was at least partially due to an increased
24 number of β -gal⁺ vascular SMC derived from PW1⁺ progenitor cells (72 \pm 4% per vessel vs 42 \pm 7% in
25 normoxia, Fig. 2C-D) associated with a greater number of pulmonary PW1⁺ progenitor cells (19 \pm 2% of

1 parenchymal cells vs $8\pm 1\%$ in normoxia, Fig 2E, F). Imatinib treatment had no effect on these
2 parameters under normoxia but significantly reduced by 40% CH-induced muscularization (from
3 $83\pm 4.7\%$ in CH+DMSO to $65\pm 4.5\%$ in CH+IMA, $p<0.05$) (Fig. 2B) and completely abolished PW1⁺
4 progenitor cells recruitment under CH reducing to basal levels the number of PW1⁺ progenitor-derived
5 SMC (from $72\pm 4\%$ per vessel in CH+DMSO to $47\pm 8\%$ in CH+IMA, $p<0.05$ vs DMSO, Fig. 2D) and of PW1⁺
6 cells (from $19\pm 2\%$ of parenchymal cells in CH+DMSO to $10\pm 1\%$ in CH+IMA, $p<0.05$, Fig. 2F). As we have
7 demonstrated previously³ that PW1⁺ progenitor cells involved in early CH-induced neomuscularization
8 are PDGFR α ⁺, these results suggest that PDGFR α activation is involved in PW1⁺ cells increase and
9 differentiation in SMC.



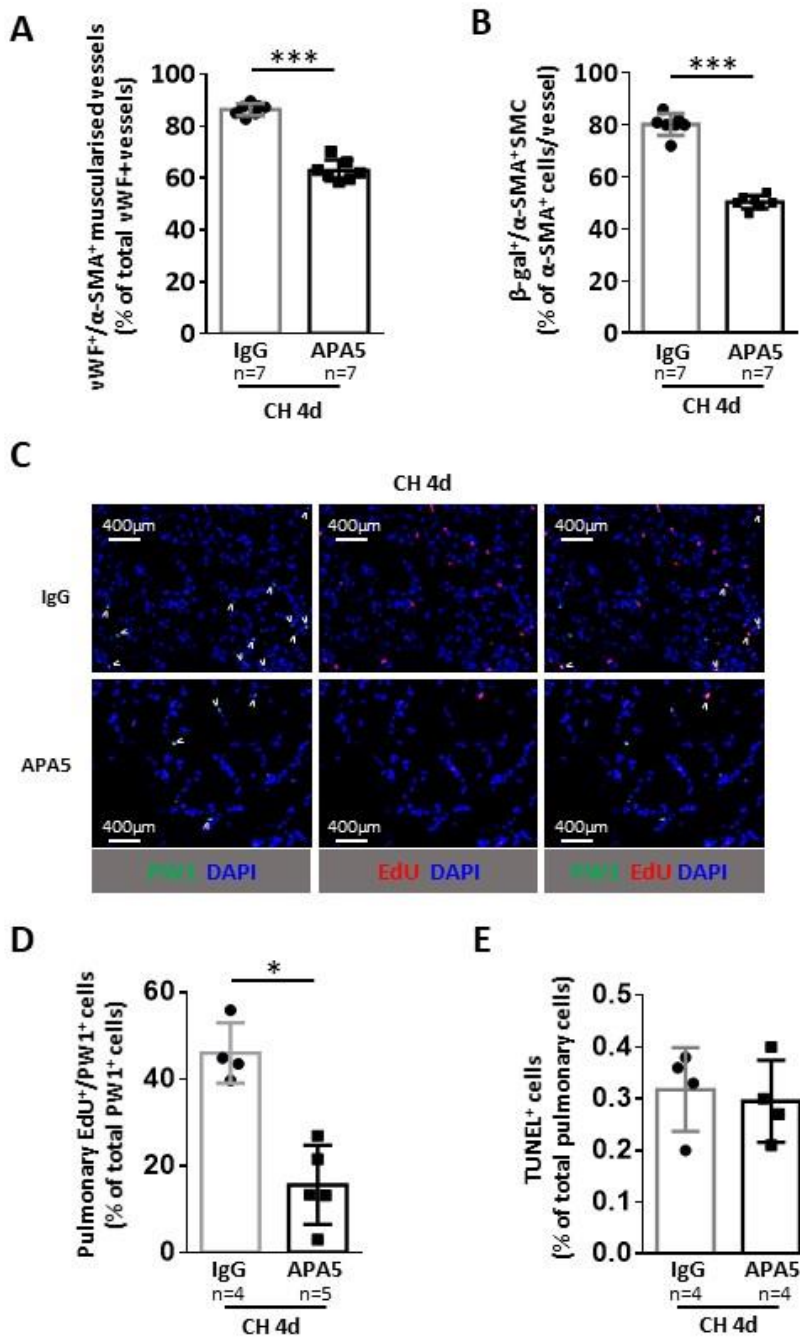
1 **Figure 2. Imatinib treatment prevents early chronic hypoxia (CH)-induced neomuscularization and**
2 **PW1⁺ progenitor cell recruitment and differentiation in SMC.** PW1^{nLacZ} mice were maintained under
3 normoxia (N 4d) or chronic hypoxia (CH 4d) for four days and treated daily with DMSO or imatinib
4 (IMA). **A**, Representative images of von Willebrand factor (vWF, red) and α -smooth muscle actin
5 (α -SMA, green) staining in lungs. **B**, Quantification of muscularized vessels (fully+partially) (n=6-8
6 mice/group). **C** Representative images of pulmonary muscularized vessel stained with α -SMA (green)
7 and β -gal (red) in lungs (double positive are marked by arrowheads). **D**, Quantification of lung
8 β -galactosidase (β -gal)-expressing SMC in fully-muscularized vessels (n=4-5 mice/group). **E**,
9 Representative images of lung parenchyma stained for PW1 (PW1 in green, positive cells are marked
10 by arrowheads). **F**, Quantification of PW1⁺ cells in lung parenchyma (n=3-6 mice/group). Values are
11 mean \pm SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, Kruskal-Wallis and Dunn.

1 To focus on the specific role of PDGFR α , PW1^{nLacZ} transgenic mice were maintained for 4 days under
2 CH and treated with control IgG or PDGFR α blocking antibody APA5. Specific inhibition of PDGFR α
3 during CH reproduced the results obtained with imatinib: early CH-induced pulmonary arterial
4 muscularization was significantly reduced from 86 \pm 2.3% to 63 \pm 4% (p<0.01, Fig. 3A) together with a
5 significant inhibition of the CH-induced increase in the number of PW1⁺ progenitor-derived β -gal⁺
6 vascular SMC (from 80.1 \pm 4.2% to 50.3 \pm 2.4%, p<0.001, Fig. 3B). We previously established that the
7 recruitment of PW1⁺ progenitor cells during early CH was explained by an increased proliferation of
8 these cells³. The proportion of proliferating EdU⁺ PW1⁺ cells was reduced by 66% from 46.0 \pm 7.0% to
9 15.6 \pm 9.1% (p<0.01, Fig. 3C and D) suggesting that blocking PDGFR α reduced the production of new
10 PW1⁺-derived SMC by inhibiting pulmonary PW1⁺ cells proliferation. Pulmonary cells apoptosis,
11 measured by TUNEL, was very low and did not differ between control IgG- and APA5-treated mice (Fig.
12 3E).

13 Together, these data show that PDGFR α activation is essential for CH-induced proliferation and
14 differentiation of PW1⁺ progenitor cell into vascular SMC and participates in the induction of early
15 pulmonary arterial neomuscularization during CH.

16

Figure 3



1 **Figure 3. PDGFR α inhibition with the specific blocking antibody APA5 prevents early chronic hypoxia**
 2 **(CH)-induced neomuscularization and PW1⁺ progenitor cell proliferation and differentiation in SMC.**
 3 PW1^{nLacZ} mice were maintained under CH for four days and treated with control antibody (IgG) or
 4 PDGFR α blocking antibody (APA5). **A**, Quantification of pulmonary muscularized vessels
 5 (fully+partially). For each animal (n=7 mice/group), at least 100 vWF⁺ vessels (<100 μ m) were analyzed
 6 for muscularization (α -SMA⁺). **B**, Quantification of lung β -galactosidase (β -gal)-expressing PW1-derived
 7 SMC in fully-muscularized vessels (<100 μ m) (n=7 mice/group). **C**, Representative images of lung
 8 parenchyma from CH mice treated with control IgG or APA5 and stained for PW1 (green) and EdU
 9 (red), double-positive cells are marked by arrowheads. **D**, Quantification of EdU⁺/PW1⁺ cells in lung

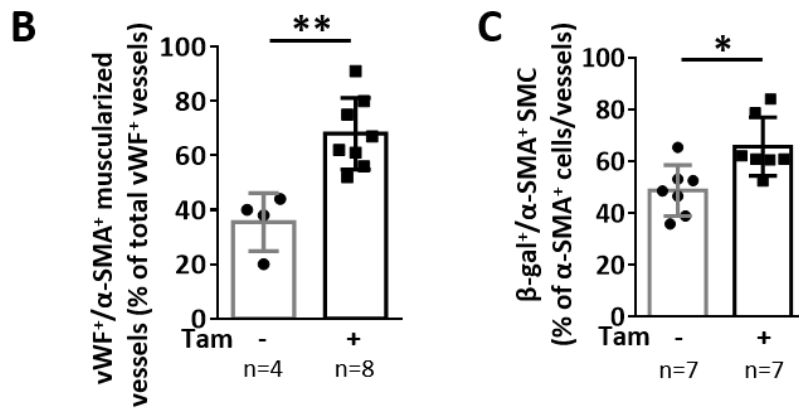
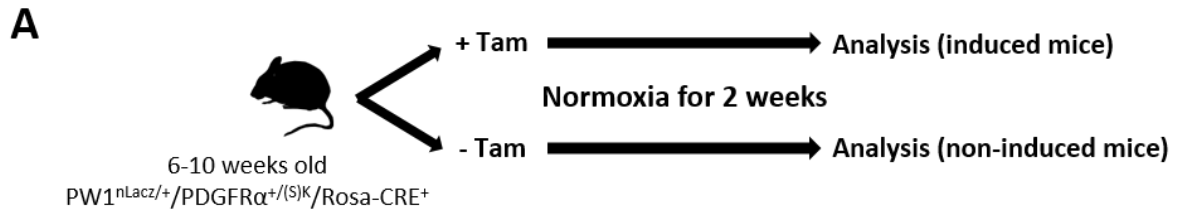
1 parenchyma (n=4-5 mice/group). E, Quantification of pulmonary apoptotic cells. The percentage of
2 TUNEL⁺ cells in lung parenchyma was determined by immunofluorescence (n=4 mice/group). Values
3 are mean±SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0,001. 2-tailed Mann-Whitney. Scale bar 400 μm.

4

5 **PDGFR α activation elicits neomuscularization of pulmonary arterioles through PW1⁺ progenitor cells**
6 **differentiation into new SMC under normoxic conditions *in vivo*.**

7 We developed a novel PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/SJK}/Rosa-CRE^{ERT2} mouse model to directly examine the role
8 of PDGFR α in the regulation of pulmonary progenitor cells and vascular remodeling. We crossed
9 PDGFR α ^{+/SJK} mice with 1) Rosa-CRE^{ERT2} mice for tamoxifen induction and generation of an inducible
10 model of a mutated constitutively activated form of PDGFR α ¹⁹, and 2) with PW1^{nLacZ} mice to follow
11 PW1⁺ progenitor cells fate (Fig. 4A). Two weeks after the last tamoxifen injection, normoxic male and
12 female PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/SJK}/Rosa-CRE^{ERT2} mice showed a significant neomuscularization with a 50%
13 augmentation in the number of muscularized vessels (67±13.9% of muscularized arteries in induced
14 mice vs 35.5±10.3% in non-induced littermates, Fig. 4B). This was associated with an increase in the
15 number of PW1⁺ progenitor-derived vascular SMC (65.8±11.3% per vessel vs 48.8±9.8% in non-induced
16 littermates, Fig. 4C). This vascular remodeling and PW1⁺ cells recruitment was similar to our
17 observations after 4 days of chronic hypoxia³ and was not associated with PH development at this
18 early time point (supplemental Fig. II).

19 Altogether, these results demonstrate that PDGFR α activation leads to pulmonary vessel
20 neomuscularization through PW1⁺ progenitor cells recruitment.



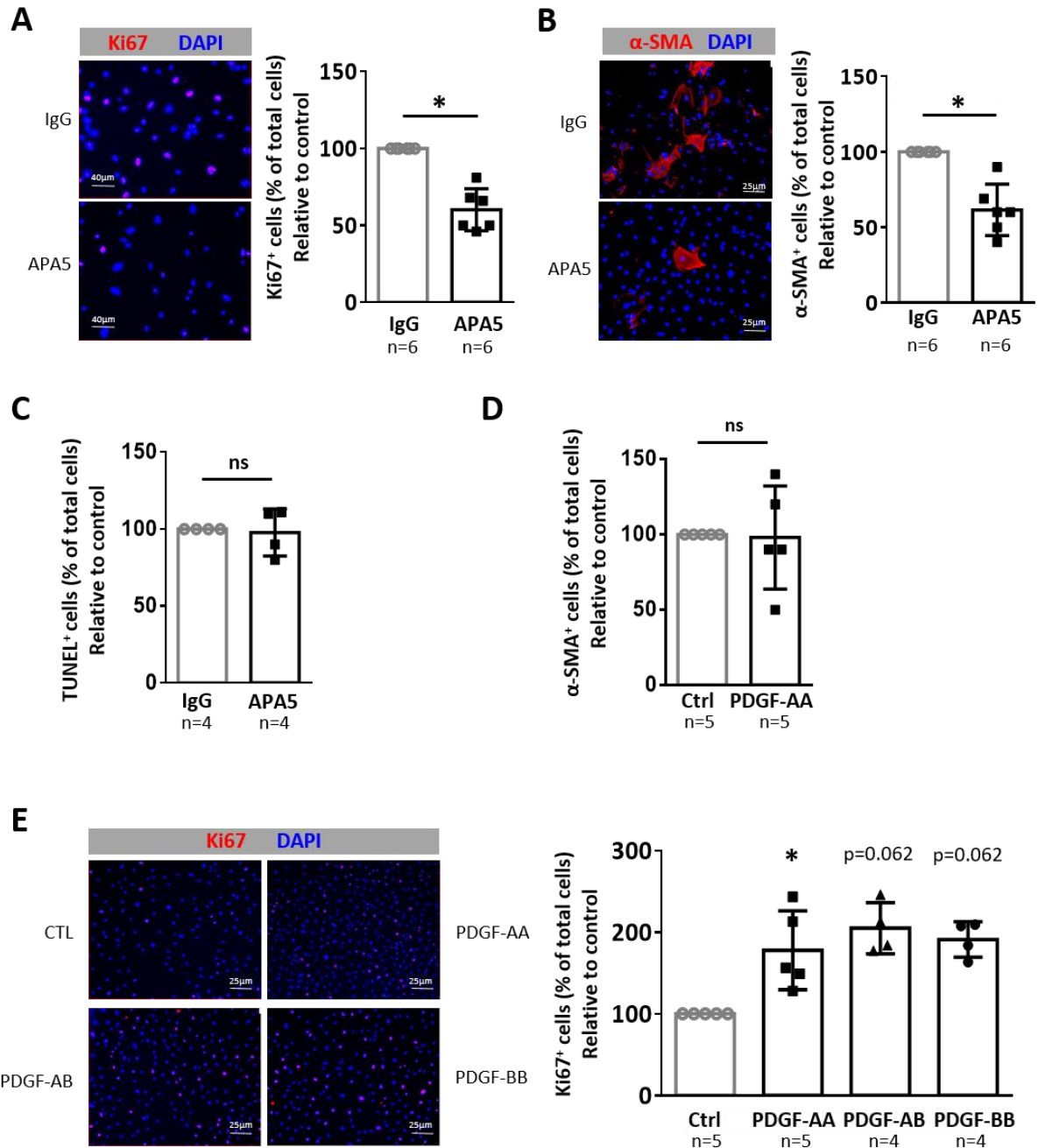
1

2 **Figure 4. Constitutive PDGFRα activation leads to pulmonary vessel neomuscularization due to**
 3 **increased numbers of PW1+ progenitor-derived SMC.** A, Timeline of Tamoxifen (Tam) induction and
 4 analysis of PW1^{nLacZ/+}/PDGFRα^{+(S)K}/Rosa-CRE⁺ mice (males + females). B to D Analysis of mice
 5 lungs two weeks after tamoxifen induction. B, Quantification of muscularized vessels in lungs from
 6 control or tamoxifen-treated mice. Pulmonary vessel muscularization was determined by
 7 immunofluorescence using anti-α-smooth muscle actin (α-SMA) and anti-von Willebrand factor (vWF)
 8 antibodies (n=4-8). For each animal, ≈100 vWF⁺ vessels (<100 μm) were analyzed for muscularization
 9 (α-SMA⁺). C, Quantification of lung β-galactosidase (β-gal)-expressing SMC in fully-muscularized
 10 pulmonary vessels. The percentage of lung β-gal⁺/α-SMA⁺ cells among α-SMA⁺ cells in fully-
 11 muscularized vessels (<100 μm) was determined by immunofluorescence (n=7 for each condition).
 12 Values are mean±SD, *p<0.05, **p<0.01 (2-tailed Mann-Whitney).

1 **PDGFR α controls PW1⁺ progenitor cells proliferation *in vitro*.**

2 To confirm the direct role of the PDGFR α pathway on PW1⁺ progenitor cells proliferation or
3 differentiation, we studied FACS-purified pulmonary CD34⁺/PDGFR α ⁺/PW1⁺ progenitor cells which
4 mainly express PDGFR α and are amplified after chronic hypoxia³. These cells can be separated in two
5 subpopulations according to c-kit expression and we already have shown that the differentiation of
6 the c-kit⁺ population is PDGF-dependent³. We therefore focused on the role of the PDGFR α pathway
7 in the c-kit⁻ cell population which undergoes spontaneous differentiation into α -SMA-expressing SMC
8 under normal culture conditions³. CD34⁺/PDGFR α ⁺/ β -gal⁺/c-kit⁻ cells were sorted and cultured using
9 the strategy previously published³ (supplemental Fig. III). Incubation with PDGFR α -blocking antibody
10 APA5 significantly inhibited their proliferation by 50% as compared to control IgG (Fig. 5A) and reduced
11 their differentiation by 40% (Fig. 5B) without inducing their apoptosis, measured by TUNEL assay (Fig.
12 5C). PDGF-AA treatment did not induce their differentiation into α -SMA⁺ SMC (Fig 5D), however,
13 treatment of these progenitor cells with PDGF-AA (a specific PDGFR α ligand) or AB or BB (which bind
14 both PDGFR α and β) significantly increased their proliferation by 2-fold (Fig.5E). These data
15 demonstrate that PDGFR α activation directly controls the proliferation of PW1⁺/PDGFR α ⁺/c-kit⁻
16 progenitor cells.

17



1

2 **Figure 5. PDGFR α regulates PW1⁺ progenitor cell proliferation *in vitro*.** A, Effect of PDGFR α inhibition
 3 on PW1⁺ progenitor cell proliferation. Pulmonary PW1⁺ progenitor cells were sorted by FACS,
 4 incubated for five days with IgG control or APA5 and proliferative cells were then labeled with anti-
 5 Ki67 antibody (red). **Left**) Representative immunofluorescence images and **Right**) Quantification of
 6 PW1⁺ progenitor cell proliferation as a ratio of Ki67⁺ cells over total cells reported to control (n=6). **B**,
 7 Effect of PDGFR α inhibition on PW1⁺ progenitor cell differentiation into SMC. FACS-sorted pulmonary

1 PW1⁺ progenitor cells were incubated for five days with IgG control or APA5 and then labeled with
2 anti- α -SMA antibody (red). **Left**) Representative immunofluorescence images and **right**) Quantification
3 of PW1⁺ progenitor cell differentiation as a ratio of α -SMA⁺ cells over total cells reported to control
4 (n=6). **C**, Effect of PDGFR α inhibition on PW1⁺ progenitor cell apoptosis. FACS-sorted pulmonary PW1⁺
5 progenitor cells were incubated for five days with IgG control or APA5 and then labeled following the
6 TUNEL method. The ratio of TUNEL⁺ cells over total cells was determined and reported to control (n=4).
7 **D**, Effect of PDGFR α activation on PW1⁺ progenitor cell differentiation into SMC. FACS-sorted
8 pulmonary PW1⁺ progenitor cells were incubated for five days with IgG control or PDGF-AA, -AB, or -
9 BB (20 ng/mL) and labeled with anti- α -SMA antibody (red). The ratio of α -SMA⁺ cells over total cells
10 was reported to control (n=5). **E**, Effect of PDGFR α activation on PW1⁺ progenitor cell proliferation.
11 FACS-sorted pulmonary PW1⁺ progenitor cells were incubated for five days with either vehicle, PDGF-
12 AA, PDGF-AB, or PDGF-BB (20 ng/mL) and then labeled with anti-Ki67 antibody (red). **Left**)
13 Representative immunofluorescence images and **Right**) quantification of PW1⁺ progenitor cell
14 proliferation as a ratio of Ki67⁺ cells over total cells reported to control (n=4-5). Values are mean \pm SD,
15 *p<0.05, ns=not significant (1-tailed Wilcoxon signed-ranked test).

16

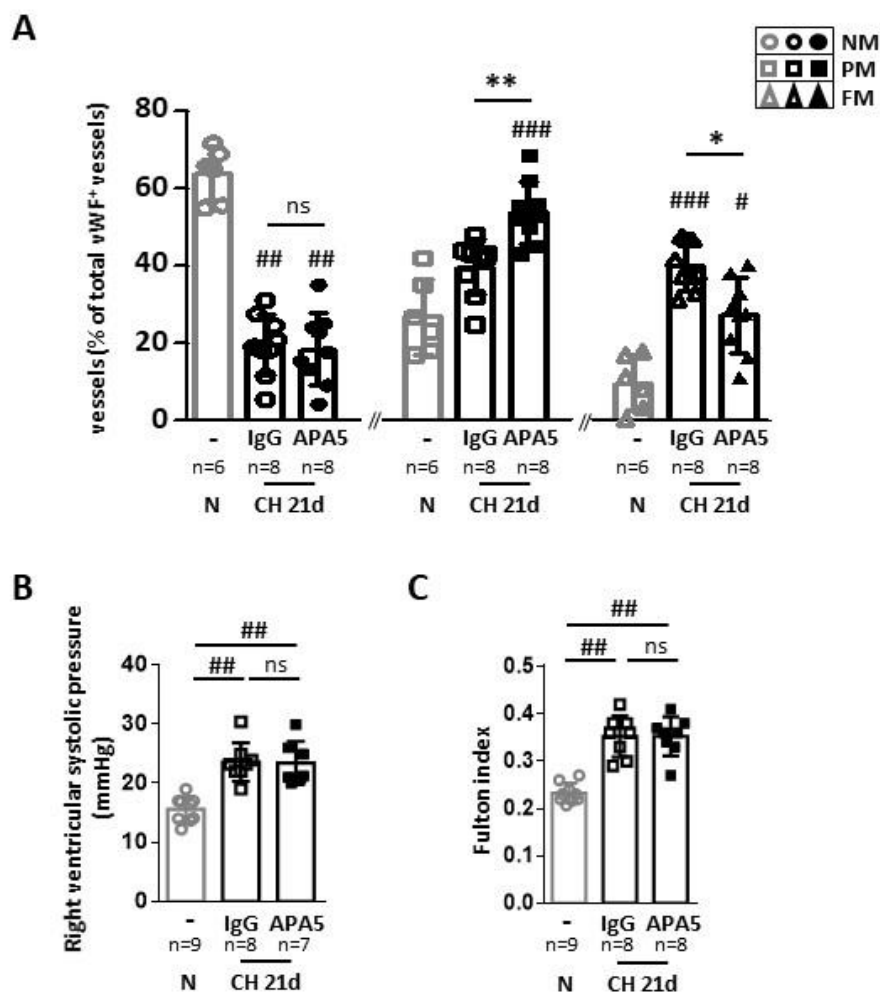
17 **PDGFR α inhibition limits vascular remodeling after long-term chronic hypoxia but does not reduce**
18 **RVSP while PDGFR α activation induces PH.**

19 Our *in vitro* and *in vivo* data show that the PDGFR α pathway controls pulmonary neomuscularization
20 via regulating PW1⁺/PDGFR α ⁺ progenitor cells proliferation. We therefore investigated the long-term
21 effects of PDGFR α inhibition or activation on PH development.

22 PDGFR α was inhibited during CH by treating mice (7 males and 1 female/group) with APA5 blocking
23 antibody. Chronic hypoxia was confirmed by increased blood hemoglobin concentration
24 (supplemental Fig. IV). After 21 days of CH, PDGFR α inhibition significantly reduced the number of fully
25 muscularized vessels (27.2 \pm 9.7% with APA5 treatment vs 39.8 \pm 6.2% with IgG treatment, p<0.05) and

1 increased the number of partially muscularized vessels ($53.8 \pm 8\%$ with APA5 treatment vs $39.7 \pm 7.1\%$
 2 with IgG treatment, $p < 0.05$) as compared to control IgG-treated mice (Fig. 6A). However, APA5
 3 treatment did not significantly modify RVSP and Fulton index (Fig. 6B-C) as compared to control IgG-
 4 treated mice and they were both increased as compared to normoxic mice. This result show that
 5 PDGFR α inhibition for 21 days reduces CH-induced pulmonary vessel muscularization but does not
 6 prevent the RVSP increase and the right ventricular hypertrophy.

Figure 6

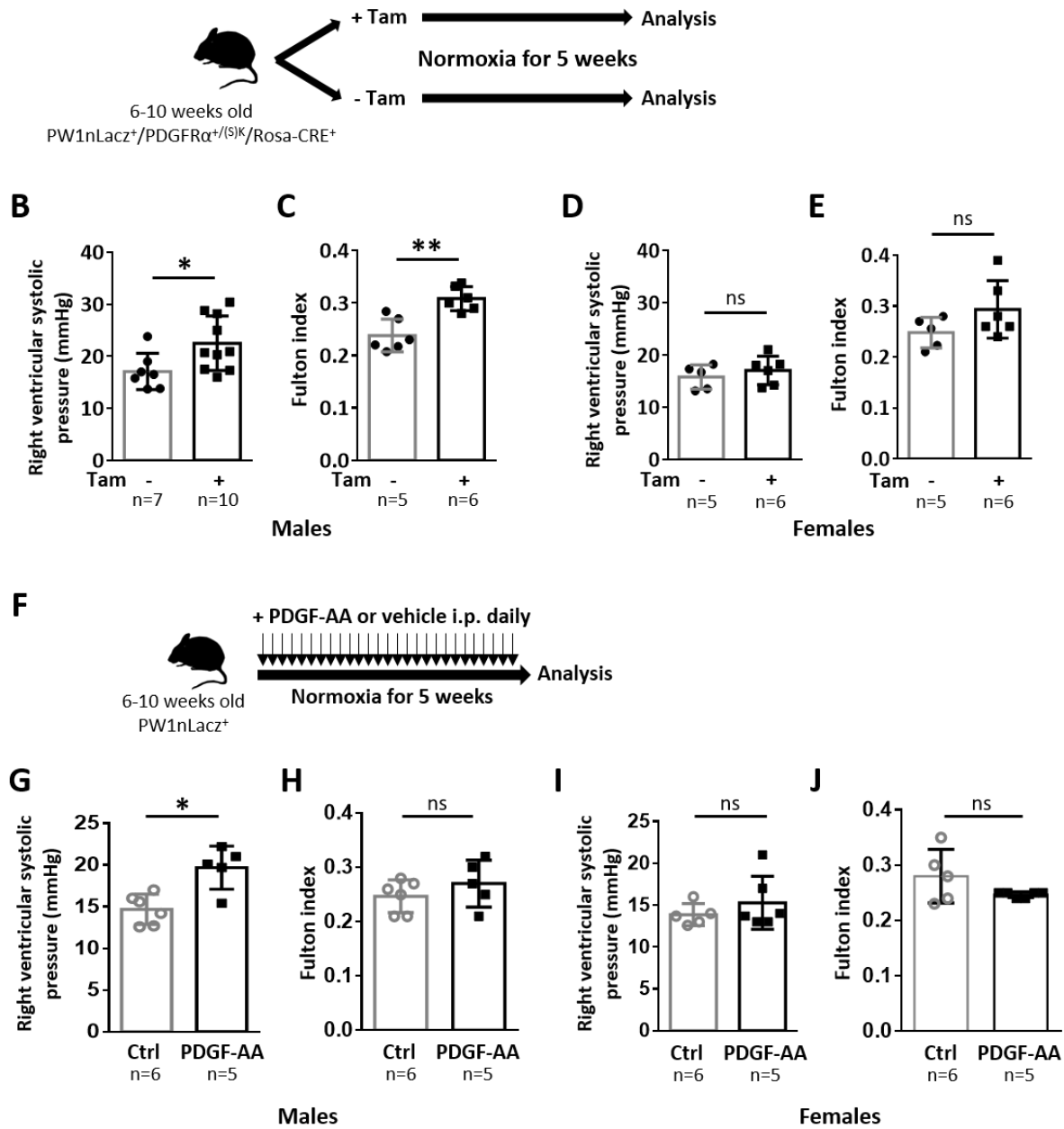


7
 8 **Figure 6. PDGFR α inhibition with APA5 limits vascular neomuscularization but does not prevent**
 9 **chronic hypoxia (CH)-induced PH.** PW1^{nLacZ} mice were maintained untreated under normoxia (N) or
 10 under CH for 21 days and treated with control IgG (IgG) or PDGFR α blocking antibody APA5 (APA5). **A,**
 11 Pulmonary vessel muscularization was determined by immunofluorescence in lungs of control

1 untreated normoxic mice (n=6) or of IgG- and APA5-treated mice after 21 days of chronic hypoxia (CH
2 21d, n=9) using anti- α -smooth muscle actin (α -SMA) and anti-von Willebrand factor (vWF) antibodies.
3 For each animal, >100 vWF⁺ vessels (<100 μ m) were analyzed for muscularization (α -SMA⁺). Vessels
4 were identified as non-muscularized (NM), partially-muscularized (PM) or fully-muscularized (FM). **B**,
5 Right ventricular systolic pressure (RVSP, mmHg) was measured in untreated normoxic mice (n=9) and
6 in IgG- and APA5-treated mice after 21 days of CH (CH 21d, n=7-8). **C**, Right ventricle hypertrophy was
7 measured as the Fulton index in normoxic untreated mice (n=9) and in IgG- and APA5-treated mice in
8 CH (CH 21d, n=8). Values are mean \pm SD, *p<0.05, **p<0.01, ns=not significant for APA5 vs IgG within
9 CH 21d group; #p<0.05, ##p<0.01 vs normoxic, ns=not significant (Kruskal-Wallis and Dunn).

10
11 The effect of PDGFR α activation was first studied in tamoxifen-induced PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/SJK}/Rosa-
12 CRE^{ERT2} mice (Fig. 7A). After 5 weeks of PDGFR α constitutive activation, male mice displayed a
13 significant increase in RVSP (22.5 \pm 5.2 mmHg, Fig. 7B) and a right ventricular hypertrophy (Fulton index
14 of 0.31 \pm 0.02, Fig. 7C) as compared to non-induced littermates (respectively 17.1 \pm 3.5 mmHg, Fig. 7B
15 and 0.24 \pm 0.03, Fig. 7C). Interestingly, female mice did not develop PH at this time point with no
16 significant increase in RVSP and no right ventricular hypertrophy (Fig. 7D-E), although they presented
17 an increased muscularization 15 days after tamoxifen induction similar to males (data not shown).
18 Total weight, heart rate and left ventricle weight were not modified in tamoxifen-induced mice
19 (supplemental Fig. V). These results suggest that PDGFR α activation first triggers vascular remodeling
20 and eventually PH. To further confirm that PDGFR α activation induces PH, we treated male and female
21 mice with PDGF-AA (150ng/mouse daily) for 5 weeks (Fig. 7F). This treatment induced in male mice
22 (Fig. 7G) an increased RVSP (19.7 \pm 2.6 mmHg vs 14.7 \pm 1.8 mmHg in the control group) which was slightly
23 lower than the RVSP observed after a similar duration of PDGFR α constitutive activation (22.5 \pm 5.2
24 mmHg, Fig. 7B). PDGF-AA treatment for 5 weeks did not lead to right ventricular hypertrophy (Fig. 7H).
25 Female mice RVSP or Fulton index were not significantly modified by the PDGF-AA treatment as in the
26 model with PDGFR α constitutive activation (Fig. 7I-J).

1 Altogether, these results establish that PDGFR α constitutive activation is a novel model of mouse mild
 2 pulmonary hypertension in male recapitulating the pulmonary vascular alterations observed during
 3 chronic hypoxia.



4
 5 **Figure 7. Constitutive PDGFR α activation leads to pulmonary hypertension.** **A**, Timeline of Tamoxifen
 6 (Tam) induction and analysis of PW1^{nLacZ}/PDGFR $\alpha^{+/S1K}$ /Rosa-CRE⁺ mice. **B to E**, Analysis of mice five
 7 weeks after tamoxifen induction. **B and D**, Right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured in
 8 control or tamoxifen-treated **B**, males (n=7-10) and **D**, females (n=5-6). **C and E**, RV hypertrophy was
 9 determined using the Fulton index (RV weight to left ventricular (LV) + septum weight ratio) in control

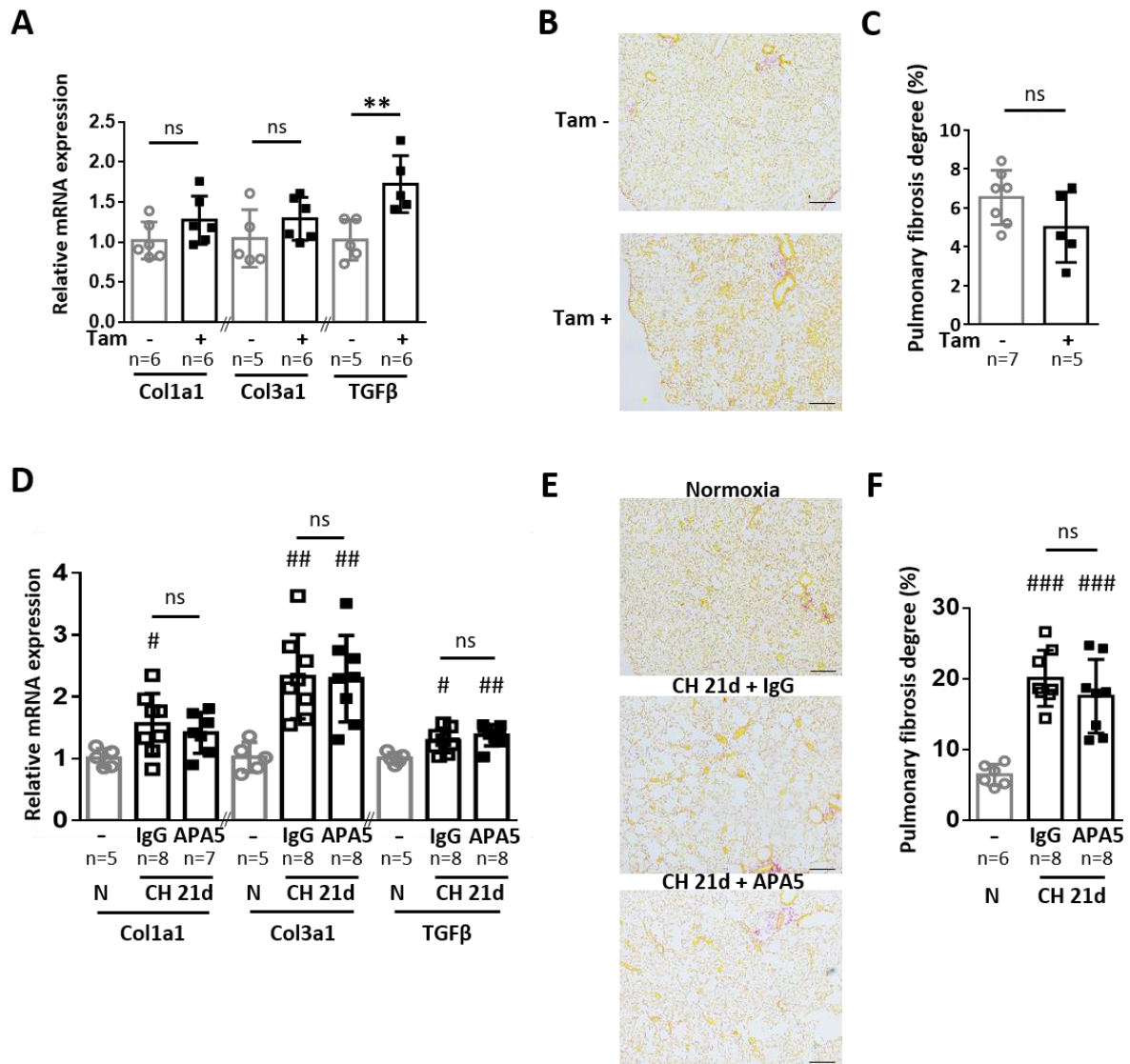
1 or tamoxifen-treated **C**, males (n=5-6) and **E**, females (n=5-6). **F**, Timeline of PDGF-AA treatment and
2 analysis of PW1nLacZ⁺ mice. **G to J**, Analysis of mice after five weeks of PDGF-AA treatment. **G and I**,
3 Right ventricular systolic pressure (RVSP) was measured in control or PDGF-AA-treated **G**, males (n=5-
4 6) and **I**, females (n=5-6). **H and J**, RV hypertrophy was determined using the Fulton index in control or
5 PDGF-AA-treated **H**, males (n=5-6) and **J**, females (n=5-6). Values are mean±SD, *p<0.05, **p<0.01,
6 ns=not significant (2-tailed Mann-Whitney).

7

8 **Lung fibrosis is not induced by PDGFR α activation nor reduced by PDGFR α inhibition during CH.**

9 Long-term PDGFR α constitutive activation was reported to induce fibrosis in multiple organs including
10 the lung¹⁹. We therefore sought to determine whether lung fibrosis was induced by PDGFR α activation
11 in our model or was inhibited by blocking PDGFR α during CH. We measured mRNA levels of fibrosis
12 factors (collagen 1 and 3 and TGF β) and we assessed changes in collagen levels by quantifying
13 picosirius red staining in male PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/S^K}/Rosa-CRE^{ERT2} mice. After 5 weeks of PDGFR α
14 constitutive activation, lung collagen 1a1 and 3a1 mRNA levels were not modified but we observed an
15 increase in TGF β mRNA expression (Fig. 8A). Histological analyses and quantification of Picosirius red-
16 stained lung sections did not indicate any significant difference of fibrosis area between tamoxifen-
17 induced mice and non-induced littermates (Fig. 8B-C and supplemental Fig. VI). They showed however
18 areas of thickened alveolar walls in tamoxifen-induced mice that indicate local tissue alterations
19 (supplemental Fig. VI). PDGFR α constitutive activation for 5-6 weeks was therefore not sufficient to
20 elicit pulmonary fibrosis at this stage. We also studied the effect of PDGFR α inhibition by APA5 blocking
21 antibody on late CH-induced pulmonary fibrosis^{19,20} (7 males and 1 female/group). As expected, CH
22 significantly increased TGF β and collagen 3a1 and 1a1 mRNA expression (Fig. 8D). No difference was
23 observed between control IgG and APA5-treated mice exposed to CH. Histological analyses and
24 quantification of fibrosis areas by Picosirius red staining (Fig. 8E-F and supplemental Fig. VII)
25 confirmed a similar CH-induced increase in collagen-rich areas in both control IgG and APA5 treated
26 mice (respectively 20.1±4% and 17.5±5.1%) as compared with control normoxic mice (6.3±1.7%,

1 p<0.05). Taken together, our results concerning PDGFR α inhibition under chronic hypoxia or
 2 constitutive PDGFR α activation under normoxia demonstrate that the PDGFR α signalling is without
 3 impact on lung fibrosis in our models.



4
 5 **Figure 8. Lung fibrosis is not induced by PDGFR α activation and is not reduced by PDGFR α inhibition.**
 6 **A to C**, Fibrosis evaluation in non-induced (n=6-7) or tamoxifen-induced PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/((S)K)}/Rosa-
 7 CRE⁺ mice five weeks after tamoxifen induction (n=5-6). **D to F**, Fibrosis evaluation in untreated mice
 8 under normoxia (n=5) or IgG and APA5-treated mice after 21 days of CH (n=7-8). **A and D**, RT-qPCR
 9 measurements of mRNA expression for collagen 1a1, collagen 3a1, and TGFβ in lungs. **B and E**,
 10 Representative images of picosirius red staining for collagen (red) in pulmonary parenchyma. Larger

1 images are displayed in supplemental Figures X and XI. **C and F**, Quantification of the picrosirius red-
2 stained area as a measure of fibrosis using HistoLab[®] analysis. Fibrosis area (% of total area) was
3 determined as the mean fibrotic area of four large lung sections for each animal. Values are mean±SD,
4 *P<0.05, **P<0.01 Tam+ vs Tam- group, 2-tailed Mann-Whitney; #p<0.05, ##p<0.01 vs normoxic,
5 Kruskal-Wallis and Dunn. ns=not significant for APA5 vs IgG within CH 21d group in D and F. Scale bar
6 200 μm.

7

8 **DISCUSSION**

9 Understanding the molecular mechanisms leading to the production of new SMC that contribute to
10 pulmonary vascular remodeling and PAH is crucial to provide therapeutic targets for this life threatening
11 pulmonary vascular diseases. In this study, we describe for the first time the precise role of PDGFR α in
12 the progenitor cells recruitment, in the neomuscularization process and in the development of PH.
13 Using a novel genetic model and a specific blocking antibody, our results provide evidences that
14 PDGFR α is a pivotal player in regulating neomuscularization which participates in PH development by
15 inducing CD34⁺/PDGFR α ⁺/PW1⁺ vascular progenitor cells proliferation and their differentiation in SMC.
16 Importantly, our data suggest that this pathway intervenes during vascular remodeling of human iPAH
17 patients.

18 Pulmonary hypertension development and its related vascular remodeling have been associated with
19 an activation of the PDGF pathway in experimental PH and in human^{5,9}. However, studies have focused
20 on the role of PDGFR β signaling in experimental PH models, in particular during CH^{10,11}, and the role
21 of the PDGFR α pathway was never directly investigated. In the present study, using several
22 experimental models, we found that this pathway participates in pulmonary vascular remodeling
23 induction. While PDGFR β activation was shown to stimulate pulmonary pericyte and SMC proliferation,
24 our data demonstrate that PDGFR α induces pulmonary vascular progenitor cells recruitment and
25 expansion leading to their differentiation into vascular SMC in the adult lung. Related observations

1 have been reported during pulmonary development where PDGFR α signaling is necessary to form
2 alveolar α -SMA⁺ SMC (also known as alveolar myofibroblasts) during secondary septation^{17,21}. Indeed
3 PDGFR α ⁺ cells express α -SMA shortly after birth but lose this expression during post-natal
4 development^{22,23}. Our results (herein and in³) are consistent with these observations and are the first
5 to our knowledge to link PDGFR α activation of progenitor cells and pulmonary vascular SMC
6 production in adults.

7 Multiple cellular sources provide new SMC during PH development. CH-activated SMC have been
8 shown to proliferate and lead to muscularization of downstream arterioles². Pulmonary pericytes are
9 also a source of peri-endothelial α -SMA⁺ cells in newly muscularized vessels^{1,4}. We demonstrate here
10 that PDGFR α inhibition reduces early CH-induced neomuscularization and limits muscularization in late
11 CH. These results and our previous data³ argue for an important role played by PDGFR α ⁺/PW1⁺
12 progenitor cells during PH remodeling in experimental models and in iPAH patients. Using a novel
13 mouse model of inducible constitutive PDGFR α activation also allowing for PW1⁺ progenitor cell
14 detection and tracing, we further establish a major role for PDGFR α signaling in modulating vascular
15 progenitor cells recruitment to form new SMC. Interestingly, PDGFR β constitutive activation per se did
16 not induce neomuscularization but slightly increased the number of fully muscularized vessels after CH
17¹¹. These contrasted results suggest that PDGFR β -expressing SMC and pericytes, which have been
18 shown to participate in the vascular remodeling process during CH^{1,2,24}, may first need to be activated
19 by other pathways to become responsive to PDGFR β activation. Strikingly, imatinib and APA5 only
20 partially inhibited early CH-induced neomuscularization suggesting that pathways other than PDGF
21 participate in regulating production of new SMC. Indeed, previous studies showed that factors such as
22 IL-6 and FGF-2 participate in the PH-associated vascular remodeling process^{1,25}. They may
23 predominate when PDGFR α ⁺/PW1⁺ progenitor cells recruitment is inhibited.

24 Our study establishes PDGFR α constitutive activation as a novel PH experimental model independent
25 of CH. The pathological mechanisms leading to increased pulmonary pressure in this model are not

1 clearly elucidated. The vessel muscularization might participate in the disease development by
2 inducing arteriolar stiffening and increasing the vascular resistance leading to altered SMC or EC
3 function. This result underlines the major role of PDGFR α in controlling pulmonary vascular structure
4 and suggests that the beneficial effects observed using imatinib in PH experimental models are partly
5 dependent on PDGFR α activity inhibition⁹. We observed that, in this transgenic model, progenitor cells
6 differentiate into new SMC. This observation contrasts with our *in vitro* results showing that PDGFR α
7 activation alone does not induce progenitor cells differentiation. One hypothesis is that other factors
8 are present *in vivo* in the local environment of these pulmonary progenitor cells that are lacking in our
9 *in vitro* system. SDF-1 could be one of these factors as we already established that *in vivo* blocking
10 CXCR4, the SDF-1 receptor, inhibits their differentiation into vascular SMC³. Female mice appear to be
11 protected against PH development induced by PDGFR α activation. The mechanisms leading to this sex
12 difference are unclear but may involve estrogen-dependent pathways as clinical and experimental data
13 have established that estrogens are important modulators of pulmonary vascular function²⁶.

14 PDGFR α activation has been associated with fibrosis development and mice with a constitutively
15 activated form of this receptor ultimately develop multiple organs fibrosis¹⁹. We did not detect
16 increased collagen1 and 3 production or collagen deposition in mouse lungs after 5 weeks of PDGFR α
17 constitutive activation. Indeed, studies using this genetic model report fibrosis after 3 to 6 months^{13,19}.
18 Thus, in this model of constitutive PDGFR α activation, PH is induced much earlier than fibrosis
19 development indicating that fibrotic remodeling is not initially involved in the pulmonary blood
20 pressure rise and pulmonary vascular muscularization. In addition, PDGFR α inhibition using APA5
21 blocking antibody did not prevent long term CH-induced fibrosis indicating that PDGFR α does not
22 regulate CH-associated fibrosis. Hence, fibrocytes have been shown to contribute to the CH-induced
23 fibrosis²⁷ and pericyte-like ABCG2⁺ mesenchymal stem cells (PDGFR α ⁻) could also participate in the
24 fibrotic remodeling due to their myofibroblastic capacities²⁸. Our *in vitro* results suggest that PDGFR α
25 activation leads to proliferation of PDGFR α ⁺ progenitor cells whose fate is then controlled by other
26 factors depending on the pathophysiological context. During early CH, these factors orientate PDGFR α ⁺

1 progenitor cells towards differentiation into vascular SMC and our data argue against a PDGFR α -
2 dependent fibroblastic fate during late CH. Other factors may induce differentiation towards
3 fibroblasts in different experimental conditions, such as aging ¹⁹. The involvement of the PDGFR α
4 pathway and of PDGFR α ⁺ cells in the context of fibrosis is controversial. Several studies suggest that
5 PDGFR α signaling is important for fibrosis development in various organs including the lung ^{13,16,19,23,29}.
6 However, Kishi et al. recently showed that specific PDGFR α inhibition does not reduce bleomycin-
7 induced fibrosis ³⁰. These results together with our data suggest that the relationship between
8 PDGFR α ⁺ cells, the PDGFR α pathway and fibrosis is more complex than a simple PDGFR α activation of
9 PDGFR α ⁺ fibroblast precursors and may involve other factors such as TGF β ³¹. In line with these results,
10 although PDGFR α is often considered as a fibroblast marker, growing evidence shows now that part of
11 PDGFR α ⁺ cells are progenitor or stem cells ¹². Our result uphold that the pulmonary PDGFR α ⁺
12 progenitor cell population contains cells with a SMC differentiation potential together with cells able
13 to differentiate in alveolar myofibroblasts and peribronchiolar SMC as observed during developmental
14 alveolar septation ³² or pneumectomy-induced re-alveolarisation ³³. Indeed, the diversity of PDGFR α ⁺
15 cells has been illustrated by single cell transcriptome analysis ²³.

16 We observed that PDGFR α activation by PDGF-AA increases vascular progenitor cell proliferation but
17 does not induce their differentiation into SMC, indicating that other pathways could be involved. This
18 is in agreement with previous studies showing that PDGFR α or PDGF-AA regulate stem/progenitor cell
19 renewal or proliferation ^{15,34} and can also maintain precursors in an immature state ^{35,36}. On the other
20 hand, other groups have published that PDGFR α is important for stem/progenitor cells differentiation
21 in particular towards α -SMA expressing cells or fibroblasts ^{13,37-39}. These opposite roles of PDGFR α
22 might originate from the type of progenitor/stem cells used. We previously showed that
23 CD34⁺/PDGFR α ⁺/PW1⁺ differentiate towards terminally differentiated Myh11⁺ SMC ³, which might not
24 be the case for the stem cells used in other studies. It is also possible that our *in vitro* experiments lack
25 some factors that in combination with PDGFR α could induce differentiation of these cells. For example,

1 primitive endoderm cells proliferation seems to depend both on FGFR1 and PDGFR α when cell
2 specification seems to be only FGFR1-dependent ⁴⁰.

3 In keeping with our previous study ³, PW1⁺ cells in human lungs were found clustered and mostly
4 perivascular whereas we observed increased number of PW1-expressing cells in remodeled arteries of
5 iPAH patients. A large majority of these cells are PDGFR α ⁺ confirming the data obtained in mouse. In
6 addition, we observed a large increase of the PW1⁺/PDGFR α ⁺/ α -SMA⁺ cell number in the neointima of
7 iPAH patients remodeled arteries suggesting that there is an increased differentiation of the
8 PW1⁺/PDGFR α ⁺ progenitor cells participating in vascular remodeling. In addition, a large number of
9 neointimal cells of remodeled arteries co-express PDGFR α and α -SMA suggesting that they might be
10 derived from PDGFR α ⁺ progenitor cells. The increased expression of PDGF and PDGFR α has been
11 previously documented in iPAH patients pulmonary vessels and strengthens our data ⁵. Part of the
12 beneficial effects observed in patients treated by imatinib could therefore be due to the inhibition of
13 the PDGFR α pathway ⁴¹. However, as we observed in CH mice, blocking PDGFR α is not sufficient to
14 reduce pulmonary pressure and therefore our data suggest that a multitargeted therapeutic strategy
15 associating PDGFR α inhibition to current vasodilating therapies may provide beneficial effects by
16 inhibiting progenitor cells recruitment and vessel muscularization.

17 In conclusion, our study highlights PDGFR α as an essential regulator of lung vessel muscularization in
18 mouse via the recruitment of vascular progenitor cells and opens new avenues for pulmonary
19 hypertension medication.

20

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pr Elie Fadel, Pr Olaf Mercier and pathologists from the Department of Pathology at Marie Lannelongue hospital for their expertise and support. We thank Nilay Akkoyunlu, Marta de Almeida and Chloé Azevedo for technical help, Pr Stephane Hatem and Dr Nadine Suffee-Mosbah for helpful discussions.

SOURCES OF FUNDING

This work was supported by Institute of Cardiometabolism and Nutrition (ANR-10-IAHU-05). D. Sassoon, G. Marazzi and R.P. Harvey were supported by a grant from the Fondation Leducq (grant 13CVD01; CardioStemNet project). S. Nadaud and C. Guignabert were supported by a grant from the Agence Nationale de la Recherche (ANR-15-CE14-0020). M. Humbert and C. Guignabert also acknowledge support from the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) (DEQ20150331712), the Département Hospitalo-Universitaire (DHU) Thorax Innovation (TORINO), the LabEx LERMIT (ANR-10-LABX-0033), and the French PAH patient association (HTAP France). J. Solinc were supported by the French Ministry of Research and Education. F. Dierick was supported by the French Ministry of Research and Education and by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) project grant (to the Stephanie Lehoux laboratory). R.P. Harvey also acknowledges support from the National Health and Medical Research Council (NHMRC) of Australia (APP1118576; 1074386), the Australian Research Council Special Initiative in Stem Cell Science (SR110001002) and the New South Wales Government Department of Health.

DISCLOSURES

L.T., R.R. and C.G. have no conflict of interest to disclose. In the past 3 years, M.H. reports grants, personal fees, and nonfinancial support from Actelion, Bayer, GlaxoSmithKline, and MSD, outside of the submitted work. M.H. is a member of the Scientific Advisory Board of Morphogen-IX.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Expanded Materials and Methods with supplemental Tables I and II

Supplemental Table III

Supplemental Figures I-VII

REFERENCES

1. Ricard N, Tu L, Le Hiress M, Huertas A, Phan C, Thuillet R, Sattler C, Fadel E, Seferian A, Montani D, Dorfmueller P, Humbert M, Guignabert C. Increased pericyte coverage mediated by endothelial-derived fibroblast growth factor-2 and interleukin-6 is a source of smooth muscle-like cells in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2014;129:1586–1597.
2. Sheikh AQ, Misra A, Rosas IO, Adams RH, Greif DM. Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2015;7:308ra159.
3. Dierick F, Héry T, Hoareau-Coudert B, Mougnot N, Monceau V, Claude C, Crisan M, Besson V, Dorfmueller P, Marodon G, Fadel E, Humbert M, Yaniz-Galende E, Hulot J-S, Marazzi G, Sassoon D, Soubrier F, Nadaud S. Resident PW1+ Progenitor Cells Participate in Vascular Remodeling During Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2016;118:822–833.
4. Bordenave J, Tu L, Berrebeh N, Thuillet R, Cumont A, Le Vely B, Fadel E, Nadaud S, Savale L, Humbert M, Huertas A, Guignabert C. Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Pericytes to the Blood Vessel Remodeling in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020;ATVBAHA119313715.
5. Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:81–8.
6. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 1998;11:554–559.
7. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J*. 2019;53.
8. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008;22:1276–1312.
9. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005;115:2811–21.
10. Ten Freyhaus H, Berghausen EM, Janssen W, Leuchs M, Zierden M, Murmann K, Klinke A, Vantler M, Caglayan E, Kramer T, Baldus S, Schermuly RT, Tallquist MD, Rosenkranz S. Genetic Ablation of PDGF-Dependent Signaling Pathways Abolishes Vascular Remodeling and Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;
11. Dahal BK, Heuchel R, Pullamsetti SS, Wilhelm J, Ghofrani HA, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Hypoxic pulmonary hypertension in mice with constitutively active platelet-derived growth factor receptor- β . *Pulm Circ*. 2011;1:259–268.
12. Farahani RM, Xaymardan M. Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology. *Stem Cells Int*. 2015;2015:362753.

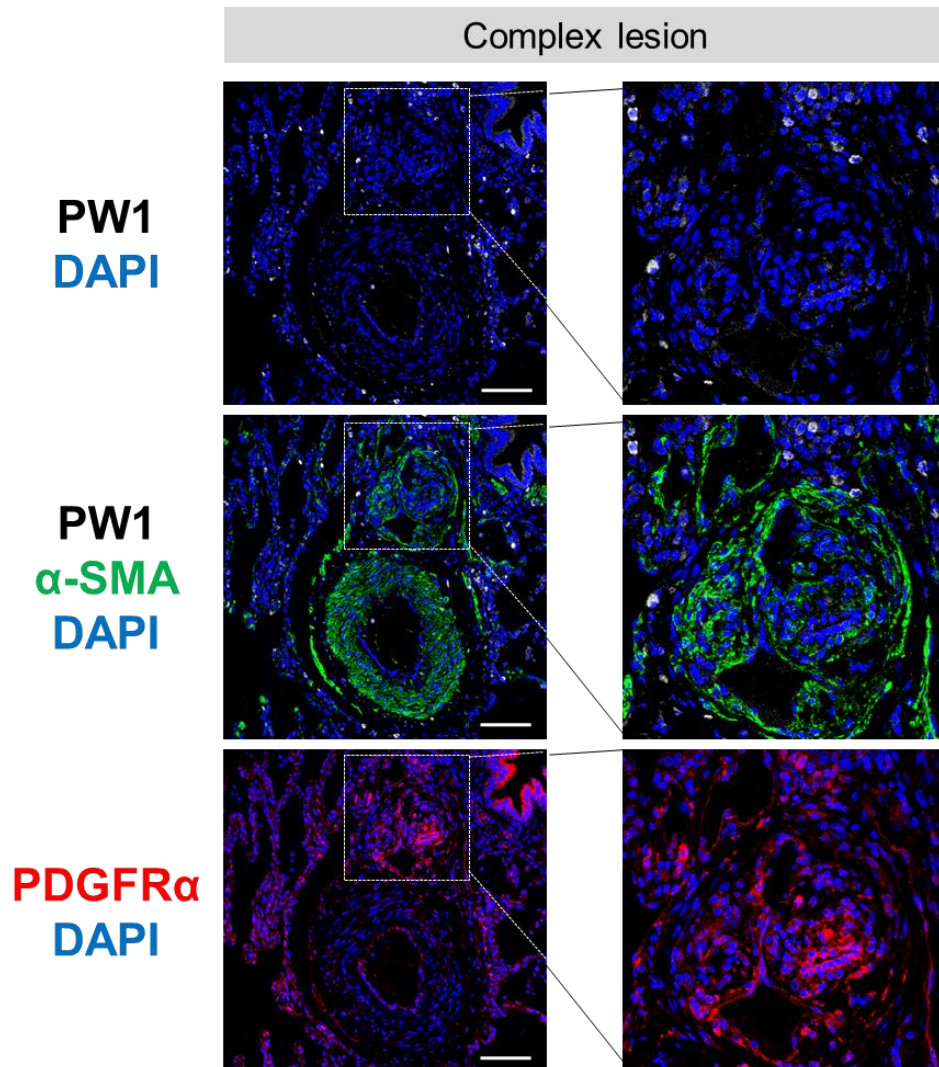
13. Iwayama T, Steele C, Yao L, Dozmorov MG, Karamichos D, Wren JD, Olson LE. PDGFR α signaling drives adipose tissue fibrosis by targeting progenitor cell plasticity. *Genes Dev.* 2015;29:1106–1119.
14. Calver AR, Hall AC, Yu WP, Walsh FS, Heath JK, Betsholtz C, Richardson WD. Oligodendrocyte population dynamics and the role of PDGF in vivo. *Neuron.* 1998;20:869–882.
15. Rivera-Gonzalez GC, Shook BA, Andrae J, Holtrup B, Bollag K, Betsholtz C, Rodeheffer MS, Horsley V. Skin Adipocyte Stem Cell Self-Renewal Is Regulated by a PDGFA/AKT-Signaling Axis. *Cell Stem Cell.* 2016;19:738–751.
16. Saito Y, Chikenji T, Ozasa Y, Fujimiya M, Yamashita T, Gingery A, Iba K. PDGFR Signaling Mediates Hyperproliferation and Fibrotic Responses of Subsynovial Connective Tissue Cells in Idiopathic Carpal Tunnel Syndrome. *Sci Rep.* 2017;7:16192.
17. Gouveia L, Betsholtz C, Andrae J. PDGF-A signaling is required for secondary alveolar septation and controls epithelial proliferation in the developing lung. *Development.* 2018;145.
18. Besson V, Smeriglio P, Wegener A, Relaix F, Nait Oumesmar B, Sassoon DA, Marazzi G. PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:11470–5.
19. Olson LE, Soriano P. Increased PDGFR α activation disrupts connective tissue development and drives systemic fibrosis. *Dev Cell.* 2009;16:303–13.
20. Liao C, Akazawa H, Tamagawa M, Ito K, Yasuda N, Kudo Y, Yamamoto R, Ozasa Y, Fujimoto M, Wang P, Nakauchi H, Nakaya H, Komuro I. Cardiac mast cells cause atrial fibrillation through PDGF-A-mediated fibrosis in pressure-overloaded mouse hearts. *J Clin Invest.* 2010;120:242–253.
21. Ntokou A, Klein F, Dontireddy D, Becker S, Bellusci S, Richardson WD, Szibor M, Braun T, Morty RE, Seeger W, Voswinckel R, Ahlbrecht K. Characterization of the platelet-derived growth factor receptor- α -positive cell lineage during murine late lung development. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015;309:L942-958.
22. Branchfield K, Li R, Lungova V, Verheyden JM, McCulley D, Sun X. A three-dimensional study of alveologenesis in mouse lung. *Dev Biol.* 2016;409:429–441.
23. Li R, Bernau K, Sandbo N, Gu J, Preissl S, Sun X. Pdgfra marks a cellular lineage with distinct contributions to myofibroblasts in lung maturation and injury response. *Elife.* 2018;7.
24. Chow K, Fessel JP, Kaorihida-Stansbury, Schmidt EP, Gaskill C, Alvarez D, Graham B, Harrison DG, Wagner DH Jr, Nozik-Grayck E, West JD, Klemm DJ, Majka SM. Dysfunctional resident lung mesenchymal stem cells contribute to pulmonary microvascular remodeling. *Pulm Circ.* 2013;3:31–49.
25. Izikki M, Guignabert C, Fadel E, Humbert M, Tu L, Zadigue P, Dartevielle P, Simonneau G, Adnot S, Maitre B, Raffestin B, Eddahibi S. Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest.* 2009;119:512–523.
26. Tofovic SP, Jackson EK. Estradiol Metabolism: Crossroads in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci.* 2019;21.
27. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol.* 2006;168:659–69.
28. Marriott S, Baskir RS, Gaskill C, Menon S, Carrier EJ, Williams J, Talati M, Helm K, Alford CE, Kropski JA, Loyd J, Wheeler L, Johnson J, Austin E, Nozik-Grayck E, Meyrick B, West JD, Klemm DJ, Majka SM. ABCG2^{pos} lung mesenchymal stem cells are a novel pericyte subpopulation that contributes to fibrotic remodeling. *American Journal of Physiology - Cell Physiology.* 2014;307:C684–C698.
29. Mueller AA, van Velthoven CT, Fukumoto KD, Cheung TH, Rando TA. Intronic polyadenylation of PDGFR α in resident stem cells attenuates muscle fibrosis. *Nature.* 2016;540:276–279.
30. Kishi M, Aono Y, Sato S, Koyama K, Azuma M, Abe S, Kawano H, Kishi J, Toyoda Y, Okazaki H, Ogawa H, Uehara H, Nishioka Y. Blockade of platelet-derived growth factor receptor- β , not receptor- α ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *PLoS ONE.* 2018;13:e0209786.
31. Heinzelmann K, Noskovičová N, Merl-Pham J, Preissler G, Winter H, Lindner M, Hatz R, Hauck SM, Behr J, Eickelberg O. Surface proteome analysis identifies platelet derived growth factor receptor-alpha as a critical mediator of transforming growth factor-beta-induced collagen secretion. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016;74:44–59.

32. Green J, Endale M, Auer H, Perl A-KT. Diversity of Interstitial Lung Fibroblasts Is Regulated by Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Kinase Activity. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;54:532–545.
33. Chen L, Acciani T, Le Cras T, Lutzko C, Perl A-KT. Dynamic regulation of platelet-derived growth factor receptor α expression in alveolar fibroblasts during realveolarization. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012;47:517–527.
34. Kikuchi A, Pradhan-Sundd T, Singh S, Nagarajan S, Loizos N, Monga SP. Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Contributes to Human Hepatic Stellate Cell Proliferation and Migration. *Am J Pathol*. 2017;187:2273–2287.
35. Zhu Q, Zhao X, Zheng K, Li H, Huang H, Zhang Z, Mastracci T, Wegner M, Chen Y, Sussel L, Qiu M. Genetic evidence that *Nkx2.2* and *Pdgfra* are major determinants of the timing of oligodendrocyte differentiation in the developing CNS. *Development*. 2014;141:548–555.
36. Baroti T, Zimmermann Y, Schillinger A, Liu L, Lommes P, Wegner M, Stolt CC. Transcription factors *Sox5* and *Sox6* exert direct and indirect influences on oligodendroglial migration in spinal cord and forebrain. *Glia*. 2016;64:122–138.
37. Ball SG, Shuttleworth CA, Kielty CM. Platelet-derived growth factor receptor-alpha is a key determinant of smooth muscle alpha-actin filaments in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39:379–391.
38. Kim B-J, Kim Y-H, Lee Y-A, Jung S-E, Hong YH, Lee E-J, Kim B-G, Hwang S, Do JT, Pang M-G, Ryu B-Y. Platelet-derived growth factor receptor-alpha positive cardiac progenitor cells derived from multipotent germline stem cells are capable of cardiomyogenesis in vitro and in vivo. *Oncotarget*. 2017;8:29643–29656.
39. Xu T, Liu N, Shao Y, Huang Y, Zhu D. MiR-218 regulated cardiomyocyte differentiation and migration in mouse embryonic stem cells by targeting PDGFR α . *J Cell Biochem*. 2019;120:4355–4365.
40. Molotkov A, Soriano P. Distinct mechanisms for PDGF and FGF signaling in primitive endoderm development. *Dev Biol*. 2018;442:155–161.
41. Frost AE, Barst RJ, Hoepfer MM, Chang H-J, Frantz RP, Fukumoto Y, Galié N, Hassoun PM, Klose H, Matsubara H, Morrell NW, Peacock AJ, Pfeifer M, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Dario Vizza C, Lawrence D, Yang W, Felser JM, Quinn DA, Ghofrani H-A. Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:1366–1375.
42. Takakura N, Yoshida H, Kunisada T, Nishikawa S, Nishikawa SI. Involvement of platelet-derived growth factor receptor-alpha in hair canal formation. *J Invest Dermatol*. 1996;107:770–777.
43. Takakura N, Yoshida H, Ogura Y, Kataoka H, Nishikawa S, Nishikawa S. PDGFR alpha expression during mouse embryogenesis: immunolocalization analyzed by whole-mount immunohistostaining using the monoclonal anti-mouse PDGFR alpha antibody APA5. *J Histochem Cytochem*. 1997;45:883–893.
44. Dudgeon K, Rouet R, Kokmeijer I, Schofield P, Stolp J, Langley D, Stock D, Christ D. General strategy for the generation of human antibody variable domains with increased aggregation resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109:10879–10884.
45. Asli NS, Xaymardan M, Patrick R, Farbehi N, Cornwell J, Forte E, Waardenberg AJ, Janbandhu V, Kesteven S, Chandrakanthan V, Malinowska H, Reinhard H, Schofield P, Christ D, Ahmed I, Bouveret R, Srivastava S, Mishra RK, Dhawan J, Chong JJH, Nordon R, Macdonald P, Graham RM, Feneley M, Harvey RP. PDGFR α signaling in cardiac fibroblasts modulates quiescence, metabolism and self-renewal, and promotes anatomical and functional repair. *bioRxiv*. 2019;225979.
46. Relaix F, Weng X, Marazzi G, Yang E, Copeland N, Jenkins N, Spence SE, Sassoon D. Pw1, a novel zinc finger gene implicated in the myogenic and neuronal lineages. *Dev Biol*. 1996;177:383–96.

SUPPLEMENTAL TABLE

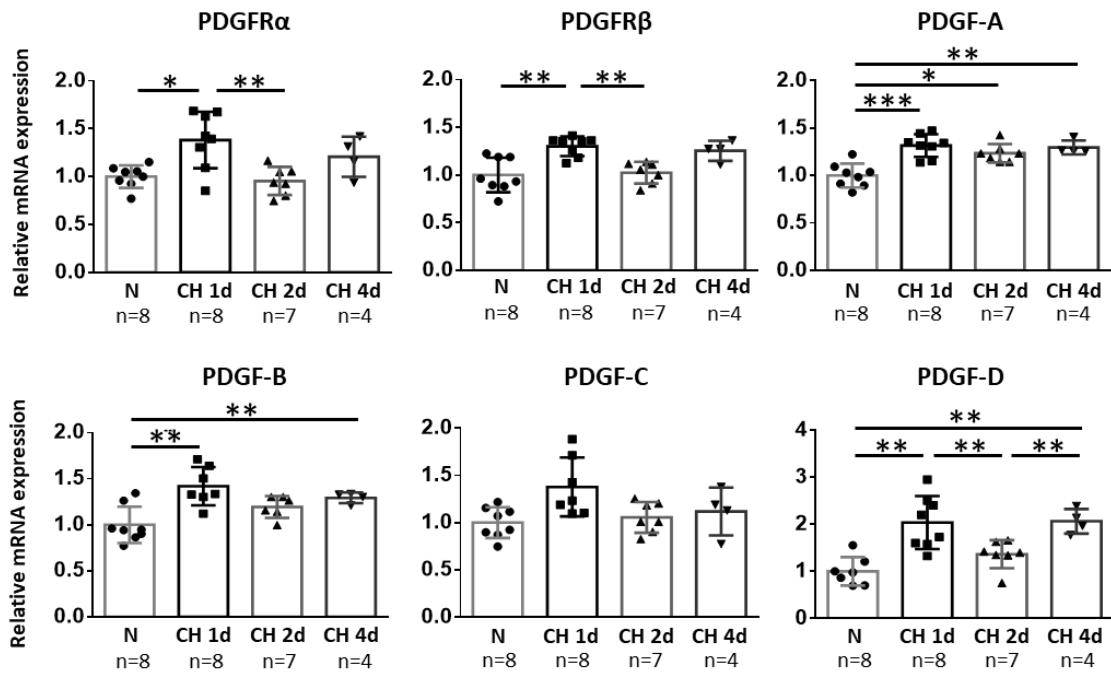
	Control patients					iPAH patients				
Case	Control 1	Control 2	Control 3	Control 4	Control 5	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Age (y)	45	65	40	60	62	21	16	14	51	40
Sex	M	F	F	M	F	M	M	F	F	F
Pathology	Invasive adeno-carcinoma	Invasive adeno-carcinoma	Invasive adeno-carcinoma	Carcinoid	Invasive adeno-carcinoma	iPAH	iPAH	iPAH	iPAH	iPAH
mPAP (mmHg)	x	x	x	x	x	86	110	75	64	49
PVR (Wood units)	x	x	x	x	x	17	12,89	10	9	7,5
capP (mmHg)	x	x	x	x	x	10	8	12	4	10
CI (L.min ⁻¹ .m ⁻²)	x	x	x	x	x	2.05	3.9	2.6	2.6	3,2
6MWD (m)	x	x	x	x	x	360	535	445	493	347
NYHA	x	x	x	x	x	IV	II	II	III	III

Supplemental Table III. Patients characteristics. Five control patients and five iPAH patients were included. mPAP, mean pulmonary arterial pressure. PVR, pulmonary vascular resistance. CapP, capillary pressure. CI, cardiac index. 6MWD, 6 minutes walking distance test. NYHA, New York Heart Association Functional Classification.

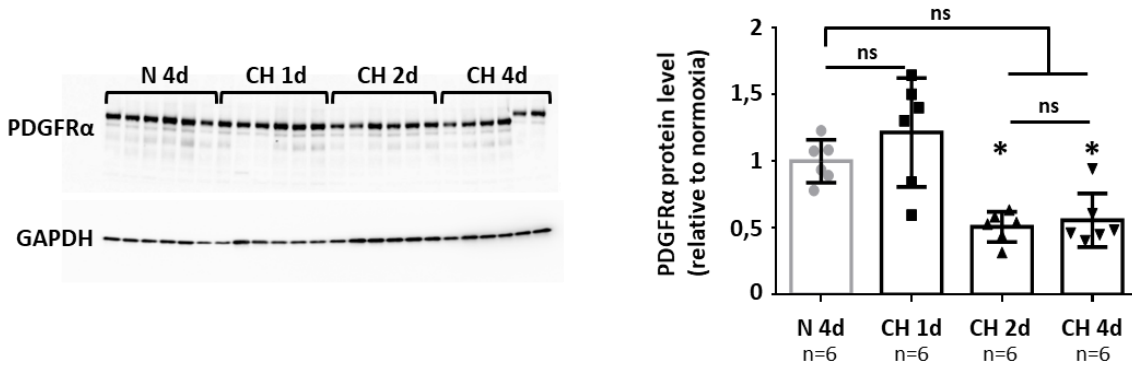


Supplementary Figure I. PW1⁺/PDGFR α ⁺ cells are not present within complex vascular lesions in iPAH patients. Lung sections from or iPAH patients (iPAH) were labelled for PW1 (white), PDGFR α (red) and α -SMA (green). Representative confocal images of a complex vascular lesion in iPAH patient lung. Scale bar = 100 μ m.

A

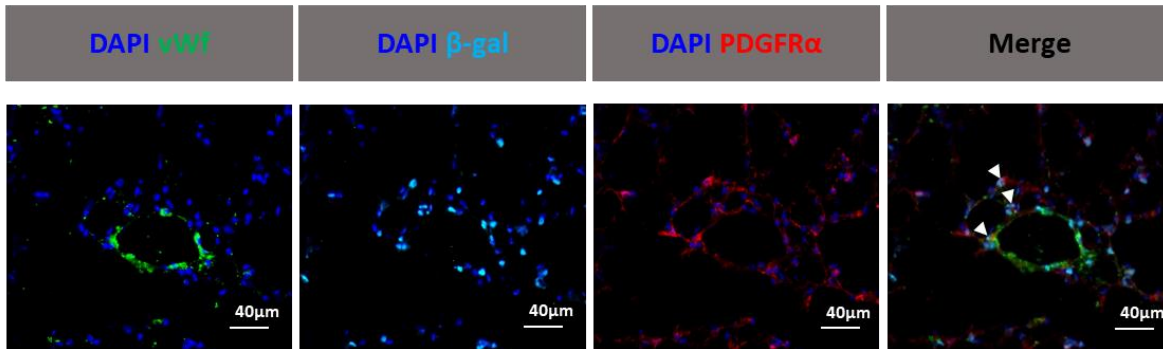


B

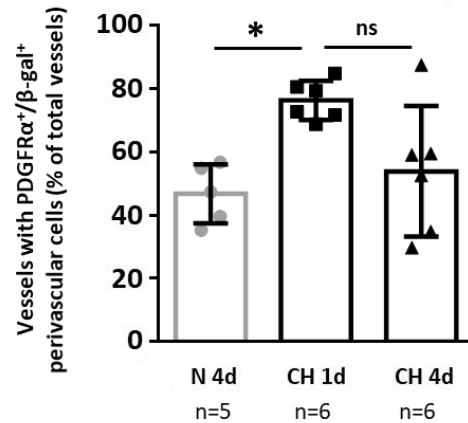


Supplementary Figure II. Expression of PDGF ligands and receptors is increased within the first day of chronic hypoxia. A, mRNAs for PDGFR α and β and PDGF-A, -B, -C, and -D were measured by real-time PCR on lung total RNA preparations from mice under normoxia (N) or after 1, 2, or 4 days of CH (CH 1d, CH 2d, and CH 4d respectively) (n=4-8). B, Western blot analysis of PDGFR α in lung extracts from control mice (N 4d) and from animals exposed to 1, 2, or 4 days of chronic hypoxia (CH 1-2-4d) (n=6/group). Quantification of PDGFR α normalized to GAPDH is shown in the bar graphs. Values are mean \pm SD, *p<0.05, **p<0.01, ns=not significant (Kruskal-Wallis and Dunn).

A

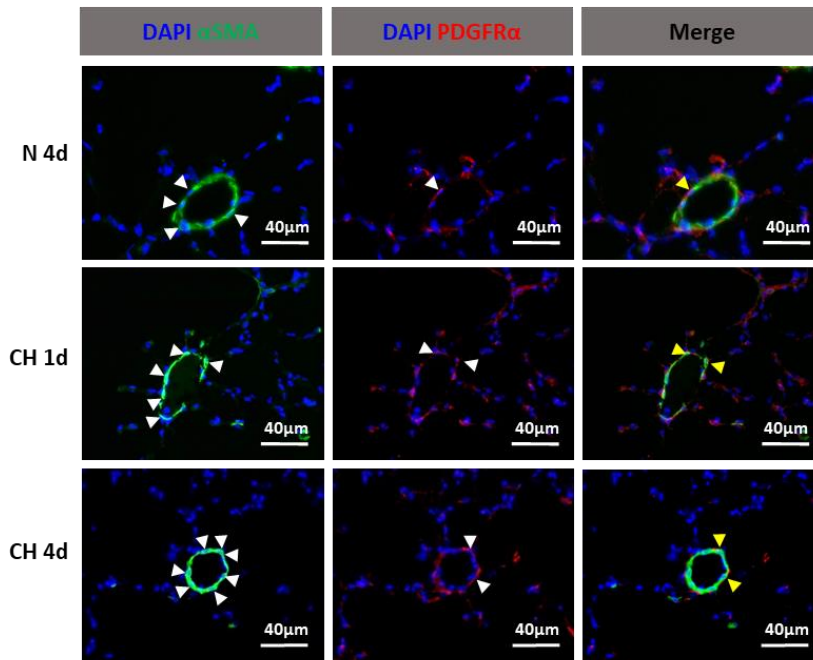


B

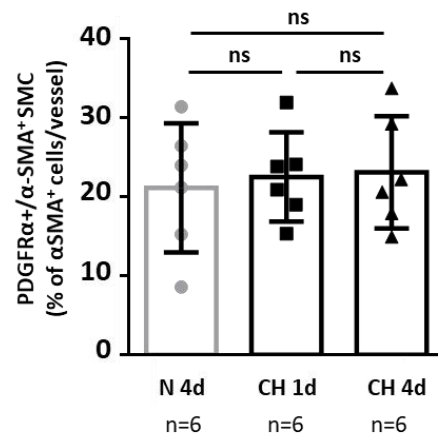


Supplementary Figure III. Pulmonary β -gal⁺/PDGFR α ⁺ perivascular cells are increased within the first day of chronic hypoxia. PW1^{nLacZ} mice were maintained under normoxia (N 4d) or chronic hypoxia for 1 or 4 days (CH 1d or 4d). **A**, Representative immunofluorescence image of pulmonary vessels labeled for von Willebrand factor (vWF, green), β -gal (cyan), PDGFR α (red), and DAPI (nuclei, dark blue). Perivascular β -gal⁺/PDGFR α ⁺ cells are marked by arrowheads. **B**, Quantification of vessels surrounded by one or more β -gal⁺/PDGFR α ⁺ perivascular cells under normoxia (N 4d) and after 1 or 4 days of chronic hypoxia (CH 1d or 4d) (n=5-6 mice/group). Values are mean \pm SD, *p<0.05 vs N 4d, ns=not significant (Kruskal-Wallis and Dunn).

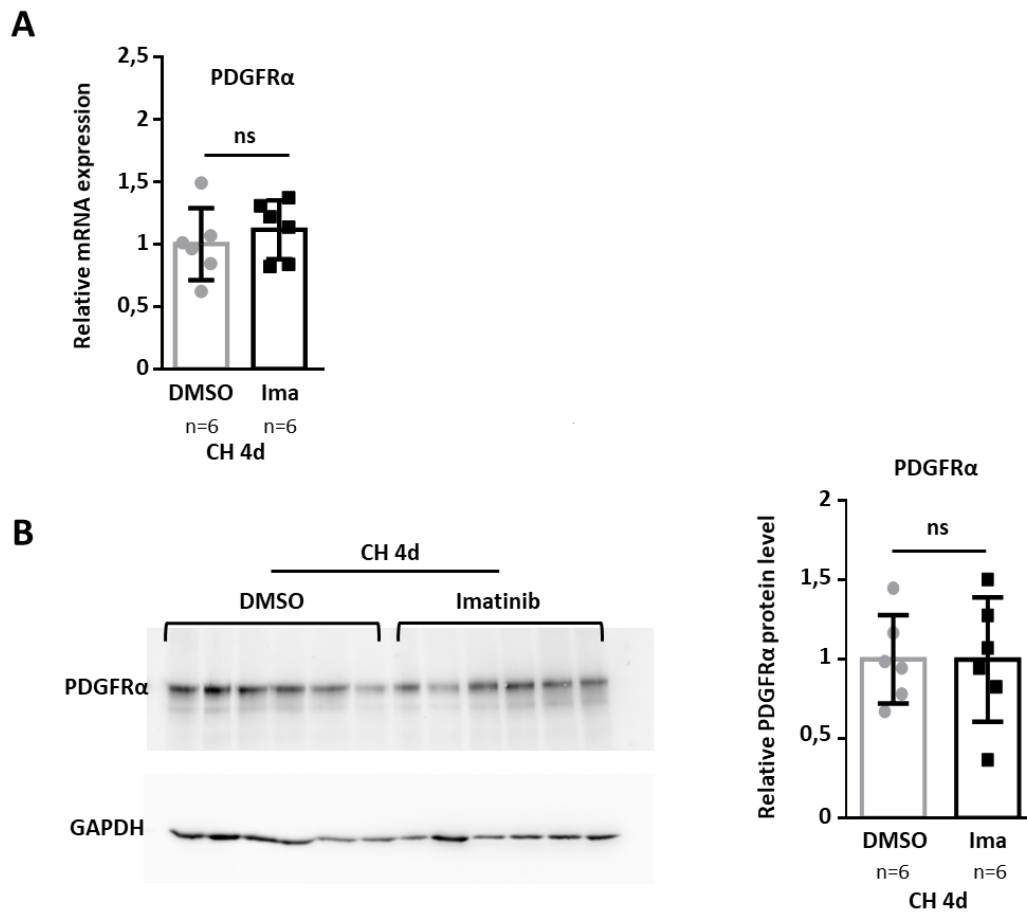
A



B

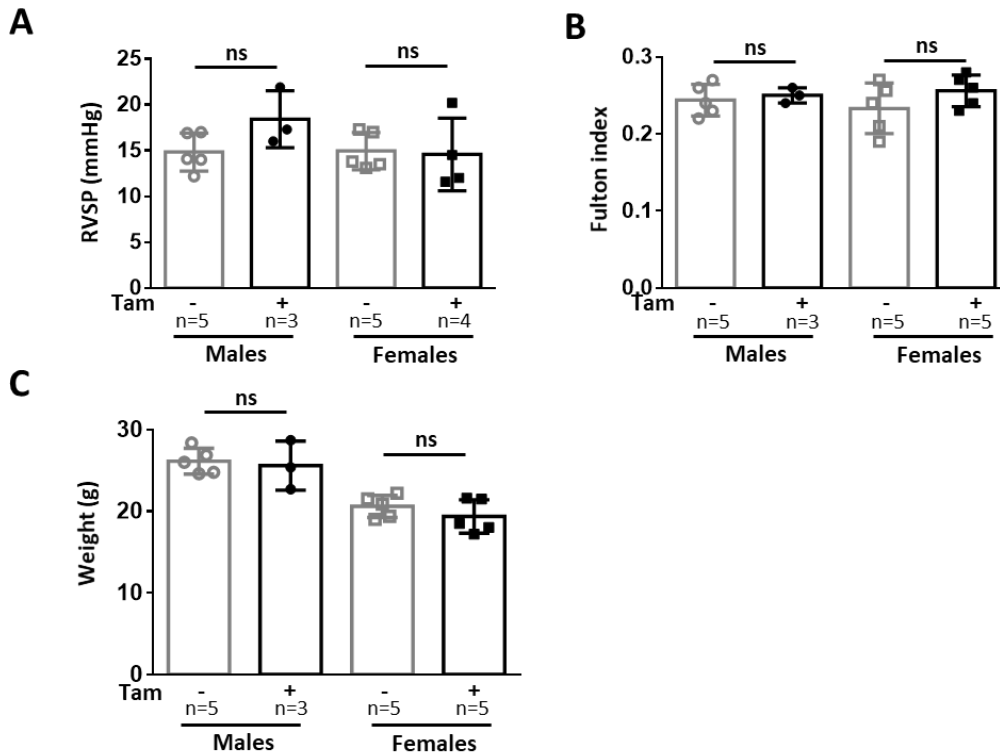


Supplementary Figure IV. Chronic hypoxia does not increase the number of PDGFR α ⁺/ α -SMA⁺ SMC in pulmonary muscularized vessels. PW1^{nLacZ} mice were maintained under normoxia (N 4d) or chronic hypoxia for 1 or 4 days (CH 1d or 4d). **A**, Representative image of pulmonary muscularized vessel labeled for α SMA (green) and PDGFR α (red) (double-positives are marked by yellow arrowheads). **B**, Quantification of lung PDGFR α ⁺/ α -SMA⁺ SMC in muscularized vessels (n=6 mice/group). Values are mean \pm SD, ns=not significant (Kruskal-Wallis and Dunn).



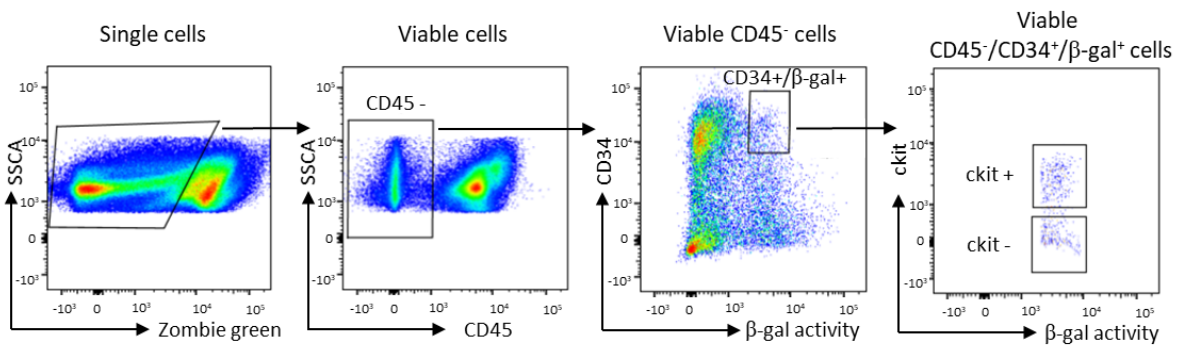
Supplementary Figure V. Imatinib treatment does not modify PDGFR α mRNA and protein levels during chronic hypoxia. Mice were maintained under chronic hypoxia for 4 days (CH 4d) and treated daily with DMSO or imatinib (Ima) **A**, PDGFR α mRNA was measured by real-time PCR on lung total RNA preparations from mice exposed to four days of chronic hypoxia (CH 4d) and treated with DMSO (vehicle) or imatinib (n=6 mice/group). **B**, Western blot analysis of PDGFR α in lungs from vehicle-treated mice (DMSO) or Imatinib-treated (Ima) (n=6 mice/group). Quantification of PDGFR α normalized to GAPDH is shown in the bar graphs. Values are mean \pm SD, ns=not significant (Kruskal-Wallis and Dunn).

Supp Fig VI



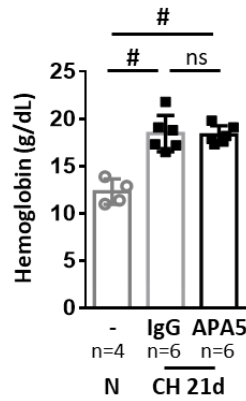
Supplementary Figure VI: Right systolic ventricular pressure (RSVP, A), Fulton index (B), and total heart weight (C), were not modified after two weeks of constitutive PDGFR α activation. Constitutive PDGFR α activation was induced by Tamoxifen administration in PW1nLacZ⁺/PDGFR α ^{+/S1K}/Rosa-CRE⁺ mice. Induced (Tam +) and non-induced (Tam -) mice were analyzed two weeks after the final Tamoxifen administration, n=3-5/group, ns, not significant, 2-tailed Mann-Whitney.

Supp Fig VII



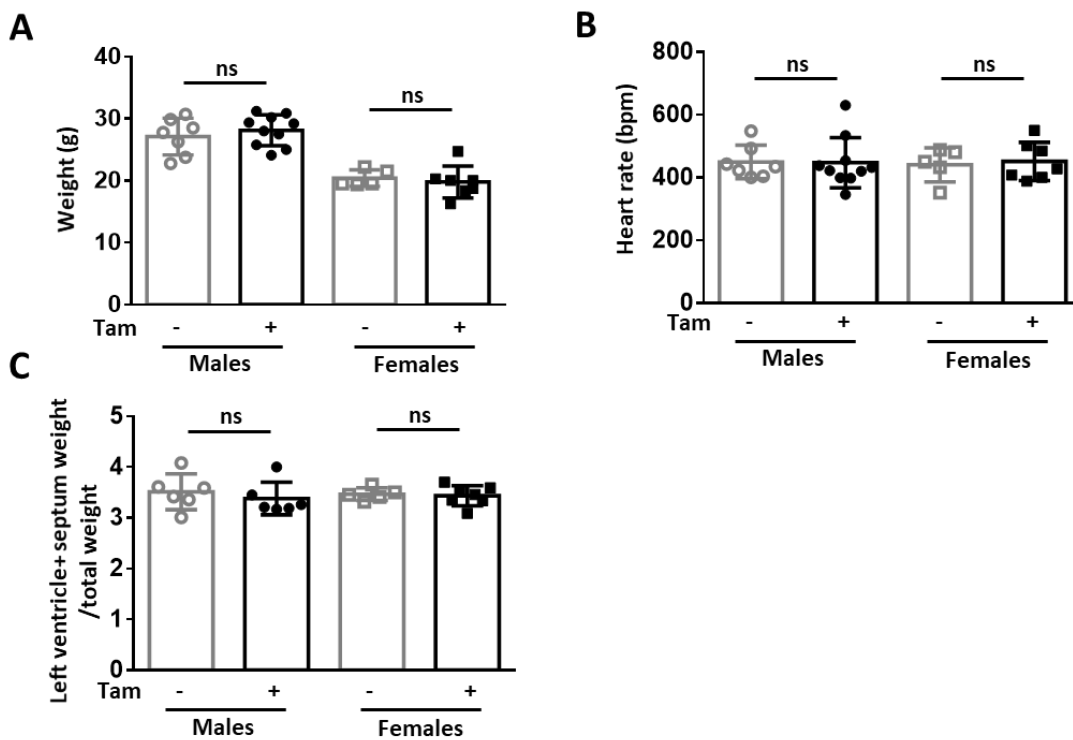
Supplementary Figure VII: Mouse pulmonary PW1⁺ progenitor cells sorting strategy. Representative FACS profile of total mouse lung cells indicating the gating strategy to sort the PDGFR α ⁺/PW1⁺ populations based on Zombie green (viability marker), DDAO-G (β -galactosidase activity), and CD45, CD34, and c-kit cell surface expression. Viable CD45⁻/CD34⁺/c-kit⁻ and c-kit⁻ cells are PDGFR α ⁺ and were sorted for cell culture.

Supp Fig VIII

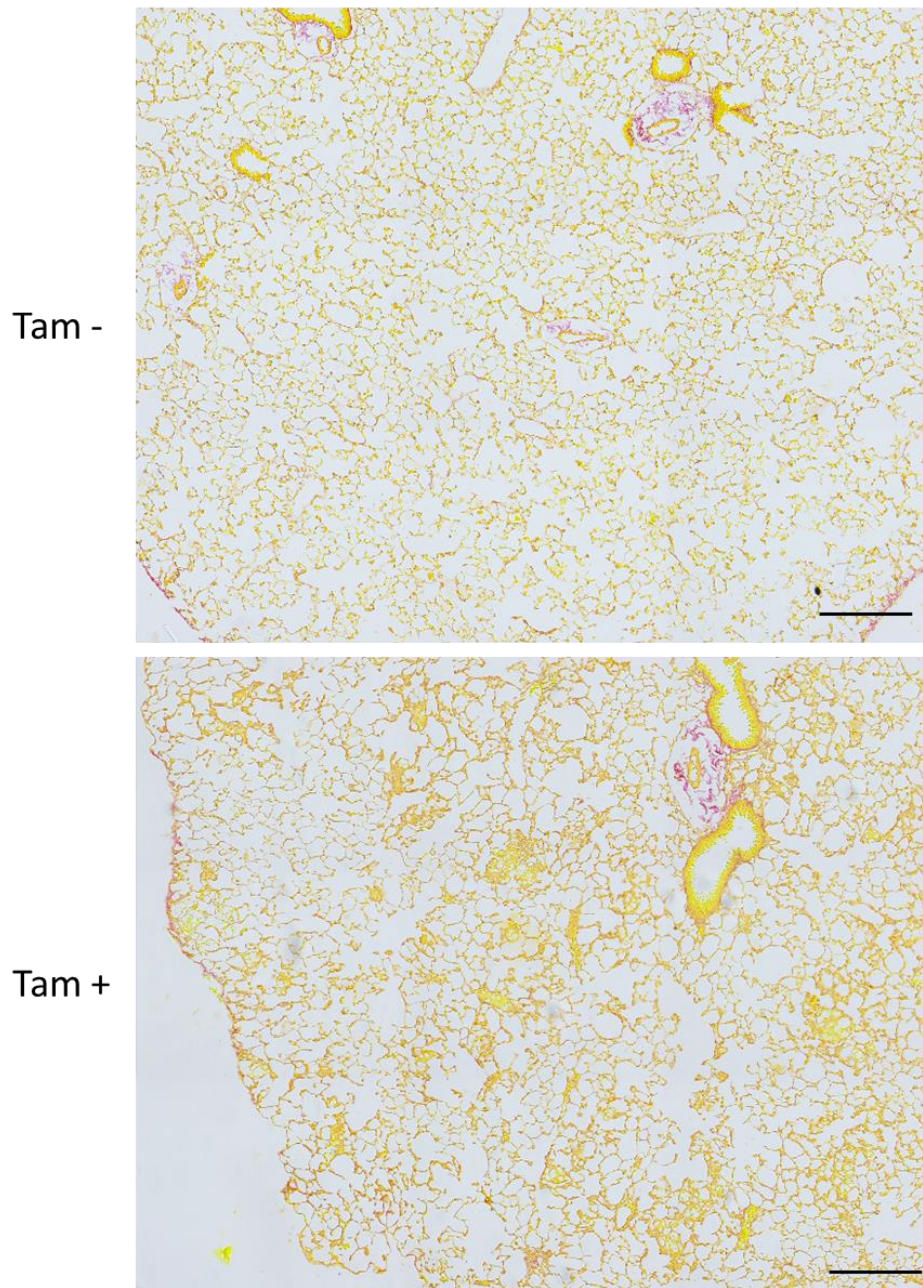


Supplementary Figure VIII. Chronic hypoxia for 21 days increases blood hemoglobin concentration. Blood hemoglobin concentration (g/dL) was measured in untreated normoxic (N, n=4) or in IgG- and APA5-treated PW1^{nLacZ} mice after 21 days of CH (CH 21d, n=6) . Values are mean±SD, # p<0.05 vs normoxic, ns = not significant, Kruskal-Wallis and Dunn.

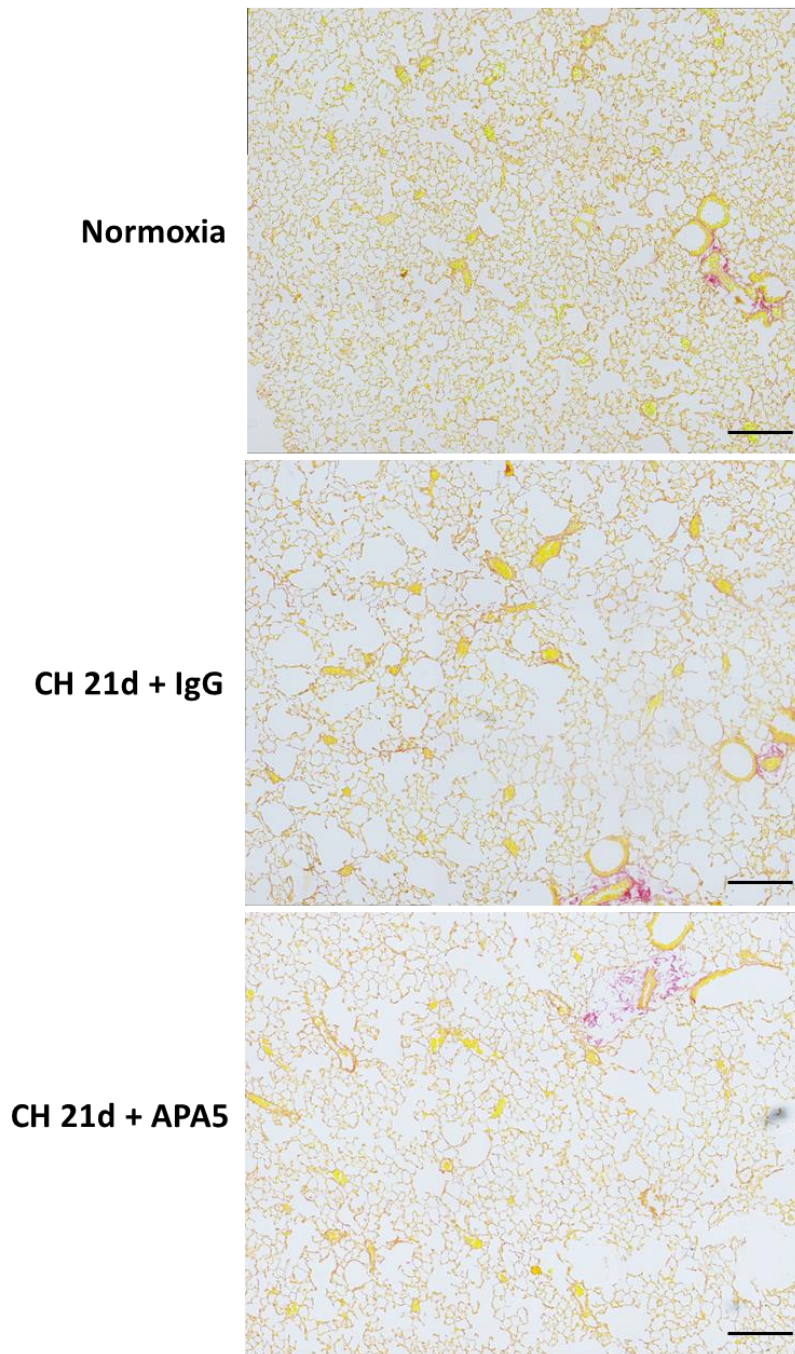
Supp Fig IX



Supplementary Figure IX: Total heart weight (A), heart rate (B), and left ventricle+septum weight (C) were not modified five weeks after constitutive PDGFR α activation. Constitutive PDGFR α activation was induced by Tamoxifen administration in PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/S^K}/Rosa-CRE⁺ mice. Induced (Tam +) and non-induced (Tam -) mice were analyzed 5-6 weeks after the final Tamoxifen administration, n=6-7/group, ns, not significant, 2-tailed Mann-Whitney.



Supplementary Figure X. Lung fibrosis is not induced by PDGFR α . Representative images of picrosirius red staining for collagen (red) in pulmonary parenchyma of non-induced (Tam -) or tamoxifen-induced (Tam +) PW1^{nLacZ/+}/PDGFR α ^{+/S^K}/Rosa-CRE⁺ mice five weeks after Tamoxifen induction. Scale bar 200 μ m.



Supplementary Figure XI. Lung fibrosis is not reduced by PDGFR α inhibition during CH. Representative images of picrosirius red staining for collagen (red) in pulmonary parenchyma of untreated mice under normoxia or IgG- and APA5-treated mice after 21 days of CH. Scale bar 200 μ m.

Partie 2 : Caractérisation par analyse Single-cell RNA-seq des différentes populations de cellules pulmonaires PW1⁺ et des cellules issues de leur différenciation, et effets de l'hypoxie chronique.

I. Introduction

Suite aux résultats du premier projet, nous voulions approfondir nos connaissances sur les différentes sous-populations de progéniteurs pulmonaires PW1⁺ et leur devenir *in vivo*, et savoir si l'hypoxie impactait leur profil transcriptionnel ainsi que la dynamique du processus de différenciation cellulaire. Pour cela, nous avons décidé de réaliser une analyse single-cell RNAseq sur des souris maintenues en normoxie ainsi que sur des souris exposées à 4 jours d'HC. Cette analyse n'a pas été effectuée sur poumon entier. En effet, un tri cellulaire par FACS a été réalisé au préalable pour isoler les cellules CD45⁻/β-gal⁺, sur lesquelles ont été effectuées le single-cell. Cette analyse permet par comparaison de transcriptomes de rassembler les cellules par catégorie/cluster selon la proximité de leur profil d'expression. Grâce aux données obtenues, nous pouvons également élaborer des trajectoires de différenciation entre les clusters de cellules les « moins différenciées » et ceux de cellules matures.

Ce projet a été articulé autour des objectifs suivants :

Objectif 1 : Identifier les différentes populations de cellules progénitrices PW1⁺ ainsi que les différentes cellules issues de leur différenciation. Déterminer des liens/trajectoires entre les clusters « d'intérêts ».

Objectif 2 : Etablir un lien entre les clusters de progéniteurs identifiés par l'analyse single-cell et les 3 populations PW1⁺ précédemment identifiées et isolées par FACS. Identifier de nouveaux marqueurs permettant un tri cellulaire plus précis des populations progénitrices pour de futures études *in vitro*.

Objectif 3 : Observer, *in vivo*, la co-expression de ces nouveaux marqueurs avec la β-gal.

Objectif 4 : Identifier des voies modifiées au niveau transcriptomique entre les progéniteurs de souris normoxiques et hypoxiques.

II. Résultats

1. Identification des clusters de cellules pulmonaires CD45⁻/β-gal⁺.

L'analyse bio-informatique des transcriptomes a été réalisée sur 5341 cellules pour la condition normoxique (N) et 4401 cellules pour la condition hypoxique (H), avec une moyenne de 2367 gènes/cellules pour les 2 conditions. Cette analyse a permis de séparer les cellules en 21 clusters pour la condition N et 22 clusters pour la condition H. Ces clusters ont ensuite pu être identifiés en compilant l'analyse d'expression de gènes et les données bibliographiques. (site LungGens) [308] (**Fig 25**)

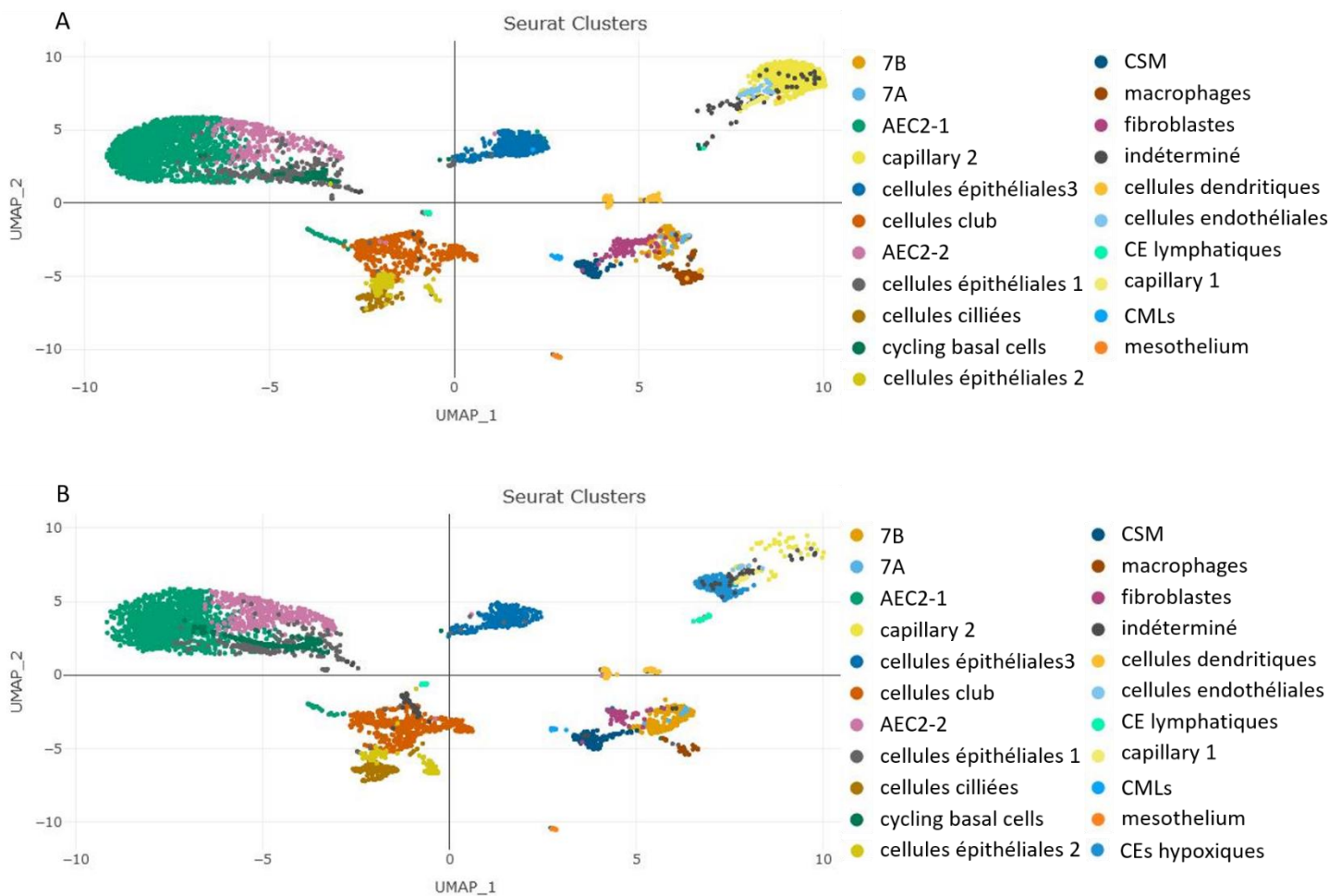


Figure 25 : Regroupement des populations cellulaires déterminées par analyse single-cell et identification des clusters (visualisation en UMAP).

A : 21 clusters ont été identifiés en normoxie. **B :** 22 clusters ont été identifiés en hypoxie. AEC2 : alveolar epithelial cells type 2 ; CSM : cellules souches mésenchymateuses ; CE : cellules endothéliales ; CML : cellules musculaires lisses.

L'analyse de ces clusters reste encore inachevée et les dénominations des sous-populations ne sont pas toutes clairement définies ni fixées.

2. Analyses de trajectoire

Les 3 populations cellulaires isolées habituellement en FACS étant mésenchymateuses, nous nous sommes ensuite concentrés sur les 3 clusters mésenchymateux identifiés par l'analyse single-cell : le cluster 7 (sans dénomination) sous divisé en 7A et 7B, le cluster « fibroblastes » qui n'exprime pas réellement de marqueurs spécifiques permettant de mieux le définir (exprime à la fois certains marqueurs de CS mésenchymateuses et de CML, phénotype intermédiaire entre les 2 types cellulaires) et le cluster « cellules souches mésenchymateuses » (CSM). De plus, nos résultats précédents indiquent que les progéniteurs PW1⁺ sont des précurseurs de CML. Une analyse de trajectoire a donc été réalisée avec l'outil PAGA entre ces 3 clusters immatures et le cluster différencié « CML », pour la condition N, H et en combinant les données N et H, afin d'augmenter la robustesse de l'analyse. Cette dernière confirme le lien fort entre 7A et 7B. De plus, elle place le cluster « fibroblastes » comme état intermédiaire entre les clusters 7 et « CSM » d'une part, et le cluster « CML » d'autre part pour la condition N et H+N (**Fig 26**), malgré un lien faible entre « fibroblastes » et « CML ». En condition N, l'analyse suggère également un potentiel cycle entre les 3 clusters mésenchymateux. Concernant la condition H, on constate plutôt que le cluster « CML » est un cluster terminal pour les 3 autres clusters, avec un lien très fort entre « CML » et « fibroblastes », laissant supposer que ce cluster constitue la principale source de CML à 4 jours d'HC, dans cette analyse bio-informatique. (**Fig 26**) De plus, il est possible que l'interaction entre « CSM », « fibroblastes » et « CML » soit cyclique, le cluster « CSM » pouvant se différencier directement en « CML » ou en passant par un état intermédiaire de « fibroblastes ».

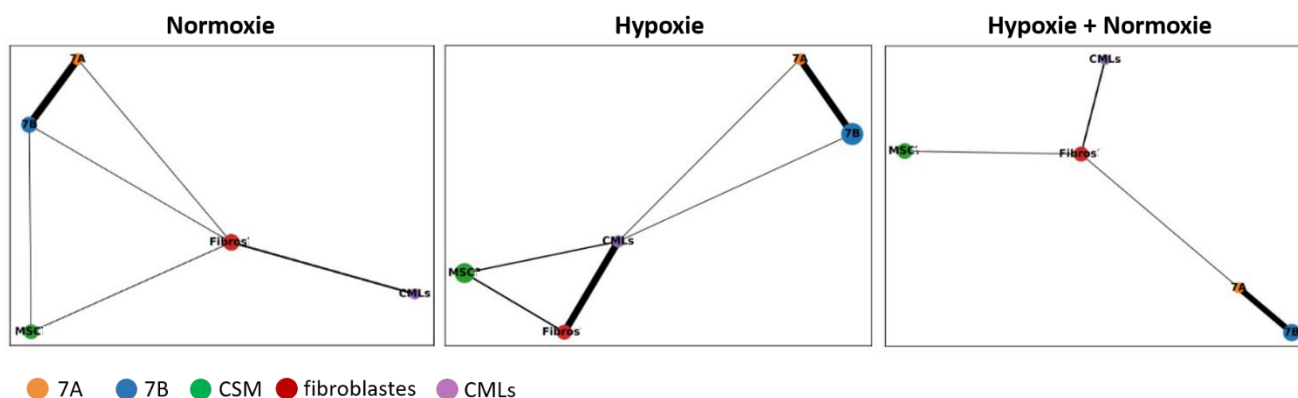


Figure 26 : Représentation de l'analyse de trajectoire entre les clusters mésenchymateux en normoxie et/ou en hypoxie.

Les traits indiquent les liens/trajectoires entre clusters. Plus le trait est épais, plus la relation entre clusters est importante.

Le cluster 7 a initialement été identifié comme un pool de progéniteurs de CML/péricytes, ces 2 types cellulaires partageant l'expression d'un certain nombre de gènes. Or il s'avère qu'une partie des cellules constituant ce cluster co-exprime également des marqueurs de CE capillaire. C'est pourquoi nous l'avons sous divisé en 2 sous-clusters : le 7A présentant un bi-potentiel de CML/péricytes et de CE, et 7B exprimant uniquement des marqueurs de CML/péricytes.

L'analyse de trajectoire a donc également été réalisée en incluant les clusters de cellules endothéliales : « CE non capillaire » (CE non cap), « CE lymphatiques », « capillary 1 et 2 » et « CE hypoxiques » (CE hypox) présent uniquement en H. Dans cette analyse, le cluster 7A est relié à un cluster de CE : « capillary 2 » uniquement dans la condition H (**Fig 27**), suggérant la nécessité d'un microenvironnement hypoxique pour déclencher le processus de différenciation de ces cellules en CE. Il est également intéressant de constater un lien important entre « fibroblastes » et CE. En effet, en normoxie, le lien entre « fibroblastes » et « CE lymphatiques » semble même plus important que le lien avec « CML ». A l'inverse, en hypoxie, le lien entre « fibroblastes » et « CML » se renforce, tandis que celui avec « CE lymphatiques » s'amenuise, notant cependant la formation d'un lien quelque-peu plus important avec « CE non capillaire ». (**Fig 27**) Il semblerait que l'hypoxie induise un cycle de différenciation/dédifférenciation entre d'une part : « fibroblastes », « CML », « CSM » et d'autre part : « fibroblastes », « CE non capillaire », « CE lymphatiques », avec le cluster « fibroblastes » comme lien entre les 2 types cellulaires mésenchymateux et endothélial.

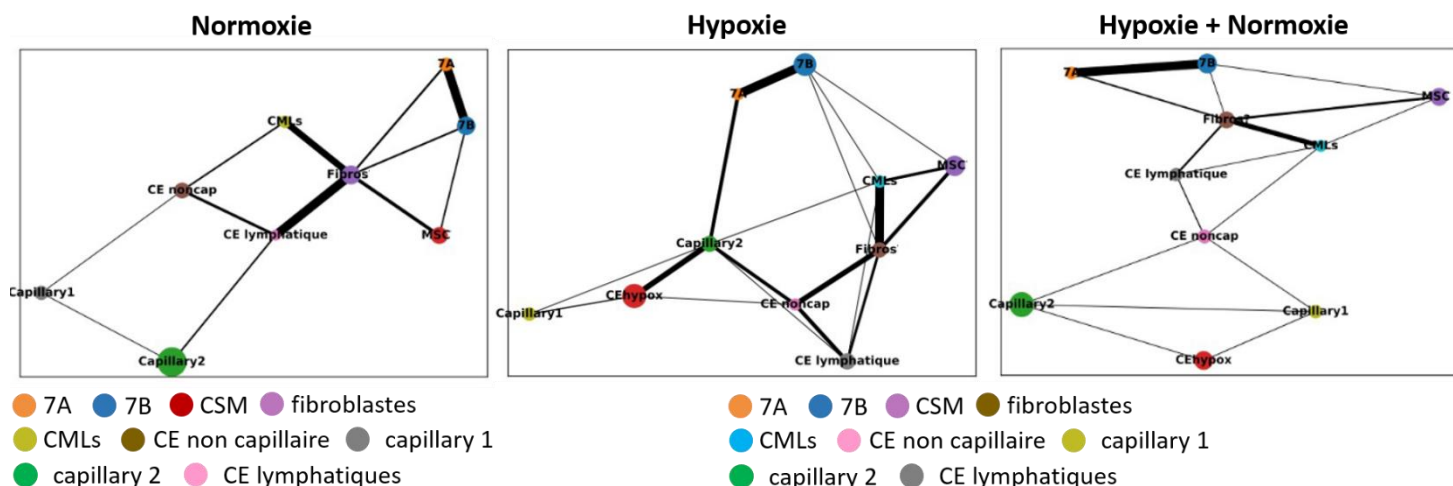


Figure 27 : Représentation de l'analyse de trajectoire entre les clusters mésenchymateux et endothéliaux, en normoxie et/ou en hypoxie.

Les traits indiquent les liens/trajectoires entre clusters. Plus le trait est épais, plus la relation entre clusters est importante.

Les autres analyses de trajectoire (MONOCLE et VELOCITY) semblent aussi montrer un lien entre 7A et 7B vers le cluster « fibroblastes » puis le cluster « CML », ainsi qu'un lien du cluster « CSM » vers le cluster « fibroblastes » puis le cluster « CML ». Cependant ils ne montrent pas de lien entre 7A-7B et les diverses populations de CE.

L'ensemble de ces analyses est difficile à interpréter pour les « CML » en raison du faible nombre de cellules obtenues dans cette population. Elles semblent indiquer (pour PAGA et MONOCLE) une transition des progéniteurs vers les « CML », sans lien hiérarchique entre 7A-7B et les « CSM ». Par contre le lien entre progéniteurs et CE dans le contexte normoxie ou hypoxie n'est pas établi.

3. Association des clusters du single-cell aux populations isolées par FACS

Après l'identification des différents clusters et l'établissement des liens entre les clusters d'intérêts, le second objectif de l'étude consistait à associer les clusters 7A, 7B, et « CSM » aux 3 populations identifiées et isolées par FACS dans les travaux précédents : $CD34^+/PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^-$ (c-kit⁻) ; $CD34^+/PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^+$ (c-kit⁺) ; $CD34^+/PW1^+/PDGFR\beta^+/CD146^+$ (péricytes).

Le cluster 7A exprime différents marqueurs de progéniteurs mésenchymateux tel que CD34, PDGFR α et c-kit. Il a donc été associé à la population c-kit⁺. L'association des autres clusters et populations est plus compliquée. En effet, aucun cluster n'a été identifié comme péricytes. Cependant, 7B exprime notamment PW1 et ACTA2 (qui augmente en hypoxie), et exprime faiblement CD34. Il a donc été associé à la population péricytaire (CD34⁺), malgré une faible expression de CD146 et PDGFR β , et une expression de PDGFR α qui augmente en hypoxie. Le cluster « CSM » est proche du cluster « CML ». Le nombre de cellules augmente en hypoxie, suggérant leur prolifération, et il exprime fortement CD34 et Sca1 mais pas c-kit. Ainsi, malgré une expression faible de PDGFR α , il a été associé à la population c-kit⁻. Pour récapituler les hypothèses suivantes ont été émises :

- cluster 7A = population c-kit⁺
- cluster 7B = population péricyte
- cluster CSM = population c-kit⁻

Afin de valider nos hypothèses, une analyse différentielle d'expression de gènes a permis d'identifier des marqueurs cellulaires discriminant les clusters entre eux. (**Fig 28**) Seuls des marqueurs membranaires ont été retenus, car dans un second temps nous souhaiterions pouvoir les utiliser pour isoler ces progéniteurs chez l'Homme et le rat en nous affranchissant de la β -gal. Les marqueurs suivants ont ainsi été retenus : CD248 (glycoprotéine transmembranaire exprimée dans les péricytes et fibroblastes), Scara5 (Récepteur de la ferritine), Scn3a (glycoprotéine transmembranaire correspondant à une sous-unité de canal sodique), Itga8 (intégrine régulant le recrutement des cellules mésenchymateuses), Slc36a2 (transporteur d'acides aminés).

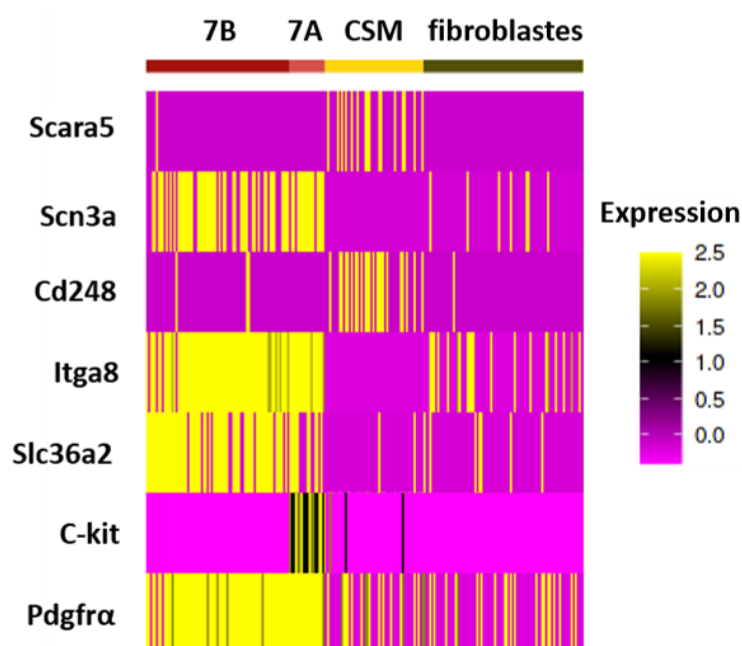


Figure 28 : Analyse de l'expression de gènes d'intérêts entre les clusters de progéniteurs mésenchymateux en normoxie.

A partir de cette liste, des marquages immunofluorescents sur les populations en sortie de FACS ont été réalisés, sur lame centrifugée, afin de confirmer les associations.

Pour la population péricyte, nous nous attendions à une forte expression de Scn3a, d'Itga8 et de Slc36a2 ainsi qu'à une quasi absence d'expression de CD248 et Scara5. Or ces 2 derniers marqueurs sont exprimés respectivement par 67% (n=4) et 61,7% (n=2) des péricytes isolés. A l'inverse, Itga8 et Scn3a sont exprimés par peu de cellules, respectivement 25% (n=3) et 6,2% (n=3). Seule Slc36a2 semble être exprimée de manière attendue, puisque 61,8% (n=3) des cellules sont positives. De plus, contrairement au cluster 7B, la population péricyte est négative pour PDGFR α , en concordance avec les résultats précédents. [12]

Pour la population c-kit, nous nous attendions à une expression de CD248 et Scara5 par un nombre modéré de cellules, et une absence d'expression de Scn3a, d'Itga8 et de Slc36a2. Les résultats obtenus sont en relative concordance, puisque 37,3% des cellules expriment Scara5 (n=4) et 15,8% expriment CD248 (n=2). En revanche, 33% des cellules expriment Slc36a2 (n=3) et 80% expriment Scn3a (n=2), cette dernière valeur étant en totale inadéquation avec notre hypothèse.

Pour la population c-kit⁺, nous nous attendions à une forte expression de Scn3a et d'Itga8, une expression moyenne de Slc36a2 et une absence d'expression de Scara5 et CD248. Bien que ces résultats restent à être confirmés, Scn3a et Itga8 sont respectivement exprimés par 1,3% (n=2) et 9,1% (n=2) des cellules, Slc36a2 est exprimé par 26,7% des cellules (n=2) et CD248 par 43,2% des cellules (n=1).

Les résultats obtenus ne sont pas en totale adéquation avec ceux attendus et ne permettent pas de valider nos hypothèses d'association entre clusters de single-cell et populations cellulaires isolées par FACS. Cela peut être dû au fait que nous comparons ARNm (single-cell) et protéines (cellules du FACS), mais également du fait que chacune de nos populations triées sur seulement 3 marqueurs englobe des cellules divisées dans plusieurs clusters par l'analyse single-cell.

4. Différenciation *in vitro* de la population c-kit⁺ en cellules endothéliales

Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle le cluster 7A correspondrait à la population c-kit⁺. Or l'analyse bio-informatique a fait ressortir un double potentiel de différenciation du cluster 7A en CML et en CE. En sortie de FACS, aucune cellule c-kit⁺ n'exprime de marqueurs de CML différenciées (Myh11 ou α SMA) et *in vitro*, elles se différencient en CML-like sous induction du TGF β et du PDGF-BB. [12] Ces cellules ont également été soumises à un protocole de différenciation en CE. Nos résultats préliminaires ont permis de visualiser quelques cellules exprimant 2 marqueurs endothéliaux : CD31 et vwf et qui semblent s'organiser en une structure primaire. (**Fig 29**) Le faible nombre de cellules différenciées en CE peut s'expliquer par un protocole de différenciation qui n'est pas encore optimal, mais rejoint également l'hypothèse selon laquelle la population cellulaire c-kit⁺ isolée par FACS regroupe différents clusters de l'analyse bio-informatique, dont le 7A.

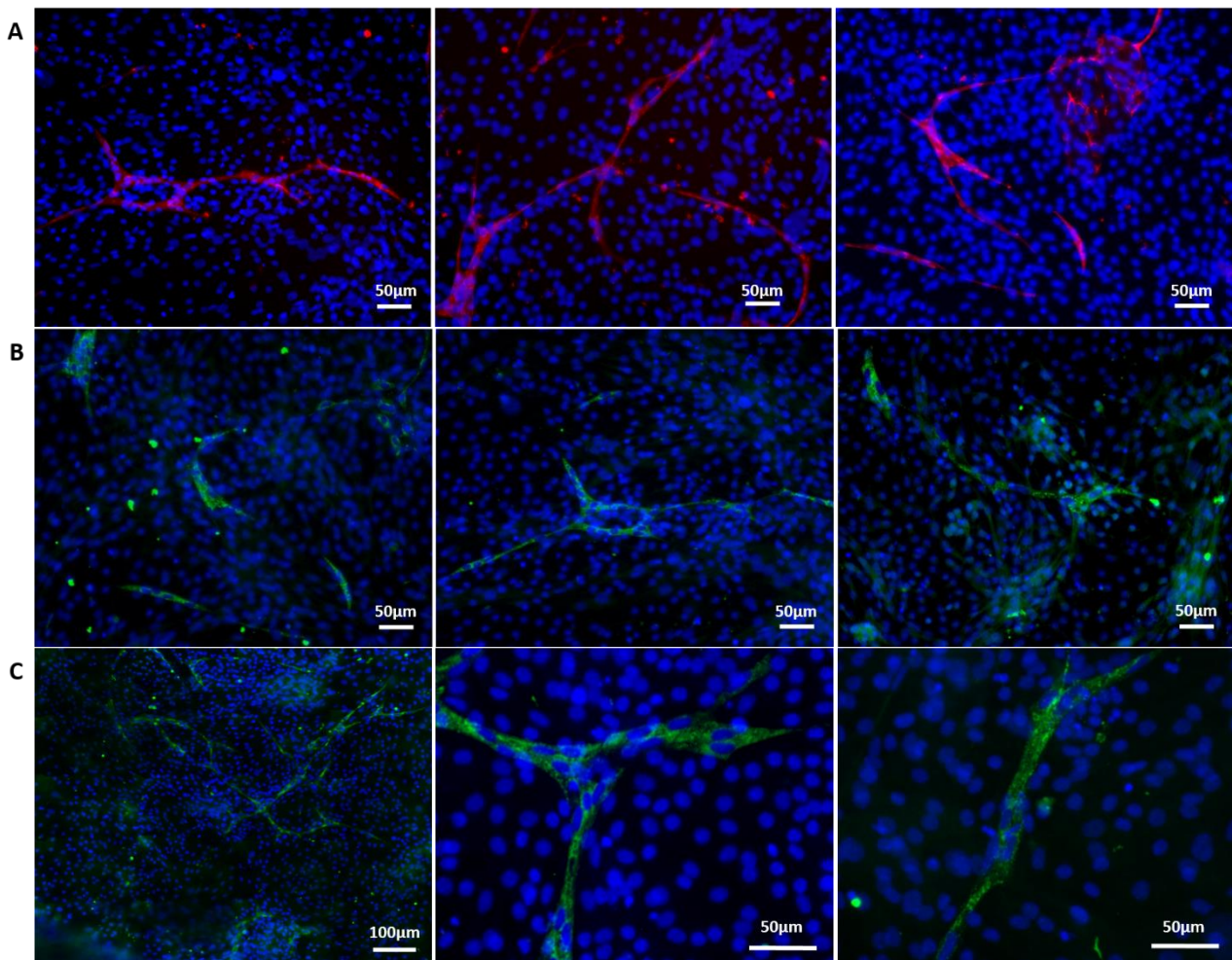


Figure 29 : Certaines cellules de la population c-kit⁺ ont la capacité de se différencier en cellules endothéliales.

Les cellules c-kit⁺ ont été ensemencées sur matrigel (A et B) ou fibronectine (C) dans le milieu EBM2 microvasculaire (Lonza) complété avec de la forskoline (4 μ M), de l'acide ascorbique (5 μ g) et du VEGF en concentrations décroissantes (200 puis 50 puis 0 ng). Les cellules ont été marquées par des Ac dirigés contre les marqueurs endothéliaux : CD31 (rouge) et vwf (vert).

5. Analyse *in situ* de l'expression des marqueurs identifiés par single-cell dans les poumons de souris

Afin d'avoir une vision plus globale de l'expression de ces marqueurs, différents co-marquages ont commencé à être réalisés sur cryosections de poumons. Les co-marquages ont été déterminés en fonction des associations d'expression déterminées par single-cell, et de la compatibilité des Ac selon l'espèce hôte.

- Co-marquage CD248 et Scara5

8,95% des cellules pulmonaires expriment CD248 (n=2) et 8,1% expriment Scara5. Il s'avère également que 47% des cellules CD248⁺ co-expriment Scara5 et 59% des cellules Scara5⁺ co-expriment CD248. (n= 1) (**Fig 30**) Après vérification en détail des résultats du Single Cell (Figure17), nous avons effectivement observé que dans le cluster « CSM », environ 40% des cellules Scara5⁺ ne sont pas CD248⁺ et 50% des cellules CD248⁺ n'expriment pas Scara5. (**Fig 31**) Ainsi, bien que l'analyse du single-cell ne permette pas de détecter l'ensemble des gènes exprimés dans chaque cellule (seulement 2000 ADNc ont été séquencés par cellule), il est possible que nos résultats en IF reflètent parfaitement les résultats obtenus en single-cell.

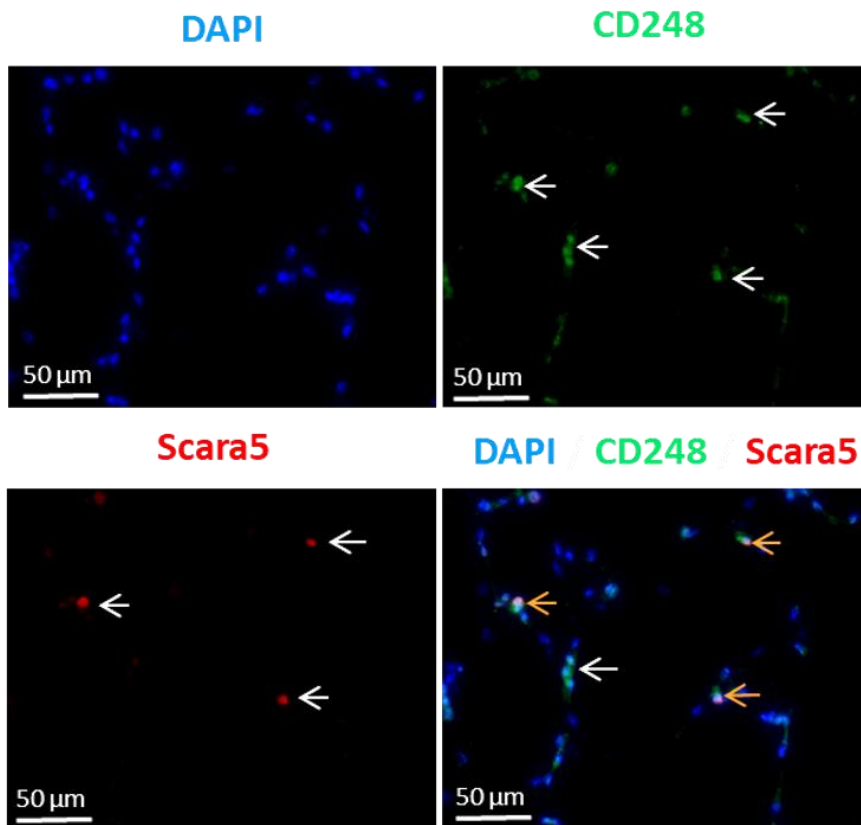


Figure 30 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de CD248 et Scara5 dans le poumon de souris.

Les flèches blanches indiquent les mono marquages et les flèches oranges les co-marquages. Cryosection de poumon de 12μm.

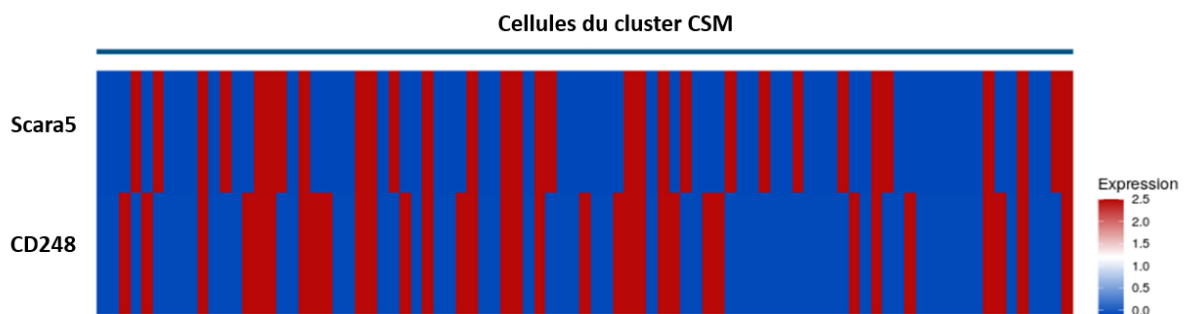


Figure 31 : Expression de Scara5 et CD248 par les cellules constituant le cluster CSM

- Co-marquage CD248 et PDGFR α

Ce co-marquage permettrait également de visualiser *in situ* les cellules correspondantes au cluster « CSM ». CD248 est exprimé par 8,95% des cellules pulmonaires (n=2) et PDGFR α par 7,5% des cellules (n=2). 36% des cellules CD248⁺ sont également PDGFR α ⁺, et 42% des cellules PDGFR α ⁺ sont CD248⁺. (n= 1) (Fig 32)

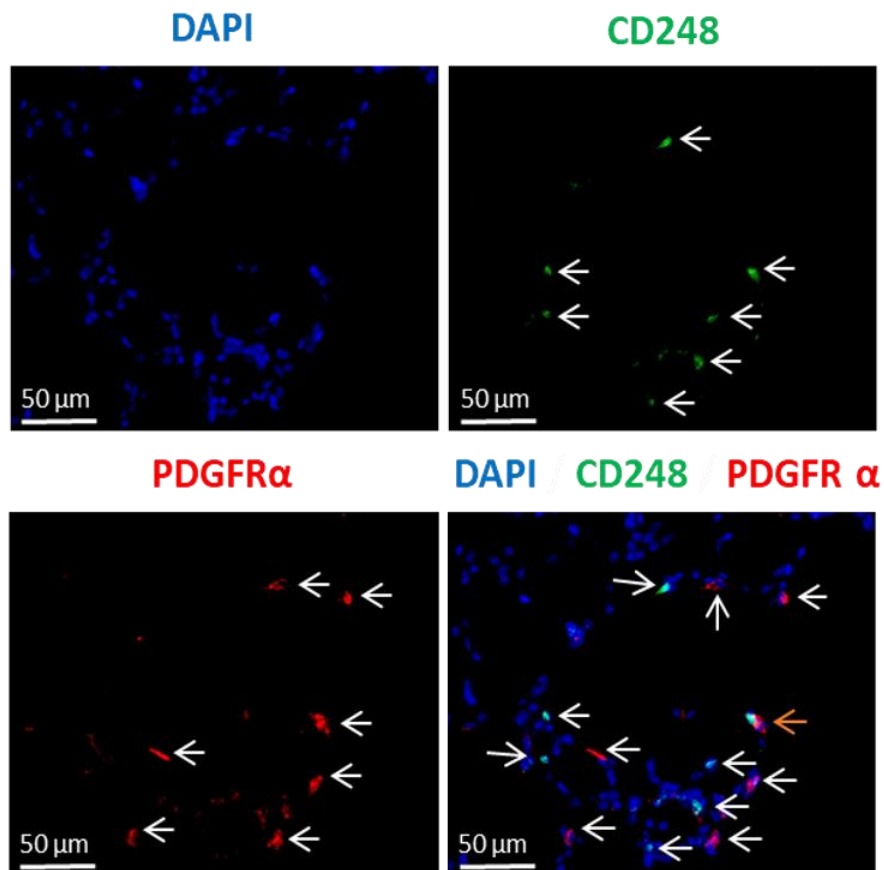


Figure 32 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de CD248 et PDGFR α dans le poumon de souris.

Les flèches blanches indiquent les mono-marquages et les flèches oranges les co-marquages. Cryosection de poumon de 12 μ m.

Il serait intéressant de faire un triple marquage CD248/Scara5/Pdgfr α , afin de mieux visualiser la proportion de cellules du cluster CSM *in vivo* et vérifier si elle se rapproche de la proportion d'une des 3 populations cellulaires isolées par FACS.

- Co-marquage Scn3a et PDGFR α

Ce co-marquage permettrait de visualiser *in situ* les cellules correspondantes au cluster 7. Scn3a est exprimé par 3,2% des cellules (n=3) et PDGFR α par 7,5% des cellules (n=2). De plus, 10% des cellules PDGFR α ⁺ co-expriment Scn3a et 20% des cellules Scn3a⁺ sont également PDGFR α ⁺ (n= 1). (**Fig 33**) Contrairement à CD248, Scn3a co-marque peu avec PDGFR α . Il aurait été intéressant de réaliser un triple marquage avec c-kit (marqueur discriminant 7A et 7B), malheureusement nos Ac anti c-kit et anti Scn3a proviennent de la même espèce hôte.

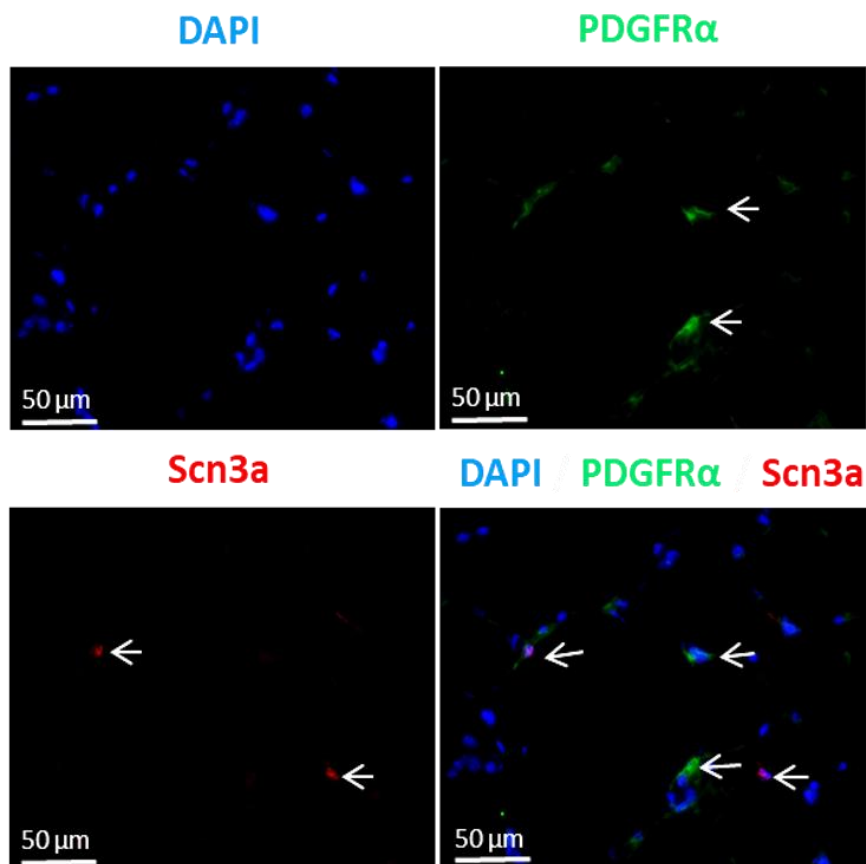


Figure 33 : Immunofluorescence représentative du co-marquage de Scn3a et PDGFR α dans le poumon de souris.

Les flèches blanches indiquent les mono-marquages et les flèches oranges les co-marquages. Cryosection de poumon de 12 μ m.

D'après l'analyse single-cell, les marqueurs *Scn3a* et *Slc36a2* sont co-exprimés dans les mêmes types cellulaires : cluster 7A et 7B. Concernant les populations triées par FACS, cette co-expression est essentiellement retrouvée dans la population *c-kit*⁻ qui, d'après notre hypothèse initiale, correspondrait au cluster MSC. Il serait intéressant de savoir la proportion de co-marquage dans cette population cellulaire mais également de manière générale dans le poumon. Malheureusement, actuellement au laboratoire, les Ac dirigés contre ces protéines sont tous les 2 produits chez le lapin.

D'autres co-marquages sont nécessaires pour mieux appréhender et interpréter ces résultats *in situ*, notamment des triples marquages avec la β -gal afin de confirmer le statut progéniteur des cellules, ou issus de la différenciation de progéniteurs PW1⁺.

A ce stade de l'étude, nous avons identifié 3 clusters possédant un profil de CS/progéniteurs mésenchymateux, similairement aux 3 populations que nous isolons habituellement en FACS. Contrairement à notre attente, l'analyse de trajectoire montre un lien faible entre ces clusters et le cluster des CML, suggérant un état intermédiaire entre progéniteurs et cellules différenciées, représenté par le cluster fibroblaste. Concernant la corrélation entre les clusters 7A, 7B, CSM respectivement avec les populations *c-kit*⁺, péricytes, *c-kit*⁻, nos données *in vitro* et *in situ* actuelles ne permettent pas de confirmer définitivement nos hypothèses. En revanche, l'analyse de trajectoire et l'analyse différentielle d'expression de gènes a permis de mettre en évidence la bi-potentialité du cluster 7A comme source de CML et de CE, qui a pu être mise en évidence *in vitro* par la différenciation de quelques cellules *c-kit*⁺ en CE CD31⁺ et *vwf*⁺.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'HTAP est une maladie rare, sévère et incurable. L'essentiel des thérapies consiste en l'utilisation de vasodilatateurs mais à terme une transplantation cardio-pulmonaire est indispensable à la survie du patient. La recherche de nouvelles cibles thérapeutiques est donc un enjeu majeur, passant notamment par une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Afin d'étudier celui-ci et plus particulièrement la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires, nous avons utilisé un modèle murin d'hypertension pulmonaire : la souris en HC. Nous avons précédemment identifié chez la souris et chez l'Homme une nouvelle population de progéniteurs vasculaires pulmonaires résidents caractérisée par les marqueurs PW1, CD34 et PDGFR α . Dès 4 jours d'hypoxie, ces progéniteurs prolifèrent, se différencient en CML et participent à la néomuscularisation. [12] Le but de notre étude était donc de déterminer les acteurs moléculaires responsables de leur mobilisation.

Différentes études ont montré l'activation des PDGFR dans les modèles expérimentaux d'HP et chez l'Homme ainsi que leur implication dans le développement de l'HTAP. Dans l'HP expérimentale, l'utilisation d'imatinib prévient l'augmentation de la PAP et protège du remodelage cardio-pulmonaire en réduisant l'hypertrophie du VD, la (néo)muscularisation et l'épaississement de la media des vaisseaux pulmonaires ainsi que l'inflammation et la fibrose du parenchyme pulmonaire. [280], [309]–[312] Dans notre étude, en accord avec les résultats déjà observés, les poumons des souris maintenues 4 jours en hypoxie et traitées à l'imatinib développent moins de (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires, contrairement aux souris contrôles, confirmant le rôle des PDGFR dans le remodelage vasculaire. Nous avons également démontré leur implication dans la prolifération des progéniteurs PW1⁺ et, grâce au traçage de lignage avec la β -galactosidase, dans leur différenciation en CML lors de l'HC.

Suite à des essais cliniques, l'imatinib a permis une amélioration des capacités hémodynamiques des patients, une amélioration fonctionnelle du VD et une meilleure performance au test de 6 minutes de marche. Malgré ces résultats, des effets secondaires délétères : insuffisance cardiaque, hématome subdural... sont apparus chez certains patients et ne permettent donc pas son utilisation thérapeutique pour l'HTAP. [298]–[301]

L'imatinib ayant un large spectre d'action et nos progéniteurs d'intérêts exprimant majoritairement PDGFR α , nous avons décidé de cibler plus spécifiquement ce récepteur. PDGFR α est connu pour son rôle dans l'embryogénèse et également pour son implication dans la prolifération et la migration de progéniteurs de CML dans le développement alvéolaire post-natal. [179], [188], [313], [314] En l'inhibant spécifiquement avec l'anticorps bloquant APA5, nous avons démontré pour la première fois son rôle prépondérant dans la mobilisation de progéniteurs vasculaires pulmonaires PW1⁺ lors des premiers jours d'HC ainsi que sa participation à la (néo)muscularisation.

Cependant, l'inhibition de PDGFR α lors d'une HC de 21 jours n'est pas suffisante pour prévenir l'augmentation de la PVD ni la (néo)muscularisation des vaisseaux pulmonaires. Cette dernière est cependant significativement réduite. En effet, suite à cette période d'HC, les souris présentent 40% de vaisseaux pulmonaires partiellement muscularisés et 40% de vaisseaux totalement muscularisés. A l'inverse, les souris traitées avec de l'APA5 n'ont plus que 27% de vaisseaux totalement muscularisés (versus 19% en normoxie) et 53% de vaisseaux partiellement muscularisés. Les faibles effets sur le long terme pourraient s'expliquer par une des limites de ce modèle expérimental. En effet, le développement de la pathologie expérimentale atteint rapidement un plateau et se stabilise à partir de 15 jours d'HC sans entraîner à terme de pathologie sévère ni la mort des souris. Dans le modèle d'HP plus sévère du rat MCT ou dans un modèle associant inhibiteur du récepteur au VEGF et HC (SU5416+HC), le développement de la pathologie est continu, avec un remodelage vasculaire pulmonaire plus sévère pouvant présenter des lésions de type plexiforme, et conduit à la mort du rat. Dans un tel modèle, le recrutement des acteurs cellulaires du remodelage vasculaire est permanent. Il serait donc intéressant de vérifier si l'inhibition de PDGFR α peut améliorer la survie des rats.

Une seconde explication possible est que le PDGF-B semble être le PDGF prépondérant dans l'HTAP et l'HP expérimentale. [50], [288] Or celui-ci peut activer aussi bien PDGFR α que PDGFR β . Ainsi, concernant les populations c-kit $^-$ et c-kit $^+$, même si la signalisation principale passe initialement et majoritairement par l'activation de PDGFR α , il est possible que, suite à l'inhibition de ce dernier, l'activation de PDGFR β prenne le relais au cours des 28 jours d'HC, même s'il est faiblement exprimé par ces progéniteurs PW1 $^+$ (31% des cellules c-kit $^-$ et 15% des cellules c-kit $^+$) (Data not shown). Nous avons également observé *in vitro* que la prolifération des progéniteurs PW1 $^+$ pouvait être induite avec du FGF2, dont le taux est augmenté *in vivo* (ARNm poumon entier) dès les premiers jours d'HC. (Data not shown) Il est donc possible que la signalisation PDGFR α et FGFR interagisse dans la régulation de leur prolifération cellulaire. De plus, il ne faut pas oublier que la 3 e population PW1 $^+$ identifiée est PDGFR α $^-$ et PDGFR β $^+$. Ainsi, même si les progéniteurs PW1 $^+$ semblent être une source majeure des nouvelles CML (40% de CML α SMA $^+$ / β -gal $^+$ en normoxie et 60% après 4 jours d'HC), ce constat ne permet pas de déterminer la proportion de cellules PW1 $^+$ /PDGFR α $^+$ ou PW1 $^+$ /PDGFR α $^-$ /PDGFR β $^+$ à l'origine des nouvelles CML.

Une 3 e explication est liée au fait que les progéniteurs PW1 $^+$ ne sont pas l'unique source de CML lors du remodelage. Différentes études ont également montré l'implication : des péricytes (non PW1 $^+$) via la voie du TGF β et du PDGFR β [43], [117], des CSM ABCG2 $^+$ suite à une altération de la voie Wnt/ β -caténine [68], d'une transition EndoMT régulée entre autre par l'axe PDGF-BB/TGF β (induction moins importante par le PDGF-AA) [315], sans oublier la prolifération des CML existantes suite notamment à l'activation de PDGFR β , TGF β , ET-1 récepteur. [109], [110]

Jusqu'à présent, l'essentiel des études concernant l'implication des PDGFR dans le remodelage vasculaire lors de l'HP *in vivo* utilisait de l'imatinib (inhibiteur de PDGFR, c-abl, c-kit) pour bloquer leur signalisation. On observait alors une protection contre l'établissement de l'HP, contrairement à notre étude où nous ciblons uniquement PDGFR α et par conséquent moins de types cellulaires impliqués dans le remodelage. Pour conclure, il ne semble donc pas absurde que l'inhibition seule de PDGFR α ne suffise pas à empêcher le développement d'un remodelage vasculaire ni d'une HP lors d'une HC. De plus, il est important de noter que le traitement avec l'APA5 a débuté avant l'exposition des souris à l'HC. Ainsi, l'aspect préventif et non curatif du traitement représente une limite de notre étude puisqu'il n'est pas envisageable de débiter un traitement préventif contre l'HTAP chez l'Homme.

Il serait également intéressant de vérifier si l'inhibition spécifique de PDGFR β a des conséquences similaires après 21 jours d'HC, à savoir une HP établie malgré une (néo)muscularisation atténuée. Cela permettrait également de déterminer la différence de pourcentage de musculation selon le récepteur inhibé et éventuellement d'estimer/hierarchiser l'importance de l'un ou l'autre PDGFR. Au vu de nos résultats entre imatinib et APA5 à 4 jours d'HC, nous pouvons déjà supposer que PDGFR α joue un rôle prépondérant dans la néomusculation précoce induite par HC, puisqu'à 4 jours d'hypoxie, le pourcentage de vaisseaux pulmonaires musculationnés est similaire avec les 2 inhibiteurs.

L'importance de PDGFR α dans l'initiation du remodelage des artérioles pulmonaires est également confirmée grâce au modèle inductible d'activation constitutive du récepteur. En effet, après 15 jours d'activation constitutive, on observe, en normoxie, la différenciation des progéniteurs PW1⁺/PDGFR α ⁺ en CML et une (néo)musculation des artérioles pulmonaires. Ce rôle initiateur est d'autant plus important que cette (néo)musculation n'est pas observée dans le modèle d'activation constitutive de PDGFR β , suggérant la nécessité d'un facteur complémentaire pour induire la prolifération des cellules et leur différenciation dans ce modèle. [283] Bien que les résultats *in vivo* suggèrent que PDGFR α régule également la différenciation des progéniteurs PW1⁺ en CML, nous n'avons pas obtenu un résultat similaire *in vitro* lors d'une stimulation des cellules par du PDGF-AA. Pourtant, dans le modèle inductible d'activation constitutive de PDGFR α , nous observons bien une augmentation de leur différenciation en CML. Il se pourrait donc qu'un 2^e facteur, exprimé en continu *in vivo* et non retrouvé dans le milieu de culture, soit nécessaire pour induire leur différenciation. L'un de ces facteurs est probablement SDF1, dont le rôle dans la différenciation des progéniteurs a été démontré précédemment. [12] Cependant l'analyse en single cell semble montrer qu'à l'état basal, les différentes populations de progéniteurs n'expriment pratiquement pas CXCR4 et pas du tout CXCR7, les deux récepteurs de SDF1. Le nombre de cellules exprimant CXCR4 augmente après 4j d'HC indiquant qu'effectivement SDF1 pourrait dans ces conditions participer à la différenciation de ces progéniteurs.

Il a également été montré que SDF1 promouvait la différenciation ostéogénique de CSM via la voie JAK/STAT, suggérant une possible interaction avec la signalisation de PDGFR α . [316]

Ce signal complémentaire peut également être d'ordre inflammatoire. En effet, une sécrétion importante de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β , IL-6...) survient lors des premières 48h d'HC. [317]–[319] Il est d'ailleurs proposé que l'élévation d'IL-6 initie le stress inflammatoire au cours des premières heures d'HC, tandis que son inhibition empêche la polarisation des macrophages alvéolaires de type M2 et le développement d'une HP. [319]. Il a également été démontré que l'IL-6 pouvait induire la prolifération des cellules satellites du muscle strié. [320] Bien que nous n'ayons pas réussi à initier la prolifération *in vitro* des progéniteurs pulmonaires PW1⁺ avec l'IL-6, il serait intéressant de stimuler les cellules en couplant le PDGF-AA et l'IL-6 ou SDF1 pour vérifier si leurs signaux sont nécessaires pour la différenciation. La piste inflammatoire est d'autant plus intéressante que l'on constate, avec l'analyse single-cell, une faible expression par les clusters 7A et 7B des récepteurs IL-6Ra, IL-1R et TNFR1a en normoxie. De plus, cette expression varie en hypoxie, avec une perte d'expression de l'IL-6Ra par le cluster 7 mais une augmentation d'expression de l'IL-1R1 par le cluster 7A, ainsi qu'une expression des récepteurs IL-1R et TNFRSF1a par le cluster MSC.

De même, nous pouvons supposer que le signal de prolifération induit par PDGFR α soit un prérequis au signal de PDGFR β qui serait plus impliqué dans la différenciation, expliquant ainsi les différences observées entre les modèles d'activation constitutive de PDGFR α et PDGFR β . Une manière de vérifier cette hypothèse serait de traiter les souris PDGFR α ^{+(S)/k} avec de l'imatinib qui n'impacte pas la signalisation du récepteur muté, et ainsi de vérifier si l'inhibition de PDGFR β empêche la différenciation des progéniteurs et prévient la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires.

De plus, chez les mâles uniquement, une HP se développe après 5 semaines d'activation constitutive de PDGFR α contrairement aux souris avec une activation constitutive de PDGFR β qui ne présentent ni d'augmentation de la PVD ni d'hypertrophie du VD [283]. Ainsi, la différence observée suite à l'activation de PDGFR α entre mâles et femelles laisse supposer que la mise en place de l'HP est totalement ou partiellement indépendante du remodelage vasculaire pulmonaire dans ce modèle. Un résultat similaire est obtenu lors de l'activation de PDGFR α par injection de son ligand spécifique : le PDGF-AA. Le mécanisme impliqué dans ce dimorphisme sexuel est inconnu mais pourrait être lié aux œstrogènes qui peuvent réguler le tonus vasculaire et qui ont une action cardioprotective sur le VD. [321] De manière générale, contrairement à l'humain, le sexe féminin est protecteur dans différents modèles classiques d'HP. En effet, dans le modèle d'HC, les femelles (rats et souris) présentent une plus faible augmentation de la PVD et de l'hypertrophie du VD.

Le rôle des œstrogènes dans cette protection a été mis en évidence avec des rats ovariectomisés, qui présentaient alors plus de remodelage cardiovasculaire et une plus forte augmentation de la PVD, ces effets étant annulés par un traitement aux œstrogènes. A l'inverse, l'administration d'œstrogènes à des souris mâles réduit l'hypertrophie du VD et l'augmentation de la PVD. L'HC contribue aussi à l'augmentation de l'hématocrite, rendant le sang plus visqueux ce qui augmente la pression sanguine. Or, il s'avère également que cette augmentation est plus faible chez les femelles.

Une meilleure adaptation du VD et une survie améliorée sont également observées chez les rats femelles dans le modèle combiné HC+SU5416. Concernant le modèle MCT, le rôle protecteur des œstrogènes a également été démontré avec des expériences d'ovariectomie ou avec des mâles recevant des œstrogènes. Une atténuation des modifications induites par la MCT est également observée lorsque les femelles ovariectomisées reçoivent de la progestérone. Dans le cas particulier de la MCT, l'effet protecteur est également lié à une plus faible activité du CYP3A hépatique qui métabolise la MCT. [321]

Les œstrogènes sont produits dans différents tissus et types cellulaires incluant les CE et les CML qui expriment également les récepteurs aux œstrogènes : ER α et β . [321]–[323] L'activation d'ER α et β dans les cellules endothéliales peut induire l'activation d'eNOS et celle d'ER β peut également activer la prostacycline synthase [324], augmentant ainsi la production de vasodilatateurs, et donc contrer la constriction liée au remodelage vasculaire. L'activation des ER inhibe également la prolifération des CML. Ainsi, nous pouvons très bien imaginer une boucle de production hormonale/activation des récepteurs ER au niveau vasculaire, avec des effets paracrines et/ou autocrines sur les CML pulmonaires chez les femelles. Cette boucle favoriserait ainsi une vasodilatation des vaisseaux pulmonaires, contrant les effets du remodelage vasculaire induit par l'activation constitutive de PDGFR α et prévenant l'établissement d'une HP chez les femelles. Au vu de ces données, il serait donc intéressant d'observer si l'activation constitutive de PDGFR α ou l'injection de PDGF-AA induit une HP et une hypertrophie du VD chez des femelles ovariectomisées, ou si l'injection d'œstrogènes chez les mâles prévient le développement de l'HP.

Cependant, l'analyse single-cell ne détecte pas d'expression d'ER α et β dans les cluster 7, MSC et CML, aussi bien en normoxie qu'en hypoxie, confirmant que le remodelage lié aux progéniteurs PW1⁺/PDGFR α ⁺ ne devrait pas être dépendant du sexe, similairement à ce que l'on observe dans nos 2 modèles murins.

Le modèle inductible d'activation constitutive de PDGFR α est également connu pour son effet pro-fibrosant dans de multiples organes. [188] Contrairement à ce qui a pu être observé après 6 mois d'activation constitutive du récepteur, les poumons des souris contrôles ou 5 semaines post-induction présentent le même degré de fibrose. Ces résultats renforcent l'idée que l'hypertension pulmonaire induite chez les mâles par l'activation constitutive de PDGFR α est liée au recrutement des progéniteurs PW1 $^+$ et non au développement d'une fibrose pulmonaire. De manière similaire, PDGFR α ne semble pas impliqué dans la régulation de la fibrose pulmonaire induite par HC, puisque les souris recevant de l'APA5 présentent le même degré de fibrose.

L'ensemble de nos résultats *in vivo* et *in vitro* prouve l'importance de la signalisation médiée par PDGFR α dans le recrutement précoce des progéniteurs pulmonaires vasculaires PW1 $^+$ /PDGFR α $^+$, leur différenciation en CML et leur implication dans la néomuscularisation des artérioles pulmonaires, participant ainsi à l'établissement d'une HP. (Fig 34)

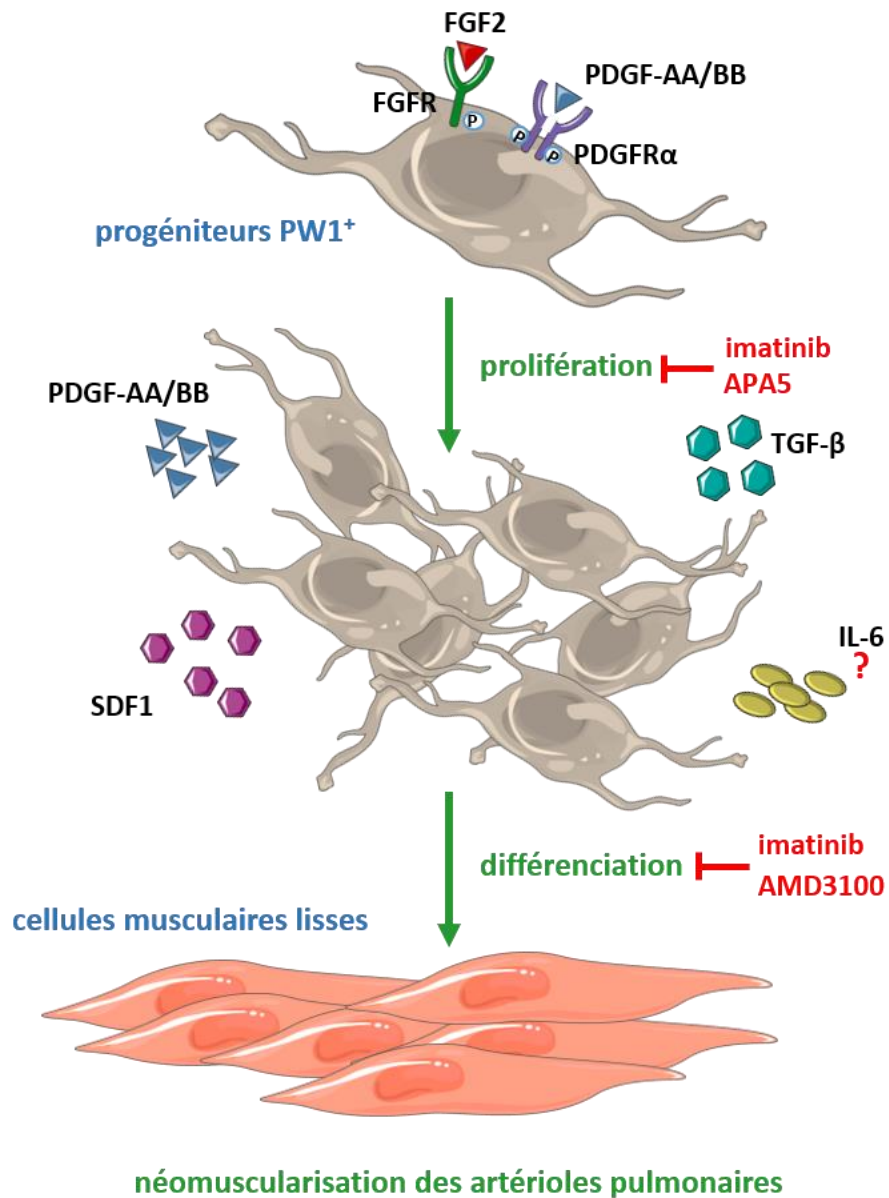


Figure 34 : Ensemble des facteurs connus impliqués dans la régulation des progéniteurs PW1⁺. Rôle de PDGFR α dans leur prolifération et leur différenciation en CML : implication dans la néomuscularisation des artérioles pulmonaires au cours de l'HTAP.

Sous l'action des PDGF ou du FGF2, les progéniteurs PW1⁺ prolifèrent. Différents facteurs vont ensuite induire leur différenciation en CML : PDGF, SDF1, TGF β , participant ainsi à la néomuscularisation des artérioles pulmonaires au cours de l'HTAP. APA5 : anticorps bloquant spécifique de PDGFR α ; AMD3100 : antagoniste de CXCR4, récepteur de SDF1.

Nos observations chez l'Homme suggèrent également le rôle de PDGFR α dans la régulation des progéniteurs PW1⁺. En effet, similairement à la souris en HC, le nombre de cellules périvasculaires PW1⁺/PDGFR α ⁺ est augmenté chez les patients HTAPi. De plus, il semblerait que le nombre de cellules vasculaires pulmonaires PW1⁺/ α SMA⁺/PDGFR α ⁺ augmente également. Cela pourrait s'expliquer par une mobilisation permanente des cellules PW1⁺/PDGFR α ⁺ qui exprimeraient α SMA lors de leur différenciation et participeraient ainsi au remodelage vasculaire pulmonaire. La provenance des prélèvements est une limite de notre étude puisqu'ils sont issus de poumons de patients à des stades tardifs de la pathologie, très sévères et très remodelés, contrairement à notre modèle expérimental qui étudie le développement de la pathologie à un temps précoce. Ces observations couplées à nos résultats expérimentaux renforcent l'idée que PDGFR α puisse être une cible thérapeutique potentielle, en complément des thérapies actuelles, afin de ralentir voire atténuer la (néo)muscularisation pulmonaire, et pourrait également avoir un impact bénéfique sur la fibrose adventitielle, contrairement à ce qui a été observé dans notre modèle d'HC.

Cibler PDGFR α est d'autant plus intéressant que plusieurs études d'inhibition de PDGFR α dans différents contextes pathologiques ont été ou sont menées. En cancérologie, l'utilisation d'Olaratumab (IMC-3G3), un anticorps monoclonal inhibant PDGFR α , seule ou en sus d'un traitement classique, semble améliorer l'efficacité thérapeutique de première intention. De plus, l'inhibition de PDGFR α en complément du Docetaxel, sur des lignées cellulaires de carcinomes ovariens, augmente la sensibilité de ces dernières au Docetaxel ainsi que leur apoptose. Chez les patients atteints de sarcomes des tissus mous, l'association de la Doxorubicine et de l'Olaratumab augmente la survie moyenne de ces patients. [325] Pour ceux atteints d'un sarcome indifférencié des tissus mous, la seule option thérapeutique à ce jour est la résection chirurgicale. Cependant, une équipe a récemment montré dans un nouveau modèle murin de xénogreffes que l'association de la Doxorubicine+Ifosfamide et de l'Olaratumab permettait de stopper le développement des tumeurs. [326] Chez des patients ayant un cancer gastro-intestinal avec une mutation de PDGFR α , l'Olaratumab semble également améliorer le contrôle de la progression de la pathologie (essais clinique de phase II). [327]

Ce projet pourrait se poursuivre par une analyse mécanistique de la signalisation de PDGFR α . En effet, tout comme PDGFR β , PDGFR α va transmettre son information via 4 voies principales : RasMAPK, PI3K/AKT, JAK/STAT et PLC γ /PKC, toutes impliquées dans la prolifération, migration et différenciation. Il est cependant fort probable qu'il y ait une hiérarchie de leur signalisation pour induire ces processus cellulaires. De plus, ces voies peuvent également être activées par d'autres récepteurs. Enfin, il sera peut-être difficile de détecter à partir d'un extrait protéique sur poumon total une différence d'activation des différentes voies entre souris traitées par APA5 et souris non traitées. En revanche, les cellules isolées puis placées *in vitro* en hypoxie permettraient d'orienter nos choix vers telle ou telle voie. L'utilisation de chambres de Boyden ou un Wound healing assay pourrait également permettre de déterminer la voie activée pour la migration cellulaire, suite à une stimulation par du PDGF-AA. Afin de déterminer l'action majeure ou spécifique d'une des 3 voies suite à une stimulation de PDGFR α par PDGF-AA ou en situation d'hypoxie, le milieu de culture pourrait donc être complété avec des inhibiteurs spécifiques : ruxolitinib, PD998059, Akt VIII inhibitor ou U73122 inhibant respectivement : JACK/STAT3, ERK1/2, AKT et PLC γ . (**Fig 35**) Nous pourrions alors étudier la prolifération avec un marquage Ki67, la différenciation avec un marquage α SMA, ainsi que la migration en chambre de Boyden. Cependant, il faut garder à l'esprit que la culture *in vitro* ne tiendrait pas compte du micro environnement *in vivo* qui peut fortement influencer les différentes signalisations cellulaires.

La famille Ras homologous (Rho) des petites protéines G est également une candidate potentielle. En effet, ces protéines sont impliquées dans la migration et la division cellulaire, et il a notamment été montré l'activation de la Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) par PDGFR α dans le glioblastome. [328] Suite à une stimulation par PDGF-A, PDGFR α induit la phosphorylation Src-dépendante de Dock180 qui promeut via Rac1 la croissance, la survie et l'invasion des cellules tumorales. L'activité de Rac1 est également stimulée par l'association directe entre PDGFR α et Dock180. (**Fig 35**) Rac1 peut également être activée par PI3K suite à l'activation de PDGFR α , médiant alors un signal de migration via PAK1. [329]

De plus, dans des CML bronchiales issues de biopsies de patients atteints d'asthme sévère, l'inhibition de Rac1, après une stimulation par du PDGF-B, inhibe l'activation de la voie JAK/STAT3 ainsi que la prolifération des cellules. [330] Enfin, Rac1 semble être un inhibiteur de l'expression d' α SMA dans certaines CSM. [331] Il se pourrait donc que PDGFR α induise la prolifération et migration des progéniteurs PW1⁺ en activant Rac1 via Dock180 ou via PI3K, qui à son tour transmettrait le signal via STAT3 et/ou PAK1. Afin de vérifier ces hypothèses, il faudrait tout d'abord confirmer l'activation de Rac1 dans les cellules progénitrices PW1⁺/PDGFR α ⁺ dans le modèle d'HC et le modèle inductible d'activation constitutive du récepteur.

Pour cela, nous pourrions réaliser un triple marquage PDGFR α , β -gal et RacGTP (forme activée) sur des poumons de souris en normoxie ou exposées à une HC, ainsi que des poumons de souris PDGFR $\alpha^{+(S)/k}$ induites et non induites. Suite à la confirmation d'une activation de Rac1 dans nos cellules cibles, il faudra réaliser à nouveau le triple marquage sur des souris hypoxiques traitées avec APA5, qui inhibe spécifiquement PDGFR α . Ces expériences devraient ainsi permettre de confirmer ou non l'activation de Rac1 par PDGFR α dans nos modèles. Dans un second temps, nous pourrions traiter des souris hypoxiques et des souris PDGFR $\alpha^{+(S)/k}$ induites avec un inhibiteur de Rac1 (EHT1864 ou NSC 23766) et valider l'inhibition de la prolifération des cellules PDGFR α^+ / β -gal $^+$ (triple marquage avec de l'EdU). En parallèle, nous pouvons regarder si cela impacte également leur différenciation en CML, en regardant la proportion de CML β -gal $^+$ dans les vaisseaux pulmonaires muscularisées entre souris traitées et souris contrôles.

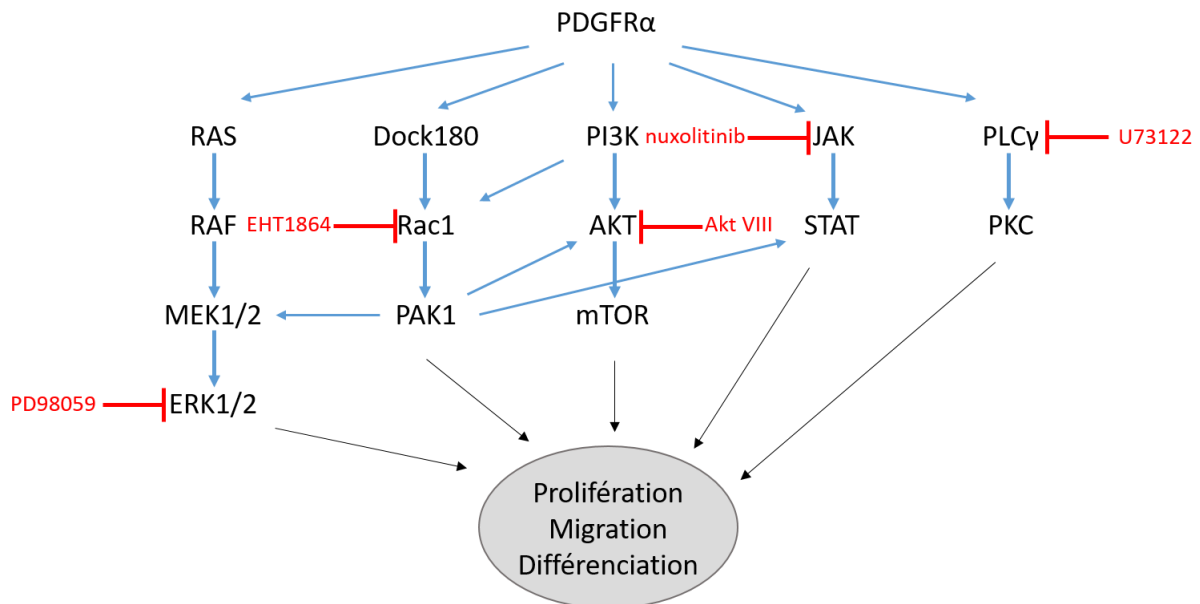


Figure 35 : Schéma des hypothèses mécanistiques de la signalisation de PDGFR α régulant la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire.

Les inhibiteurs des voies sont indiqués en rouge.

Le 2^e projet de ma thèse était la réalisation d'une analyse single-cell RNAseq sur l'ensemble des cellules pulmonaires CD45⁻/β-gal⁺, soit à la fois les progéniteurs PW1⁺ et les cellules issues de leur différenciation. Cette analyse consistait à déterminer les sous-populations de progéniteurs PW1⁺ et de comparer l'évolution des populations identifiées (progéniteurs et cellules différenciées) ainsi que leur transcriptome entre normoxie et hypoxie. Nous avons ainsi pu identifier 21 clusters en normoxie et 22 clusters en hypoxie. Nos analyses se sont concentrées sur l'étude des clusters mésenchymateux afin de faire corrélérer les résultats bio-informatiques du single-cell avec les résultats expérimentaux.

Concernant les analyses de trajectoire, les résultats ne sont pas particulièrement probants avec notre hypothèse initiale, à savoir que les clusters CSM, 7A et B soient des progéniteurs directs de CML. En effet, en normoxie, on retrouve plutôt une relation entre les clusters fibroblastes et CML, et une relation plus ténue entre CSM, 7A, 7B avec le cluster fibroblastes. Ces relations évoluent quelque peu en hypoxie, avec une relation plus directe mais faible entre les 3 clusters CSM, 7A, 7B et le cluster CML, mais surtout une très forte relation entre fibroblastes et CML. Il semble fort probable que l'essentiel des CML β-gal⁺ soit issu du cluster CSM qui passe préalablement par l'état intermédiaire du cluster fibroblastes PDGFRα⁺/β-gal⁺. Cet état n'est pas détectable *in vivo* avec les marqueurs que nous utilisons actuellement en immunofluorescence. En effet, le marquage immunofluorescent PW1/EdU permet de détecter les cellules progénitrices prolifératives appartenant, essentiellement, aux clusters CSM, 7A et B (sans distinction possible) tandis que le marquage immunofluorescent αSMA vasculaire couplé à celui de la β-gal ne cible que les CML issues des progéniteurs PW1⁺. Une autre limite de notre analyse qui pourrait expliquer la difficulté de visualiser une trajectoire plus directe et forte entre le cluster CML et les clusters CSM, 7A et B, est le très faible nombre de cellules détectées et identifiées comme CML (23 cellules en normoxie et 17 cellules en hypoxie). En effet, avec un plus grand nombre de cellules, un plus grand nombre de gènes exprimés aurait pu être détecté et notamment des gènes plus faiblement exprimés pouvant traduire l'origine « souche/progénitrice » de la cellule analysée. Ainsi, un plus grand nombre de CML et donc de gènes analysés aurait pu permettre de renforcer certaines trajectoires entre nos clusters mésenchymateux, et nos hypothèses de départ.

Nous avons ensuite cherché à faire correspondre les 3 clusters mésenchymateux au profil de progéniteur : 7A, 7B et CSM respectivement avec nos 3 populations PW1⁺ isolées par FACS : c-kit⁺, péricytes, c-kit⁻. Pour cela, une analyse différentielle d'expression de gènes entre ces 3 clusters a permis de définir une liste de marqueurs discriminants : Scara5, CD248, Scn3a, Slc36a2, Itga8, PDGFRα, c-kit.

Itga8 est impliquée dans la communication cellule-cellule, les interactions avec la MEC et la migration cellulaire. Cette intégrine est exprimée dans les cellules mésenchymateuses, essentiellement par les CML et plus particulièrement les CML aortiques. [332] Il se peut qu'au cours de l'HC, Itga8 participe à la prolifération des CML, suite à son activation par la ténascine C. [332] Similairement au cluster 7B, que nous associons à la population péricytaire PW1⁺, Itga8 a également été définie comme marqueur d'une sous-population de cellules étoilées hépatiques de type péricytaire. [333] De plus, dans 2 lignées cellulaires de Myélomes multiples, la surexpression d'Itga8 entraîne une transition épithélio-mésenchymateuse, avec l'acquisition de marqueurs de CS tel qu'OCT4, et une surexpression de PDGFR α et β , renforçant son potentiel rôle de marqueur de progéniteurs. [334] Sa signalisation est également impliquée dans diverses pathologies fibrotiques (pulmonaire, rénale, hépatique) avec cependant des effets opposés. En effet, son activation semble réduire la fibrose rénale en limitant l'activation des fibroblastes [335] et à l'inverse, elle semble promouvoir la fibrose hépatique en favorisant la différenciation des cellules étoilées hépatiques (péricytes) en myofibroblastes. [333], [336] Dans les 2 cas, Itga8 semble produire ses effets en régulant la signalisation de TGF β . Concernant la fibrose pulmonaire, son rôle n'est pas totalement défini, avec des effets anti-fibrosant *in vitro*, mais sans impact apparent *in vivo*. Il est cependant à noter, qu'il s'agit d'une étude de délétion d'Itga8 spécifiquement et uniquement dans les cellules PDGFR β ⁺, ce qui peut expliquer l'absence d'effet visible *in vivo*. [337] Au vu de ces différents résultats, il serait donc intéressant de déterminer si Itga8 participe au maintien des progéniteurs pulmonaires PW1⁺ (cluster 7) dans un état indifférencié ou si elle permet leur différenciation en CML/myofibroblastes, en régulant la signalisation des PDGFR.

De plus, dans notre analyse bio-informatique, nous avons constaté une exclusion d'expression entre Itga8 (cluster 7) et CD248 (cluster MSC), qui a également été décrite dans 2 populations fibroblastiques pulmonaires chez la souris et chez l'Homme. [338] Il serait intéressant de rapprocher les 2 populations fibroblastiques de cette étude avec nos progéniteurs PW1⁺, d'autant plus que dans les 2 cas, les cellules expriment également, à des niveaux variables, Sca1. [338] CD248 (ou TEM1) peut également s'associer à PDGFR α et favoriser la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes ainsi que la production de collagène. [211] Une telle interaction pourrait donc intervenir au sein des cellules de la population c-kit-/cluster MSC, contribuant à leur différenciation. De plus, CD248 est particulièrement exprimée par les péricytes et contrôle, *in vitro*, leur prolifération via la régulation de la phosphorylation de ERK1/2 induite suite à l'activation des PDGFR par le PDGF-BB. [339], [340] Ainsi, similairement à la littérature, nous avons observé que les péricytes PDGFR β ⁺/PW1⁺ exprimaient également CD248. Cette interaction/régulation n'est cependant pas indispensable à la régulation des péricytes puisque les souris déficientes en CD248 sont viables et ne présentent pas d'instabilités vasculaires contrairement aux souris déficiente en PDGF-B ou PDGFR β . [341]

Scara5 est une protéine importante pour la migration et l'invasion des cellules cancéreuses et régule également positivement la prolifération des CML induite par PDGF-BB. En effet, *in vitro*, l'inhibition de Scara5 par siARN inhibe l'activation de PDGFR β par le PDGF-BB ainsi que la prolifération des CML. [252] Les progéniteurs pulmonaires PW1⁺ exprimant majoritairement PDGFR α , il serait intéressant de vérifier si une interaction similaire s'effectue entre Scara5 et PDGFR α .

Initialement choisis comme marqueurs membranaires discriminant les clusters 7 et MSC, il s'avère qu'Itga8, CD248 et Scara5 présentent des fonctions pouvant être impliquée dans la prolifération, la différenciation des progéniteurs et dans leur capacité migratoire, et par conséquent dans leur recrutement au cours de l'HP expérimentale et/ou de l'HTAP. D'autres marqueurs sécrétés ou intracellulaires ont aussi été identifiés comme spécifique des populations 7 et MSC mais ils n'ont pas encore pu être vérifiés. Ils constituent eux aussi des molécules potentiellement importantes pour la fonction progénitrice de ces cellules.

Cette liste de marqueurs a ensuite été testée par marquage immunofluorescent sur les populations correspondantes, en sortie de FACS. Les résultats des marquages ne sont pas particulièrement concordants avec les résultats bio-informatiques et n'ont pas permis à ce jour de confirmer nos hypothèses. L'analyse single-cell est probablement plus stricte et discriminatoire que le tri cellulaire par cytométrie en flux. En effet, elle se base sur l'expression de nombreux gènes permettant l'identification plus précise de différents types cellulaires tandis que le FACS, réalisé uniquement sur 3 marqueurs, est potentiellement moins précis et nos 3 populations cellulaires pourraient, éventuellement, chacune englober différents clusters. Cela pourrait en partie expliquer la différence observée entre l'expression des ARNm des clusters et la présence ou non des protéines à la surface des cellules issues du FACS. De même, il est possible que certains gènes soient transcrits (single-cell) mais non traduits, ou à l'inverse, des protéines possédant une longue demi-vie soient présentes (populations cellulaires) sans pour autant que l'ARNm soit transcrit ou soit détectable par single-cell (faible expression du gène). Pour pallier à cette question, il faudrait réaliser des PCR avec les amorces correspondant aux gènes de la liste de marqueurs identifiés sur les ADNc obtenus des ARNm extraits des cellules isolées par FACS. L'identification de ces marqueurs avait un second but, à savoir leur utilisation chez le rat et sur des biopsies humaines pour pouvoir isoler les progéniteurs PW1⁺ indépendamment de la β -galactosidase non présente chez l'Homme et le rat. En termes de technique et de disponibilité des Ac, nous pourrions trier les cellules en associant les marqueurs CD45 (sélection négative), CD34 (sélection positive) puis une combinaison de sélection positive ou négative sur les marqueurs c-kit, PDGFR α et CD248 ou Scara5.

Afin d'approfondir le lien entre cluster et cellules *in vivo*, des marquages immunofluorescents préliminaires des marqueurs identifiés par analyse informatique (Scara5, Scn3a, CD248, PDGFR α) ont été effectués sur cryosections pulmonaires de souris. Bien que le résultat du co-marquage CD248/Scara 5 soit encourageant, nos premiers résultats ne permettent pas encore d'étayer notre hypothèse de corrélation entre les 3 clusters mésenchymateux MSC, 7A, 7B et les 3 populations cellulaires de FACS : c-kit⁺, c-kit⁻, péricytes. En effet, de nombreux autres co-marquages avec notamment la β -gal, c-kit, PW1, Scn3a et Itga8 sont nécessaires pour approfondir ces liens. En combinant des données PCR (cellules FACS), des triples marquages pour confirmer les co-expressions et estimer des proportions cellulaires (immunofluorescence sur cryosection), et enfin prendre en compte les proportions cellulaires des 3 populations d'intérêts obtenues lors des FACS, nous pourrions mieux superposer les données bio-informatiques et les données expérimentales *in vivo*.

Lors de l'étude précédente, très peu de CE β -gal⁺ avaient été observées par marquage immunofluorescent sur cryosections pulmonaires murines. [12] Ce fut donc avec étonnement que nous identifîâmes 4 clusters de CE en normoxie et 5 clusters de CE en hypoxie, représentant près de 19% et 10% des cellules identifiées, respectivement en normoxie et hypoxie. La différence de 50% entre les 2 conditions pourrait s'expliquer par une apoptose importante des CE, induite par l'HC. Il serait donc intéressant d'étudier l'expression des différents marqueurs de la voie de l'apoptose dans les clusters endothéliaux et de déterminer par analyse différentielle s'ils sont effectivement plus exprimés en hypoxie qu'en normoxie. De plus, en condition hypoxique, un 5^e cluster de CE apparaît. Ce cluster regroupe près de 66% des CE (vs 0% en normoxie) alors qu'en normoxie le cluster majoritaire était le Capillary 2, regroupant 88% des CE contre seulement 12% en hypoxie. On peut supposer que les cellules du cluster capillary2 ont adopté un nouveau phénotype transcriptionnel induit par l'hypoxie, devenant ainsi le nouveau cluster CE hypox. Cette hypothèse est soutenue par l'analyse de trajectoire en hypoxie (**Fig 27**) sur laquelle nous pouvons constater une forte relation entre ces 2 clusters.

Une autre découverte intéressante est la double appartenance du cluster 7A qui exprime à la fois des marqueurs de CML/péricytes ainsi que des marqueurs endothéliaux. Cela semble signer une bi-potentialité de ces cellules en terme de différenciation vers les CML ou vers les CE. Suite à notre hypothèse selon laquelle le cluster 7A correspondrait à la population c-kit⁺, nous avons donc initié leur différenciation en CE. Nous avons ainsi observé quelques cellules CD31⁺ et vwf⁺ organisées en structure pseudo tubulaire. Précédemment, nous avons déjà pu les différencier en CML-like α SMA⁺, sous induction combinée du PDGF-BB et du TGF β . (FD 2016) Ces résultats renforcent ainsi l'idée selon laquelle la population c-kit⁺, ou du moins une partie, correspondrait au cluster 7A et suggèrent fortement leur bi-potentialité.

Cependant, au vu du faible nombre de cellules vwf^+ ou $CD31^+$ observé, il faudrait confirmer que ce sont bien les mêmes cellules qui peuvent se différencier à la fois en CE et en CML et non une sous-population au sein de la population $c-kit^+$ qui se différencie uniquement en CE. La possibilité d'obtenir à la fois des CE et des CML à partir d'une même population de cellules progénitrices a également été décrit et démontré *in vitro* par Hill *et al.* à partir de CS embryonnaires humaines. Cependant, il semblerait plutôt que le phénomène décrit soit dû à une transition EndoMT puisque l'équipe initie la différenciation des CS en CE puis change les conditions de culture afin d'obtenir des CML. [342] En revanche, Ferreira *et al.* ont initié la différenciation de CS embryonnaires humaines directement en CE ou en CML. [96] Une limite de ces 2 études est associée à l'origine des CS utilisées puisqu'il s'agit de lignées commerciales et non d'une population cellulaire isolée par cytométrie en flux avec des marqueurs bien définis à partir de biopsies ou autres prélèvements. Plus récemment, une sous-population $CD45^-/CD31^+/VEGFR2^-$ de la side population (SP) pulmonaire a été isolée et décrite comme ayant la capacité de se différencier *in vitro* en CML ou en CE. [343] Une origine commune de certaines CML et CE a également pu être démontrée *in vivo*, grâce à un modèle murin de traçage de lignage de progéniteurs neuronaux $GFAP^+$. Similairement aux progéniteurs $PW1^+$, il semblerait, *in vivo*, que ces progéniteurs neuronaux $GFAP^+$ se différencient préférentiellement en CML, constituant une source majeure de CML ($\approx 30\%$) au niveau de l'artère carotide, de l'arc aortique et de l'aorte thoracique. A l'inverse, de rares CE issues de ces progéniteurs $GFAP^+$ sont observées uniquement au niveau de l'arc aortique. Cependant, la forte proportion de cette population spécifique de CML n'est pas retrouvée dans tous les lits vasculaires : 10% et 2% des CML respectivement de l'aorte ascendante et de l'aorte abdominale. De plus, au niveau de l'artère fémorale on observe un résultat inverse avec 0% de CML mais 15% de CE issues de ces progéniteurs neuronaux. [344] L'ensemble de ces études et nos résultats supportent fortement l'existence de cellules progénitrices communes aux CML et aux CE. Leur existence chez l'Homme est encore débattue, cependant, Shafiee *et al.* ont récemment isolé à partir de placenta humain des progéniteurs $CD45^-/CD34^+/CD144^+/CD31^{low}$ possédant la double capacité de se différencier en CML ou CE *in vitro*. [345]

Pour conclure, le principal apport de notre single-cell est l'identification des sous-populations de progéniteurs $PW1^+$ rendue possible par une sélection en amont des cellules $CD45^-/\beta-gal^+$. En effet, ces populations ne sont pas retrouvées dans les single-cell sur poumon entier, et lorsqu'on s'intéresse à l'expression des marqueurs que nous avons identifiés, il s'avère que les cellules positives pour les marqueurs d'intérêts sont regroupées dans une petite sous-population de cellules regroupées sous le terme de « fibroblastes » (site LungGENS). Notre analyse single-cell des progéniteurs aurait potentiellement pu être améliorée si nous avions également écarté les cellules épithéliales lors du tri cellulaire sélectif.

Son analyse demande encore beaucoup d'investissement pour finaliser nos hypothèses sur les clusters mésenchymateux et pour compléter l'étude des voies régulées par l'HC dans les cellules progénitrices, dont les résultats préliminaires font ressortir des voies liées à la MEC. Des analyses sont également nécessaires pour explorer l'aspect endothélial dont l'évolution est la plus marquée entre les 2 conditions étudiées.

L'ensemble de cette thèse améliore notre connaissance des différentes populations de progéniteurs PW1⁺. La première partie a été développée autour de marqueurs de progéniteurs définis a priori (marqueurs candidats issus de la bibliographie) au début du projet d'étude des progéniteurs dans l'HTAP (PW1, CD34, PDGFR α , c-kit). Les résultats obtenus à partir de l'analyse single cell, sans a priori, nous permettent d'identifier de nouveaux marqueurs cellulaires pour discriminer les différentes populations PW1⁺ qui dévoilent que les populations identifiées initialement sont probablement plus intriquées au niveau de leur transcriptome que ce que les partitions simplistes issues des analyses par cytométrie en flux laissaient présager. La validation *in situ* de ces marqueurs pourra ainsi permettre d'étudier les progéniteurs PW1⁺ dans d'autres modèles animaux tel que le rat MCT, mais également permettre une exploration chez l'Homme plus approfondie, avec notamment des tris cellulaires ainsi que des études *in vitro*. Enfin, l'analyse des effets de l'hypoxie sur les profils d'expression des différents clusters ajoutera une compréhension complémentaire à la première partie de ce mémoire concernant les différents mécanismes impliqués dans la régulation des progéniteurs ainsi que dans l'établissement de l'HTAP.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] A. N'Guessan, « Développement de vecteurs microparticulaires pour l'administration pulmonaire de corticostéroïdes », p. 145.
- [2] G. Simonneau *et al.*, « Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 53, n° 1, p. 1801913, janv. 2019, doi: 10.1183/13993003.01913-2018.
- [3] P. M. Humbert et D. J.-P. Madiou, « Supplément au vol. XXII - n° 1 janvier-février 2019 », p. 12.
- [4] E. M. T. Lau, E. Giannoulatou, D. S. Celermajer, et M. Humbert, « Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension », *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 14, n° 10, p. 603-614, oct. 2017, doi: 10.1038/nrcardio.2017.84.
- [5] A. Chaouat et M. Humbert, « Remodelage vasculaire pulmonaire », n° 1, p. 7, 2003.
- [6] « item_222_HTAP-2.pdf Collège des enseignants de pneumologie. 2017. <http://cep.splf.fr> ».
- [7] « respifil_pnds_htap_2020.pdf <https://www.has-sante.fr> ».
- [8] « 2016 - Livret Patients.pdf www.htapfrance.com ».
- [9] L. Guillevin *et al.*, « Understanding the impact of pulmonary arterial hypertension on patients' and carers' lives », *Eur. Respir. Rev.*, vol. 22, n° 130, p. 535-542, déc. 2013, doi: 10.1183/09059180.00005713.
- [10] Z. Zhai *et al.*, « The impact and financial burden of pulmonary arterial hypertension on patients and caregivers: results from a national survey », *Medicine (Baltimore)*, vol. 96, n° 39, p. e6783, sept. 2017, doi: 10.1097/MD.0000000000006783.
- [11] M. Delcroix et L. Howard, « Pulmonary arterial hypertension: the burden of disease and impact on quality of life », *Eur. Respir. Rev.*, vol. 24, n° 138, p. 621-629, déc. 2015, doi: 10.1183/16000617.0063-2015.
- [12] F. Dierick *et al.*, « Resident PW1+ Progenitor Cells Participate in Vascular Remodeling During Pulmonary Arterial Hypertension », p. 12.
- [13] M. Rabinovitch, « Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension », p. 8.
- [14] S. C. Pugliese, J. M. Poth, M. A. Fini, A. Olschewski, K. C. El Kasmi, et K. R. Stenmark, « The role of inflammation in hypoxic pulmonary hypertension: from cellular mechanisms to clinical phenotypes », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 308, n° 3, p. L229-L252, févr. 2015, doi: 10.1152/ajplung.00238.2014.
- [15] A. Giaid *et al.*, « Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 328, n° 24, p. 1732-1739, juin 1993, doi: 10.1056/NEJM199306173282402.
- [16] B. W. Christman *et al.*, « An Imbalance between the Excretion of Thromboxane and Prostacyclin Metabolites in Pulmonary Hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 327, n° 2, p. 70-75, juill. 1992, doi: 10.1056/NEJM199207093270202.
- [17] P. Egermayer, G. I. Town, et A. J. Peacock, « Role of serotonin in the pathogenesis of acute and chronic pulmonary hypertension », *Thorax*, vol. 54, n° 2, p. 161-168, févr. 1999, doi: 10.1136/thx.54.2.161.
- [18] A. Giaid et D. Saleh, « Reduced Expression of Endothelial Nitric Oxide Synthase in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension », *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, n° 4, p. 214-221, juill. 1995, doi: 10.1056/NEJM199507273330403.
- [19] W. Xu *et al.*, « Increased arginase II and decreased NO synthesis in endothelial cells of patients with pulmonary arterial hypertension », *FASEB J.*, vol. 18, n° 14, p. 1746-1748, nov. 2004, doi: 10.1096/fj.04-2317fje.
- [20] F. A. Masri *et al.*, « Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 293, n° 3, p. L548-L554, sept. 2007, doi: 10.1152/ajplung.00428.2006.
- [21] A. Chaouat, E. Weitzenblum, et T. Higenbottam, « The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 9, n° 2, p. 356-363, févr. 1996, doi: 10.1183/09031936.96.09020356.
- [22] D. Gomez et G. K. Owens, « Smooth muscle cell phenotypic switching in atherosclerosis », *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, n° 2, p. 156-164, juill. 2012, doi: 10.1093/cvr/cvs115.

- [23] T. Yoshida et G. K. Owens, « Molecular Determinants of Vascular Smooth Muscle Cell Diversity », *Circ. Res.*, vol. 96, n° 3, p. 280-291, févr. 2005, doi: 10.1161/01.RES.0000155951.62152.2e.
- [24] S. Wedgwood et S. M. Black, « Molecular mechanisms of nitric oxide-induced growth arrest and apoptosis in fetal pulmonary arterial smooth muscle cells », *Nitric Oxide*, vol. 9, n° 4, p. 201-210, déc. 2003, doi: 10.1016/j.niox.2003.11.005.
- [25] P. Mainali, H. Jin, Y. Tian, C. Tang, et J. Du, « Mechanisms responsible for pulmonary hypertension », *Chin. Med. J. (Engl.)*, vol. 121, n° 24, p. 2604-2609, déc. 2008, doi: 10.1097/00029330-200812020-00024.
- [26] P. Yildiz, « Molecular mechanisms of pulmonary hypertension », *Clin. Chim. Acta*, vol. 403, n° 1-2, p. 9-16, mai 2009, doi: 10.1016/j.cca.2009.01.018.
- [27] R. Nogueira-Ferreira, R. Ferreira, et T. Henriques-Coelho, « Cellular interplay in pulmonary arterial hypertension: Implications for new therapies », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1843, n° 5, p. 885-893, mai 2014, doi: 10.1016/j.bbamcr.2014.01.030.
- [28] Y. Hara *et al.*, « Inhibition of MRP4 prevents and reverses pulmonary hypertension in mice », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n° 7, p. 2888-2897, juill. 2011, doi: 10.1172/JCI45023.
- [29] K. N. Farrow *et al.*, « SOD and inhaled nitric oxide normalize phosphodiesterase 5 expression and activity in neonatal lambs with persistent pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 299, n° 1, p. L109-L116, juill. 2010, doi: 10.1152/ajplung.00309.2009.
- [30] G. Hansmann *et al.*, « An antiproliferative BMP-2/PPAR γ /apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension », *J. Clin. Invest.*, vol. 118, n° 5, p. 1846-1857, mai 2008, doi: 10.1172/JCI32503.
- [31] K. Thompson, J. Kobayashi, T. Childs, D. Wigle, et M. Rabinovitch, « Endothelial and serum factors which include apolipoprotein A1 tether elastin to smooth muscle cells inducing serine elastase activity via tyrosine kinase-mediated transcription and translation », p. 12.
- [32] A. J. Sweatt *et al.*, « Severe Pulmonary Arterial Hypertension Is Characterized by Increased Neutrophil Elastase and Relative Elafin Deficiency », *Chest*, p. S0012369221012551, juin 2021, doi: 10.1016/j.chest.2021.06.028.
- [33] S. Abid *et al.*, « CCR2/CCR5-mediated macrophage–smooth muscle cell crosstalk in pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 54, n° 4, p. 1802308, oct. 2019, doi: 10.1183/13993003.02308-2018.
- [34] P. Crosswhite et Z. Sun, « Molecular Mechanisms of Pulmonary Arterial Remodeling », *Mol. Med.*, vol. 20, n° 1, p. 191-201, janv. 2014, doi: 10.2119/molmed.2013.00165.
- [35] M. Humbert, D. Montani, F. Perros, P. Dorfmüller, S. Adnot, et S. Eddahibi, « Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension », *Vascul. Pharmacol.*, vol. 49, n° 4-6, p. 113-118, oct. 2008, doi: 10.1016/j.vph.2008.06.003.
- [36] P. Herve *et al.*, « PATHOBIOLOGY OF PULMONARY HYPERTENSION », p. 8.
- [37] K. S. Zanjani, « Platelets in Pulmonary Hypertension: a Causative Role or a Simple Association? », *Iran J Pediatr*, vol. 22, n° 2, p. 13, 2012.
- [38] K. R. Stenmark, N. Davie, M. Frid, E. Gerasimovskaya, et M. Das, « Role of the Adventitia in Pulmonary Vascular Remodeling », *Physiology*, vol. 21, n° 2, p. 134-145, avr. 2006, doi: 10.1152/physiol.00053.2005.
- [39] « Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche », *Histol. Histopathol.*, n° 24, p. 909-969, mai 2009, doi: 10.14670/HH-24.909.
- [40] R. Balabanov, R. Washington, J. Wagnerova, et P. Dore-Duffy, « CNS Microvascular Pericytes Express Macrophage-like Function, Cell Surface Integrin α M, and Macrophage Marker ED-2 », p. 16, 1971.
- [41] W. E. Thomas, « Brain macrophages: on the role of pericytes and perivascular cells », *Brain Res. Rev.*, vol. 31, n° 1, p. 42-57, déc. 1999, doi: 10.1016/S0165-0173(99)00024-7.

- [42] C. N. Hall *et al.*, « Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease », *Nature*, vol. 508, n° 7494, p. 55-60, avr. 2014, doi: 10.1038/nature13165.
- [43] N. Ricard *et al.*, « Increased Pericyte Coverage Mediated by Endothelial-Derived Fibroblast Growth Factor-2 and Interleukin-6 Is a Source of Smooth Muscle–Like Cells in Pulmonary Hypertension », *Circulation*, vol. 129, n° 15, p. 1586-1597, avr. 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007469.
- [44] C. Guignabert et P. Dorfmüller, « Pathology and Pathobiology of Pulmonary Hypertension », *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 38, n° 05, p. 571-584, oct. 2017, doi: 10.1055/s-0037-1606214.
- [45] P. Herve *et al.*, « Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: Role of serotonin », *Am. J. Med.*, vol. 89, n° 1, p. 117-120, juill. 1990, doi: 10.1016/0002-9343(90)90111-P.
- [46] E. Marcos *et al.*, « Serotonin-Induced Smooth Muscle Hyperplasia in Various Forms of Human Pulmonary Hypertension », *Circ. Res.*, vol. 94, n° 9, p. 1263-1270, mai 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000126847.27660.69.
- [47] H. Le Ribeuz, V. Capuano, B. Girerd, M. Humbert, D. Montani, et F. Antigny, « Implication of Potassium Channels in the Pathophysiology of Pulmonary Arterial Hypertension », *Biomolecules*, vol. 10, n° 9, p. 1261, sept. 2020, doi: 10.3390/biom10091261.
- [48] R. Geiger, R. M. F. Berger, et J. Hess, « Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease », *J Pathol*, p. 6, 2000.
- [49] R. M. Tuder *et al.*, « Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis », *J. Pathol.*, vol. 195, n° 3, p. 367-374, oct. 2001, doi: 10.1002/path.953.
- [50] F. Perros *et al.*, « Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 178, n° 1, p. 81-88, juill. 2008, doi: 10.1164/rccm.200707-1037OC.
- [51] L. Tu et C. Guignabert, « Emerging Molecular Targets for Anti-proliferative Strategies in Pulmonary Arterial Hypertension », in *Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension*, vol. 218, M. Humbert, O. V. Evgenov, et J.-P. Stasch, Éd. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 409-436. doi: 10.1007/978-3-662-45805-1_17.
- [52] S. Bonnet *et al.*, « The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 104, n° 27, p. 11418-11423, juill. 2007, doi: 10.1073/pnas.0610467104.
- [53] F. Macian, « NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function », *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 5, n° 6, p. 472-484, juin 2005, doi: 10.1038/nri1632.
- [54] C. F. Rossow, E. Minami, E. G. Chase, C. E. Murry, et L. F. Santana, « NFATc3-Induced Reductions in Voltage-Gated K⁺ Currents After Myocardial Infarction », *Circ. Res.*, vol. 94, n° 10, p. 1340-1350, mai 2004, doi: 10.1161/01.RES.0000128406.08418.34.
- [55] P. B. Bushdid, H. Osinska, R. R. Waclaw, J. D. Molkenin, et K. E. Yutzey, « NFATc3 and NFATc4 Are Required for Cardiac Development and Mitochondrial Function », *Circ. Res.*, vol. 92, n° 12, p. 1305-1313, juin 2003, doi: 10.1161/01.RES.0000077045.84609.9F.
- [56] L. E. Huang, J. Gu, M. Schau, et H. F. Bunn, « Regulation of hypoxia-inducible factor 1 is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 95, n° 14, p. 7987-7992, juill. 1998, doi: 10.1073/pnas.95.14.7987.
- [57] M. Ivan *et al.*, « HIF α Targeted for VHL-Mediated Destruction by Proline Hydroxylation: Implications for O₂ Sensing », *Science*, vol. 292, n° 5516, p. 464-468, avr. 2001, doi: 10.1126/science.1059817.
- [58] K. Schultz, B. L. Fanburg, et D. Beasley, « Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 α promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 290, n° 6, p. H2528-H2534, juin 2006, doi: 10.1152/ajpheart.01077.2005.

- [59] S. Pisarcik *et al.*, « Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1 », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 304, n° 8, p. L549-L561, avr. 2013, doi: 10.1152/ajplung.00081.2012.
- [60] M. G. Davies *et al.*, « Effect of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α and β Blockade on Flow-Induced Neointimal Formation in Endothelialized Baboon Vascular Grafts », p. 9.
- [61] C. Guignabert, S. Bailly, et M. Humbert, « Restoring BMPRII functions in pulmonary arterial hypertension: opportunities, challenges and limitations », *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 21, n° 2, p. 181-190, févr. 2017, doi: 10.1080/14728222.2017.1275567.
- [62] K. B. Lane *et al.*, « Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension », *Nat. Genet.*, vol. 26, n° 1, p. 81-84, sept. 2000, doi: 10.1038/79226.
- [63] Z. Deng *et al.*, « Fine Mapping of *PPH1*, a Gene for Familial Primary Pulmonary Hypertension, to a 3-cM Region on Chromosome 2q33 », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 161, n° 3, p. 1055-1059, mars 2000, doi: 10.1164/ajrccm.161.3.9906051.
- [64] O. Eickelberg et R. E. Morty, « Transforming Growth Factor β /Bone Morphogenetic Protein Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension: Remodeling Revisited », *Trends Cardiovasc. Med.*, vol. 17, n° 8, p. 263-269, nov. 2007, doi: 10.1016/j.tcm.2007.09.003.
- [65] R. J. Davies et N. W. Morrell, « Molecular Mechanisms of Pulmonary Arterial Hypertension », *Chest*, vol. 134, n° 6, p. 1271-1277, déc. 2008, doi: 10.1378/chest.08-1341.
- [66] C. G. Elliott, « Genetics of Pulmonary Arterial Hypertension », *Clin. Chest Med.*, vol. 34, n° 4, p. 651-663, déc. 2013, doi: 10.1016/j.ccm.2013.08.003.
- [67] B. Girerd, E. Lau, D. Montani, et M. Humbert, « Genetics of pulmonary hypertension in the clinic », *Curr. Opin. Pulm. Med.*, vol. 23, n° 5, p. 386-391, sept. 2017, doi: 10.1097/MCP.0000000000000414.
- [68] K. Chow *et al.*, « Dysfunctional resident lung mesenchymal stem cells contribute to pulmonary microvascular remodeling », *Pulm. Circ.*, vol. 3, n° 1, p. 31-49, janv. 2013, doi: 10.4103/2045-8932.109912.
- [69] L. Long *et al.*, « Chloroquine Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension via Inhibition of Autophagy and Lysosomal Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Degradation », *Circ. Res.*, vol. 112, n° 8, p. 1159-1170, avr. 2013, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.300483.
- [70] E. Austin et J. Loyd, « Heritable Forms of Pulmonary Arterial Hypertension », *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 34, n° 05, p. 568-580, sept. 2013, doi: 10.1055/s-0033-1355443.
- [71] B. Tielemans, M. Delcroix, C. Belge, et R. Quarck, « TGF β and BMPRII signalling pathways in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension », *Drug Discov. Today*, vol. 24, n° 3, p. 703-716, mars 2019, doi: 10.1016/j.drudis.2018.12.001.
- [72] A. Chida *et al.*, « Missense Mutations of the *BMPR1B* (*ALK6*) Gene in Childhood Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Circ. J.*, vol. 76, n° 6, p. 1501-1508, 2012, doi: 10.1253/circj.CJ-11-1281.
- [73] R. D. Minshall, W. C. Sessa, R. V. Stan, R. G. W. Anderson, et A. B. Malik, « Caveolin regulation of endothelial function », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 285, n° 6, p. L1179-L1183, déc. 2003, doi: 10.1152/ajplung.00242.2003.
- [74] R. Terjung, Éd., *Comprehensive Physiology*, 1^{re} éd. Wiley, 2011. doi: 10.1002/cphy.
- [75] B. Meyrick et L. Reid, « The effect of continued hypoxia on rat pulmonary arterial circulation. An ultrastructural study », *PMID: 146763*, févr. 1978.
- [76] K. R. Stenmark, K. A. Fagan, et M. G. Frid, « Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling: Cellular and Molecular Mechanisms », *Circ. Res.*, vol. 99, n° 7, p. 675-691, sept. 2006, doi: 10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f.
- [77] H. Li, T. S. Elton, Y. F. Chen, et S. Oparil, « Increased endothelin receptor gene expression in hypoxic rat lung », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 266, n° 5, p. L553-L560, mai 1994, doi: 10.1152/ajplung.1994.266.5.L553.

- [78] S. Soma, H. Takahashi, M. Muramatsu, M. Oka, et Y. Fukuchi, « Localization and Distribution of Endothelin Receptor Subtypes in Pulmonary Vasculature of Normal and Hypoxia-Exposed Rats », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 20, n° 4, p. 620-630, avr. 1999, doi: 10.1165/ajrcmb.20.4.3356.
- [79] A. Sebkhi, J. W. Strange, S. C. Phillips, J. Wharton, et M. R. Wilkins, « Phosphodiesterase Type 5 as a Target for the Treatment of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension », *Circulation*, vol. 107, n° 25, p. 3230-3235, juill. 2003, doi: 10.1161/01.CIR.0000074226.20466.B1.
- [80] S. Eddahibi *et al.*, « Induction of Serotonin Transporter by Hypoxia in Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cells: Relationship With the Mitogenic Action of Serotonin », *Circ. Res.*, vol. 84, n° 3, p. 329-336, févr. 1999, doi: 10.1161/01.RES.84.3.329.
- [81] E. Weir et A. Olschewski, « Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia », *Cardiovasc. Res.*, vol. 71, n° 4, p. 630-641, sept. 2006, doi: 10.1016/j.cardiores.2006.04.014.
- [82] R. C. Tyler *et al.*, « Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension », p. 7.
- [83] F. Blumberg, « Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension », *Cardiovasc. Res.*, vol. 55, n° 1, p. 171-177, juill. 2002, doi: 10.1016/S0008-6363(02)00318-8.
- [84] S. Sakao, K. Tatsumi, et N. F. Voelkel, « Reversible or Irreversible Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 43, n° 6, p. 629-634, déc. 2010, doi: 10.1165/rcmb.2009-0389TR.
- [85] J. G. Gomez-Arroyo *et al.*, « The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 302, n° 4, p. L363-L369, févr. 2012, doi: 10.1152/ajplung.00212.2011.
- [86] K. Okada, Y. Tanaka, M. Bernstein, W. Zhang, et G. A. Patterson, « Pulmonary Hemodynamics Modify the Rat Pulmonary Artery Response to Injury », vol. 151, n° 4, p. 7, 1997.
- [87] Y. Song *et al.*, « Inflammation, endothelial injury, and persistent pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice », *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.*, vol. 295, n° 2, p. H677-H690, août 2008, doi: 10.1152/ajpheart.91519.2007.
- [88] A. Hautefort *et al.*, « *Bmpr2* Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension », *Circulation*, vol. 139, n° 7, p. 932-948, févr. 2019, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.118.033744.
- [89] E. A. McCulloch et J. E. Till, « The Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells, Determined by Quantitative Marrow Transplantation into Irradiated Mice », *Radiat. Res.*, vol. 13, n° 1, p. 115, juill. 1960, doi: 10.2307/3570877.
- [90] R. M. Seaberg et D. van der Kooy, « Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions », *Trends Neurosci.*, vol. 26, n° 3, p. 125-131, mars 2003, doi: 10.1016/S0166-2236(03)00031-6.
- [91] T. Asahara *et al.*, « Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis », *Science*, vol. 275, n° 5302, p. 964-966, févr. 1997, doi: 10.1126/science.275.5302.964.
- [92] T. Asahara *et al.*, « Bone Marrow Origin of Endothelial Progenitor Cells Responsible for Postnatal Vasculogenesis in Physiological and Pathological Neovascularization », *Circ. Res.*, vol. 85, n° 3, p. 221-228, août 1999, doi: 10.1161/01.RES.85.3.221.
- [93] H. Chen, P. Strappe, S. Chen, et L.-X. Wang, « Endothelial Progenitor Cells and Pulmonary Arterial Hypertension », *Heart Lung Circ.*, vol. 23, n° 7, p. 595-601, juill. 2014, doi: 10.1016/j.hlc.2014.02.007.
- [94] G. P. Fadini, A. Avogaro, G. Ferraccioli, et C. Agostini, « Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications », *Eur. Respir. J.*, vol. 35, n° 2, p. 418-425, févr. 2010, doi: 10.1183/09031936.00112809.
- [95] J. Sainz *et al.*, « Isolation of "Side Population" Progenitor Cells From Healthy Arteries of Adult Mice », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 26, n° 2, p. 281-286, févr. 2006, doi: 10.1161/01.ATV.0000197793.83391.91.

- [96] L. S. Ferreira *et al.*, « Vascular Progenitor Cells Isolated From Human Embryonic Stem Cells Give Rise to Endothelial and Smooth Muscle–Like Cells and Form Vascular Networks In Vivo », *Circ. Res.*, vol. 101, n° 3, p. 286-294, août 2007, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.150201.
- [97] G. P. Fadini, I. Baesso, M. Albiero, S. Sartore, C. Agostini, et A. Avogaro, « Technical notes on endothelial progenitor cells: Ways to escape from the knowledge plateau », *Atherosclerosis*, vol. 197, n° 2, p. 496-503, avr. 2008, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.12.039.
- [98] G.-P. Diller, T. Thum, M. R. Wilkins, et J. Wharton, « Endothelial Progenitor Cells in Pulmonary Arterial Hypertension », vol. 20, n° 1, p. 8, 2010.
- [99] G. P. Fadini, C. Agostini, S. Sartore, et A. Avogaro, « Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis », *Atherosclerosis*, vol. 194, n° 1, p. 46-54, sept. 2007, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2007.03.046.
- [100] Z. JunHui, W. XingXiang, F. GuoSheng, S. YunPeng, Z. FuRong, et C. JunZhu, « Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension », *Respir. Med.*, vol. 102, n° 7, p. 1073-1079, juill. 2008, doi: 10.1016/j.rmed.2007.12.030.
- [101] F. Anjum, J. Lazar, J. Zein, G. Jamaledine, S. Demetis, et R. Wadgaonkar, « Characterization of Altered Patterns of Endothelial Progenitor Cells in Sickle Cell Disease Related Pulmonary Arterial Hypertension », *Pulm. Circ.*, vol. 2, n° 1, p. 54-60, janv. 2012, doi: 10.4103/2045-8932.94834.
- [102] L. Xia *et al.*, « Senescent endothelial progenitor cells from dogs with pulmonary arterial hypertension: a before–after self-controlled study », *J. Physiol. Sci.*, vol. 59, n° 6, p. 429-437, nov. 2009, doi: 10.1007/s12576-009-0053-7.
- [103] T. M. Bull *et al.*, « Gene Microarray Analysis of Peripheral Blood Cells in Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 170, n° 8, p. 911-919, oct. 2004, doi: 10.1164/rccm.200312-1686OC.
- [104] K. Asosingh *et al.*, « Circulating Angiogenic Precursors in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Pathol.*, vol. 172, n° 3, p. 615-627, mars 2008, doi: 10.2353/ajpath.2008.070705.
- [105] M. Toshner *et al.*, « Evidence of Dysfunction of Endothelial Progenitors in Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 180, n° 8, p. 780-787, oct. 2009, doi: 10.1164/rccm.200810-1662OC.
- [106] D. M. Smadja *et al.*, « Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 36, n° 6, p. 1284-1293, déc. 2010, doi: 10.1183/09031936.00130809.
- [107] M. Schiavon *et al.*, « Increased tissue endothelial progenitor cells in end-stage lung diseases with pulmonary hypertension », *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 31, n° 9, p. 1025-1030, sept. 2012, doi: 10.1016/j.healun.2012.06.005.
- [108] S. M. Majka *et al.*, « Evidence for cell fusion is absent in vascular lesions associated with pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 295, n° 6, p. L1028-L1039, déc. 2008, doi: 10.1152/ajplung.90449.2008.
- [109] A. Q. Sheikh, J. K. Lighthouse, et D. M. Greif, « Recapitulation of Developing Artery Muscularization in Pulmonary Hypertension », *Cell Rep.*, vol. 6, n° 5, p. 809-817, mars 2014, doi: 10.1016/j.celrep.2014.01.042.
- [110] S. Crnkovic *et al.*, « Resident cell lineages are preserved in pulmonary vascular remodeling: Lineage tracing of pulmonary vascular remodeling », *J. Pathol.*, vol. 244, n° 4, p. 485-498, avr. 2018, doi: 10.1002/path.5044.
- [111] A. Q. Sheikh, A. Misra, I. O. Rosas, R. H. Adams, et D. M. Greif, « Smooth muscle cell progenitors are primed to muscularize in pulmonary hypertension », *Sci. Transl. Med.*, vol. 7, n° 308, p. 308ra159-308ra159, oct. 2015, doi: 10.1126/scitranslmed.aaa9712.
- [112] A. Q. Sheikh, F. Z. Saddouk, A. Ntokou, R. Mazurek, et D. M. Greif, « Cell Autonomous and Non-cell Autonomous Regulation of SMC Progenitors in Pulmonary Hypertension », *Cell Rep.*, vol. 23, n° 4, p. 1152-1165, avr. 2018, doi: 10.1016/j.celrep.2018.03.043.

- [113] A. I. Caplan, « All MSCs Are Pericytes? », *Cell Stem Cell*, vol. 3, n° 3, p. 229-230, sept. 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.08.008.
- [114] J. Feng, A. Mantesso, et P. T. Sharpe, « Perivascular cells as mesenchymal stem cells », *Expert Opin. Biol. Ther.*, vol. 10, n° 10, p. 1441-1451, oct. 2010, doi: 10.1517/14712598.2010.517191.
- [115] B. Meyrick, K. Fujiwara, et L. Reid, « Smooth Muscle Myosin in Precursor and Mature Smooth Muscle Cells in Normal Pulmonary Arteries and the Effect of Hypoxia », p. 11.
- [116] M. S. Patel *et al.*, « Abnormal pericyte recruitment as a cause for pulmonary hypertension in Adams-Oliver syndrome », *Am. J. Med. Genet.*, vol. 129A, n° 3, p. 294-299, sept. 2004, doi: 10.1002/ajmg.a.30221.
- [117] J. Bordenave *et al.*, « Lineage Tracing Reveals the Dynamic Contribution of Pericytes to the Blood Vessel Remodeling in Pulmonary Hypertension », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, n° 3, p. 766-782, mars 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.119.313715.
- [118] K. Yuan *et al.*, « Mural Cell SDF1 Signaling Is Associated with the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 62, n° 6, p. 747-759, juin 2020, doi: 10.1165/rcmb.2019-0401OC.
- [119] M. Lei, K. Li, B. Li, L.-N. Gao, F.-M. Chen, et Y. Jin, « Mesenchymal stem cell characteristics of dental pulp and periodontal ligament stem cells after in vivo transplantation », *Biomaterials*, vol. 35, n° 24, p. 6332-6343, août 2014, doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.04.071.
- [120] D. Covas *et al.*, « Mesenchymal stem cells can be obtained from the human saphena vein », *Exp. Cell Res.*, vol. 309, n° 2, p. 340-344, oct. 2005, doi: 10.1016/j.yexcr.2005.06.005.
- [121] M. Crisan *et al.*, « A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs », *Cell Stem Cell*, vol. 3, n° 3, p. 301-313, sept. 2008, doi: 10.1016/j.stem.2008.07.003.
- [122] I. R. Murray *et al.*, « Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 71, n° 8, p. 1353-1374, avr. 2014, doi: 10.1007/s00018-013-1462-6.
- [123] « thèse france dierick.pdf ».
- [124] K. Hayashida *et al.*, « Bone Marrow-Derived Cells Contribute to Pulmonary Vascular Remodeling in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension », *Chest*, vol. 127, n° 5, p. 1793-1798, mai 2005, doi: 10.1378/chest.127.5.1793.
- [125] J. L. Spees *et al.*, « Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension », *FASEB J.*, vol. 22, n° 4, p. 1226-1236, avr. 2008, doi: 10.1096/fj.07-8076com.
- [126] M. Sahara, M. Sata, T. Morita, K. Nakamura, Y. Hirata, et R. Nagai, « Diverse Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Vascular Remodeling Associated With Pulmonary Arterial Hypertension and Arterial Neointimal Formation », *Circulation*, vol. 115, n° 4, p. 509-517, janv. 2007, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.655837.
- [127] N. J. Davie *et al.*, « Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 286, n° 4, p. L668-L678, avr. 2004, doi: 10.1152/ajplung.00108.2003.
- [128] N. Gambaryan, F. Perros, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, G. M. Mazmanian, et M. Humbert, « Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit+ cell mobilisation in hypoxic pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 36, n° 5, p. 1209-1211, nov. 2010, doi: 10.1183/09031936.00052210.
- [129] N. Gambaryan *et al.*, « Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 37, n° 6, p. 1392-1399, juin 2011, doi: 10.1183/09031936.00045710.
- [130] D. Montani *et al.*, « C-Kit-Positive Cells Accumulate in Remodeled Vessels of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 184, n° 1, p. 116-123, juill. 2011, doi: 10.1164/rccm.201006-0905OC.
- [131] E. Arciniegas, A. B. Sutton, T. D. Allen, et A. M. Schor, « Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro », p. 10.

- [132] M. G. Frid, V. A. Kale, et K. R. Stenmark, « Mature Vascular Endothelium Can Give Rise to Smooth Muscle Cells via Endothelial-Mesenchymal Transdifferentiation: In Vitro Analysis », *Circ. Res.*, vol. 90, n° 11, p. 1189-1196, juin 2002, doi: 10.1161/01.RES.0000021432.70309.28.
- [133] E. Arciniegas, L. Ponce, Y. Hartt, A. Graterol, et R. G. Carlini, « Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells », *Anat. Rec.*, vol. 258, n° 1, p. 47-57, janv. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-0185(20000101)258:1<47::AID-AR6>3.0.CO;2-W.
- [134] E. Arciniegas, C. Y. Neves, L. M. Carrillo, E. A. Zambrano, et R. Ramírez, « Endothelial-Mesenchymal Transition Occurs during Embryonic Pulmonary Artery Development », *Endothelium*, vol. 12, n° 4, p. 193-200, janv. 2005, doi: 10.1080/10623320500227283.
- [135] E. M. Zeisberg *et al.*, « Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis », *Nat. Med.*, vol. 13, n° 8, p. 952-961, août 2007, doi: 10.1038/nm1613.
- [136] P. Zhu, L. Huang, X. Ge, F. Yan, R. Wu, et Q. Ao, « Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling: Transdifferentiation of PAEC », *Int. J. Exp. Pathol.*, vol. 87, n° 6, p. 463-474, nov. 2006, doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00503.x.
- [137] S. Sakao *et al.*, « VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34⁺ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells », *FASEB J.*, vol. 21, n° 13, p. 3640-3652, nov. 2007, doi: 10.1096/fj.07-8432com.
- [138] L. Zhang *et al.*, « Galectin-3-Mediated Transdifferentiation of Pulmonary Artery Endothelial Cells Contributes to Hypoxic Pulmonary Vascular Remodeling », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 51, n° 2, p. 763-777, 2018, doi: 10.1159/000495331.
- [139] I. Nikitopoulou *et al.*, « Vascular endothelial-cadherin downregulation as a feature of endothelial transdifferentiation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 311, n° 2, p. L352-L363, août 2016, doi: 10.1152/ajplung.00156.2014.
- [140] R. B. Good *et al.*, « Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension », *Am. J. Pathol.*, vol. 185, n° 7, p. 1850-1858, juill. 2015, doi: 10.1016/j.ajpath.2015.03.019.
- [141] B. Ranchoux *et al.*, « Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension », *Circulation*, vol. 131, n° 11, p. 1006-1018, mars 2015, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.008750.
- [142] L. Qiao *et al.*, « Endothelial Fate Mapping in Mice With Pulmonary Hypertension », *Circulation*, vol. 129, n° 6, p. 692-703, févr. 2014, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.003734.
- [143] B. Zhang, W. Niu, H. Dong, M. Liu, Y. Luo, et Z. Li, « Hypoxia induces endothelial-mesenchymal transition in pulmonary vascular remodeling », *Int. J. Mol. Med.*, mars 2018, doi: 10.3892/ijmm.2018.3584.
- [144] S. G. Chong, S. Sato, M. Kolb, et J. Gauldie, « Fibrocytes and fibroblasts—Where are we now », *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 116, p. 105595, nov. 2019, doi: 10.1016/j.biocel.2019.105595.
- [145] V. S. Nikam *et al.*, « Implication of in vivo circulating fibrocytes ablation in experimental pulmonary hypertension murine model », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 177, n° 13, p. 2974-2990, juill. 2020, doi: 10.1111/bph.15025.
- [146] M. G. Frid *et al.*, « Hypoxia-Induced Pulmonary Vascular Remodeling Requires Recruitment of Circulating Mesenchymal Precursors of a Monocyte/Macrophage Lineage », *Am. J. Pathol.*, vol. 168, n° 2, p. 659-669, févr. 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.050599.
- [147] M. E. Yeager, M. G. Frid, et K. R. Stenmark, « Progenitor Cells in Pulmonary Vascular Remodeling », *Pulm. Circ.*, vol. 1, n° 1, p. 3-16, janv. 2011, doi: 10.4103/2045-8932.78095.
- [148] M. Short, R. A. Nemenoff, W. M. Zawada, K. R. Stenmark, et M. Das, « Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts », *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.*, vol. 286, n° 2, p. C416-C425, févr. 2004, doi: 10.1152/ajpcell.00169.2003.
- [149] V. Besson *et al.*, « PW1 gene/paternally expressed gene 3 (PW1/Peg3) identifies multiple adult stem and progenitor cell populations », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, n° 28, p. 11470-11475, juill. 2011, doi: 10.1073/pnas.1103873108.

- [150] F. Dierick, J. Solinc, J. Bignard, F. Soubrier, et S. Nadaud, « Progenitor/Stem Cells in Vascular Remodeling during Pulmonary Arterial Hypertension », *Cells*, vol. 10, n° 6, p. 1338, mai 2021, doi: 10.3390/cells10061338.
- [151] M. Fukumitsu et K. Suzuki, « Mesenchymal stem/stromal cell therapy for pulmonary arterial hypertension: Comprehensive review of preclinical studies », *J. Cardiol.*, vol. 74, n° 4, p. 304-312, oct. 2019, doi: 10.1016/j.jjcc.2019.04.006.
- [152] L. Fredriksson, H. Li, et U. Eriksson, « The PDGF family: four gene products form five dimeric isoforms », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, n° 4, p. 197-204, août 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.007.
- [153] A. Kazlauskas, « PDGFs and their receptors », *Gene*, vol. 614, p. 1-7, mai 2017, doi: 10.1016/j.gene.2017.03.003.
- [154] C. Lee et X. Li, « Platelet-derived growth factor-C and -D in the cardiovascular system and diseases », *Mol. Aspects Med.*, vol. 62, p. 12-21, août 2018, doi: 10.1016/j.mam.2017.09.005.
- [155] C. H. Heldin, « Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. », *EMBO J.*, vol. 11, n° 12, p. 4251-4259, déc. 1992, doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05523.x.
- [156] C.-H. Heldin et B. Westermark, « Mechanism of Action and In Vivo Role of Platelet-Derived Growth Factor », *Physiol. Rev.*, vol. 79, n° 4, p. 1283-1316, janv. 1999, doi: 10.1152/physrev.1999.79.4.1283.
- [157] N. Noskovičová, M. Petřek, O. Eickelberg, et K. Heinzelmann, « Platelet-Derived Growth Factor Signaling in the Lung. From Lung Development and Disease to Clinical Studies », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 52, n° 3, p. 263-284, mars 2015, doi: 10.1165/rcmb.2014-0294TR.
- [158] E. Bergsten *et al.*, « PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF β -receptor », *Nat. Cell Biol.*, vol. 3, n° 5, p. 512-516, mai 2001, doi: 10.1038/35074588.
- [159] C. V. Ustach et H.-R. C. Kim, « Platelet-Derived Growth Factor D Is Activated by Urokinase Plasminogen Activator in Prostate Carcinoma Cells », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, n° 14, p. 6279-6288, juill. 2005, doi: 10.1128/MCB.25.14.6279-6288.2005.
- [160] P. Ataliotis et M. Mercola, « Distribution and Functions of Platelet-Derived Growth Factors and Their Receptors during Embryogenesis », in *International Review of Cytology*, vol. 172, Elsevier, 1997, p. 95-127. doi: 10.1016/S0074-7696(08)62359-1.
- [161] Q. Shang, L. Zhao, X. Wang, M. Wang, S.-F. Sui, et L.-Z. Mi, « Expression and purification of functional PDGF receptor beta », *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 489, n° 3, p. 353-359, juill. 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.091.
- [162] N. Papadopoulos et J. Lennartsson, « The PDGF/PDGFR pathway as a drug target », *Mol. Aspects Med.*, vol. 62, p. 75-88, août 2018, doi: 10.1016/j.mam.2017.11.007.
- [163] C.-H. Heldin et J. Lennartsson, « Structural and Functional Properties of Platelet-Derived Growth Factor and Stem Cell Factor Receptors », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, n° 8, p. a009100-a009100, août 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a009100.
- [164] M. Kovalenko *et al.*, « Site-selective Dephosphorylation of the Platelet-derived Growth Factor β -Receptor by the Receptor-like Protein-tyrosine Phosphatase DEP-1 », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 21, p. 16219-16226, mai 2000, doi: 10.1074/jbc.275.21.16219.
- [165] F. G. Haj, B. Markova, L. D. Klamann, F. D. Bohmer, et B. G. Neel, « Regulation of Receptor Tyrosine Kinase Signaling by Protein Tyrosine Phosphatase-1B », *J. Biol. Chem.*, vol. 278, n° 2, p. 739-744, janv. 2003, doi: 10.1074/jbc.M210194200.
- [166] C. Persson *et al.*, « Site-Selective Regulation of Platelet-Derived Growth Factor β Receptor Tyrosine Phosphorylation by T-Cell Protein Tyrosine Phosphatase », *MOL CELL BIOL*, vol. 24, p. 12, 2004.
- [167] R. J. Lechleider *et al.*, « Activation of the SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SH-PTP2 by its binding site, phosphotyrosine 1009, on the human platelet-derived growth factor receptor. », *J. Biol. Chem.*, vol. 268, n° 29, p. 21478-21481, oct. 1993, doi: 10.1016/S0021-9258(20)80562-6.

- [168] C. H. Heldin, A. Wasteson, et B. Westermark, « Interaction of platelet-derived growth factor with its fibroblast receptor. Demonstration of ligand degradation and receptor modulation. », *J. Biol. Chem.*, vol. 257, n° 8, p. 4216-4221, avr. 1982, doi: 10.1016/S0021-9258(18)34708-2.
- [169] S. Mori, K. Tanaka, S. Omura, et Y. Saito, « Degradation Process of Ligand-stimulated Platelet-derived Growth Factor β -Receptor Involves Ubiquitin-Proteasome Proteolytic Pathway », *J. Biol. Chem.*, vol. 270, n° 49, p. 29447-29452, déc. 1995, doi: 10.1074/jbc.270.49.29447.
- [170] C. Hellberg, C. Schmees, S. Karlsson, A. Åhgren, et C.-H. Heldin, « Activation of Protein Kinase C α Is Necessary for Sorting the PDGF β -Receptor to Rab4a-dependent Recycling », *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, p. 8, 2009.
- [171] S. Pennock, L. J. Haddock, D. Elliott, S. Mukai, et A. Kazlauskas, « Is neutralizing vitreal growth factors a viable strategy to prevent proliferative vitreoretinopathy? », *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 40, p. 16-34, mai 2014, doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.006.
- [172] H. Lei, C. X. Qian, J. Lei, L. J. Haddock, S. Mukai, et A. Kazlauskas, « RasGAP Promotes Autophagy and Thereby Suppresses Platelet-Derived Growth Factor Receptor-Mediated Signaling Events, Cellular Responses, and Pathology », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, n° 10, p. 1673-1685, mai 2015, doi: 10.1128/MCB.01248-14.
- [173] S. Heeneman, J. Haendeler, Y. Saito, M. Ishida, et B. C. Berk, « Angiotensin II Induces Transactivation of Two Different Populations of the Platelet-derived Growth Factor β Receptor », *J. Biol. Chem.*, vol. 275, n° 21, p. 15926-15932, mai 2000, doi: 10.1074/jbc.M909616199.
- [174] R. S. Gill, M. S. Hsiung, C. S. Sum, N. Lavine, S. D. Clark, et H. H. M. Van Tol, « The dopamine D4 receptor activates intracellular platelet-derived growth factor receptor β to stimulate ERK1/2 », *Cell. Signal.*, vol. 22, n° 2, p. 285-290, févr. 2010, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.09.031.
- [175] S. S. Baroni, M. Luchetti, P. Fraticelli, A. Kazlauskas, et A. Gabrielli, « Stimulatory Autoantibodies to the PDGF Receptor in Systemic Sclerosis », *N. Engl. J. Med.*, p. 10, 2006.
- [176] M. C. Heinrich, « PDGFRA Activating Mutations in Gastrointestinal Stromal Tumors », *Science*, vol. 299, n° 5607, p. 708-710, janv. 2003, doi: 10.1126/science.1079666.
- [177] S. Hirota *et al.*, « Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor α gene in gastrointestinal stromal tumors », *Gastroenterology*, vol. 125, n° 3, p. 660-667, sept. 2003, doi: 10.1016/S0016-5085(03)01046-1.
- [178] S. Pennock et A. Kazlauskas, « Vascular Endothelial Growth Factor A Competitively Inhibits Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)-Dependent Activation of PDGF Receptor and Subsequent Signaling Events and Cellular Responses », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 32, n° 10, p. 1955-1966, mai 2012, doi: 10.1128/MCB.06668-11.
- [179] J. Andrae, R. Gallini, et C. Betsholtz, « Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine », *Genes Dev.*, vol. 22, n° 10, p. 1276-1312, mai 2008, doi: 10.1101/gad.1653708.
- [180] E. Guérit, F. Arts, G. Dachy, B. Boulouadnine, et J.-B. Demoulin, « PDGF receptor mutations in human diseases », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 78, n° 8, p. 3867-3881, avr. 2021, doi: 10.1007/s00018-020-03753-y.
- [181] R. A. Klinghoffer, P. F. Mueting-Nelsen, A. Faerman, M. Shani, et P. Soriano, « The Two PDGF Receptors Maintain Conserved Signaling In Vivo despite Divergent Embryological Functions », *Mol. Cell*, vol. 7, n° 2, p. 343-354, févr. 2001, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00182-4.
- [182] G. C. Schatteman, K. Morrison-Graham, A. V. Koppen, J. A. Weston, et D. F. Bowen-Pope, « Regulation and role of PDGF receptor α -subunit expression during embryogenesis », p. 11.
- [183] R. M. Farahani et M. Xaymardan, « Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha as a Marker of Mesenchymal Stem Cells in Development and Stem Cell Biology », *Stem Cells Int.*, vol. 2015, p. 1-8, 2015, doi: 10.1155/2015/362753.
- [184] N. Takakura, H. Yoshida, T. Kunisada, S. Nishikawa, et S.-I. Nishikawa, « Involvement of Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α in Hair Canal Formation », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 107, n° 5, p. 770-777, nov. 1996, doi: 10.1111/1523-1747.ep12371802.

- [185] N. Takakura, H. Yoshida, Y. Ogura, H. Kataoka, S. Nishikawa, et S.-I. Nishikawa, « PDGFR α Expression During Mouse Embryogenesis: Immunolocalization Analyzed by Whole-mount Immunohistostaining Using the Monoclonal Anti-mouse PDGFR α Antibody APA5 », *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 45, n $^{\circ}$ 6, p. 883-893, juin 1997, doi: 10.1177/002215549704500613.
- [186] H. Grüneberg et G. M. Truslove, « Two closely linked genes in the mouse », *Genet. Res.*, vol. 1, n $^{\circ}$ 1, p. 69-90, févr. 1960, doi: 10.1017/S0016672300000094.
- [187] P. Soriano, « The PDGF α receptor is required for neural crest cell development and for normal patterning of the somites », p. 10.
- [188] L. E. Olson et P. Soriano, « Increased PDGFR α Activation Disrupts Connective Tissue Development and Drives Systemic Fibrosis », *Dev. Cell*, vol. 16, n $^{\circ}$ 2, p. 303-313, févr. 2009, doi: 10.1016/j.devcel.2008.12.003.
- [189] E. Shinbrot, K. G. Peters, et L. T. Williams, « Expression of the platelet-derived growth factor β receptor during organogenesis and tissue differentiation in the mouse embryo », *Dev. Dyn.*, vol. 199, n $^{\circ}$ 3, p. 169-175, mars 1994, doi: 10.1002/aja.1001990302.
- [190] K. A. Fantauzzo et P. Soriano, « PDGFR β regulates craniofacial development through homodimers and functional heterodimers with PDGFR α », *Genes Dev.*, vol. 30, n $^{\circ}$ 21, p. 2443-2458, nov. 2016, doi: 10.1101/gad.288746.116.
- [191] C. Betsholtz et E. W. Raines, « Platelet-derived growth factor: A key regulator of connective tissue cells in embryogenesis and pathogenesis », *Kidney Int.*, vol. 51, n $^{\circ}$ 5, p. 1361-1369, mai 1997, doi: 10.1038/ki.1997.186.
- [192] P. Soriano, « Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF [-receptor mutant mice », p. 10.
- [193] W. E. Kaminski *et al.*, « Basis of hematopoietic defects in platelet-derived growth factor (PDGF)-B and PDGF β -receptor null mice », vol. 97, n $^{\circ}$ 7, p. 9, 2001.
- [194] P. Lindahl, « Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice », *Science*, vol. 277, n $^{\circ}$ 5323, p. 242-245, juill. 1997, doi: 10.1126/science.277.5323.242.
- [195] M. Hellström, « PDGF-B in blood vessel development », p. 9.
- [196] F. Chiara *et al.*, « A Gain of Function Mutation in the Activation Loop of Platelet-derived Growth Factor β -Receptor Deregulates Its Kinase Activity », *J. Biol. Chem.*, vol. 279, n $^{\circ}$ 41, p. 42516-42527, oct. 2004, doi: 10.1074/jbc.M406051200.
- [197] L. E. Olson et P. Soriano, « PDGFR β Signaling Regulates Mural Cell Plasticity and Inhibits Fat Development », *Dev. Cell*, vol. 20, n $^{\circ}$ 6, p. 815-826, juin 2011, doi: 10.1016/j.devcel.2011.04.019.
- [198] S. E. Lynch, J. C. Nixon, R. B. Colvin, et H. N. Antoniades, « Role of platelet-derived growth factor in wound healing: synergistic effects with other growth factors. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 84, n $^{\circ}$ 21, p. 7696-7700, nov. 1987, doi: 10.1073/pnas.84.21.7696.
- [199] Z. Gao *et al.*, « Deletion of the PDGFR- β Gene Affects Key Fibroblast Functions Important for Wound Healing », *J. Biol. Chem.*, vol. 280, n $^{\circ}$ 10, p. 9375-9389, mars 2005, doi: 10.1074/jbc.M413081200.
- [200] V. S. Rajkumar *et al.*, « Platelet-Derived Growth Factor- β Receptor Activation Is Essential for Fibroblast and Pericyte Recruitment during Cutaneous Wound Healing », *Am. J. Pathol.*, vol. 169, n $^{\circ}$ 6, p. 2254-2265, déc. 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.060196.
- [201] S. Wang *et al.*, « Platelet-derived growth factor receptor beta identifies mesenchymal stem cells with enhanced engraftment to tissue injury and pro-angiogenic property », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 75, n $^{\circ}$ 3, p. 547-561, févr. 2018, doi: 10.1007/s00018-017-2641-7.
- [202] J. Shen *et al.*, « PDGFR- β as a Positive Regulator of Tissue Repair in a Mouse Model of Focal Cerebral Ischemia », *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, vol. 32, n $^{\circ}$ 2, p. 353-367, févr. 2012, doi: 10.1038/jcbfm.2011.136.
- [203] Y. Ishii *et al.*, « Mouse brains deficient in neuronal PDGF receptor-beta develop normally but are vulnerable to injury », *J. Neurochem.*, vol. 98, n $^{\circ}$ 2, p. 588-600, juill. 2006, doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03922.x.

- [204] E. J. Bategay, J. Rupp, L. Iruela-Arispe, E. H. Sage, et M. Pech, « PDGF-BB Modulates Endothelial Proliferation and Angiogenesis In Vitro via PDGF B-Receptors », p. 12.
- [205] X. Wang *et al.*, « Arsenite suppresses angiogenesis of vascular endothelial cells mediated by Platelet Derived Growth Factor Receptor-beta », *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, vol. 46, p. 168-173, sept. 2016, doi: 10.1016/j.etap.2016.07.009.
- [206] H. Wang, « Transplantation of EPCs overexpressing PDGFR- β promotes vascular repair in the early phase after vascular injury », p. 13, 2016.
- [207] M. Hellström, « PDGF-B in blood vessel development », p. 9.
- [208] J. Zhang, R. Cao, Y. Zhang, T. Jia, Y. Cao, et E. Wahlberg, « Differential roles of PDGFR- α and PDGFR- β in angiogenesis and vessel stability », *FASEB J.*, vol. 23, n° 1, p. 153-163, janv. 2009, doi: 10.1096/fj.08-113860.
- [209] S. A. Rodt, K. Ahlén, A. Berg, K. Rubin, et R. K. Reed, « A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. », *J. Physiol.*, vol. 495, n° 1, p. 193-200, août 1996, doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021584.
- [210] R. Heuchel *et al.*, « Platelet-derived growth factor β receptor regulates interstitial fluid homeostasis through phosphatidylinositol-3 Kinase signaling », *Proc Natl Acad Sci USA*, p. 6, 1999.
- [211] Y.-K. Hong *et al.*, « Tumor Endothelial Marker 1 (TEM1/Endosialin/CD248) Enhances Wound Healing by Interacting with Platelet-Derived Growth Factor Receptors », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 139, n° 10, p. 2204-2214.e7, oct. 2019, doi: 10.1016/j.jid.2019.03.1149.
- [212] C. Allamargot, A. Pouplard-Barthelaix, et C. Fressinaud, « A single intracerebral microinjection of platelet-derived growth factor (PDGF) accelerates the rate of remyelination in vivo », *Brain Res.*, vol. 918, n° 1-2, p. 28-39, nov. 2001, doi: 10.1016/S0006-8993(01)02761-5.
- [213] R. H. Woodruff, M. Fruttiger, W. D. Richardson, et R. J. M. Franklin, « Platelet-derived growth factor regulates oligodendrocyte progenitor numbers in adult CNS and their response following CNS demyelination », *Mol. Cell. Neurosci.*, vol. 25, n° 2, p. 252-262, févr. 2004, doi: 10.1016/j.mcn.2003.10.014.
- [214] M. J. Carr *et al.*, « Mesenchymal Precursor Cells in Adult Nerves Contribute to Mammalian Tissue Repair and Regeneration », *Cell Stem Cell*, vol. 24, n° 2, p. 240-256.e9, févr. 2019, doi: 10.1016/j.stem.2018.10.024.
- [215] J. Tang *et al.*, « Arterial Sca1+ Vascular Stem Cells Generate De Novo Smooth Muscle for Artery Repair and Regeneration », *Cell Stem Cell*, vol. 26, n° 1, p. 81-96.e4, janv. 2020, doi: 10.1016/j.stem.2019.11.010.
- [216] L. Chen, T. Acciani, T. Le Cras, C. Lutzko, et A.-K. T. Perl, « Dynamic Regulation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Expression in Alveolar Fibroblasts during Realveolarization », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 47, n° 4, p. 517-527, oct. 2012, doi: 10.1165/rcmb.2012-0030OC.
- [217] J. C. Bonner, « Regulation of PDGF and its receptors in fibrotic diseases », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, n° 4, p. 255-273, août 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.006.
- [218] Y.-C. Wang *et al.*, « Notch1 promotes the pericyte-myofibroblast transition in idiopathic pulmonary fibrosis through the PDGFR/ROCK1 signal pathway », *Exp. Mol. Med.*, vol. 51, n° 3, p. 1-11, mars 2019, doi: 10.1038/s12276-019-0228-0.
- [219] R. Li, K. Bernau, N. Sandbo, J. Gu, S. Preissl, et X. Sun, « Pdgfra marks a cellular lineage with distinct contributions to myofibroblasts in lung maturation and injury response », *eLife*, vol. 7, p. e36865, sept. 2018, doi: 10.7554/eLife.36865.
- [220] V. Biasin *et al.*, « PDGFR α and α SMA mark two distinct mesenchymal cell populations involved in parenchymal and vascular remodeling in pulmonary fibrosis », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 318, n° 4, p. L684-L697, avr. 2020, doi: 10.1152/ajplung.00128.2019.
- [221] M. Kishi *et al.*, « Blockade of platelet-derived growth factor receptor- β , not receptor- α ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice », *PLOS ONE*, vol. 13, n° 12, p. e0209786, déc. 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0209786.

- [222] C. E. Daniels, J. A. Lasky, A. H. Limper, K. Mieras, E. Gabor, et D. R. Schroeder, « Imatinib Treatment for Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Randomized Placebo-controlled Trial Results », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 181, n° 6, p. 604-610, mars 2010, doi: 10.1164/rccm.200906-0964OC.
- [223] L. Richeldi *et al.*, « Efficacy and Safety of Nintedanib in Idiopathic Pulmonary Fibrosis », *N. Engl. J. Med.*, vol. 370, n° 22, p. 2071-2082, mai 2014, doi: 10.1056/NEJMoa1402584.
- [224] M. Pinzani *et al.*, « Transforming growth factor- β 1 regulates platelet-derived growth factor receptor β subunit in human liver fat-storing cells », *Hepatology*, vol. 21, n° 1, p. 232-239, janv. 1995, doi: 10.1002/hep.1840210136.
- [225] S. L. Friedman et M. J. Arthur, « Activation of cultured rat hepatic lipocytes by Kupffer cell conditioned medium. Direct enhancement of matrix synthesis and stimulation of cell proliferation via induction of platelet-derived growth factor receptors. », *J. Clin. Invest.*, vol. 84, n° 6, p. 1780-1785, déc. 1989, doi: 10.1172/JCI114362.
- [226] B. J. Hayes *et al.*, « Activation of Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha Contributes to Liver Fibrosis », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 3, p. e92925, mars 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0092925.
- [227] A. Kikuchi, T. Pradhan-Sundd, S. Singh, S. Nagarajan, N. Loizos, et S. P. Monga, « Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Contributes to Human Hepatic Stellate Cell Proliferation and Migration », *Am. J. Pathol.*, vol. 187, n° 10, p. 2273-2287, oct. 2017, doi: 10.1016/j.ajpath.2017.06.009.
- [228] B. J. Lim *et al.*, « Selective deletion of hepatocyte platelet-derived growth factor receptor α and development of liver fibrosis in mice », *Cell Commun. Signal.*, vol. 16, n° 1, p. 93, déc. 2018, doi: 10.1186/s12964-018-0306-2.
- [229] B. D. Humphreys *et al.*, « Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis », *Am. J. Pathol.*, vol. 176, n° 1, p. 85-97, janv. 2010, doi: 10.2353/ajpath.2010.090517.
- [230] J. J. Cha *et al.*, « Inhibition of Renal Stellate Cell Activation Reduces Renal Fibrosis », *Biomedicines*, vol. 8, n° 10, p. 431, oct. 2020, doi: 10.3390/biomedicines8100431.
- [231] C. Kuppe *et al.*, « Decoding myofibroblast origins in human kidney fibrosis », *Nature*, vol. 589, n° 7841, p. 281-286, janv. 2021, doi: 10.1038/s41586-020-2941-1.
- [232] E. M. Buhl *et al.*, « Dysregulated mesenchymal PDGFR- β drives kidney fibrosis », *EMBO Mol. Med.*, vol. 12, n° 3, mars 2020, doi: 10.15252/emmm.201911021.
- [233] « gay 1989.pdf ».
- [234] L. Klareskog, R. Gustafsson, A. Scheynius, et R. Hällgren, « Increased expression of platelet-derived growth factor type b receptors in the skin of patients with systemic sclerosis », *Arthritis Rheum.*, vol. 33, n° 10, p. 1534-1541, oct. 1990, doi: 10.1002/art.1780331011.
- [235] J. H. W. Distler *et al.*, « Imatinib mesylate reduces production of extracellular matrix and prevents development of experimental dermal fibrosis », *Arthritis Rheum.*, vol. 56, n° 1, p. 311-322, janv. 2007, doi: 10.1002/art.22314.
- [236] A. Yamakage, K. Kikuchi, E. A. Smith, E. C. LeRoy, et M. Trojanowska, « Selective Upregulation of Platelet-derived Growth Factor $c\sim$ Receptors by Transforming Growth Factor/ \sim in Scleroder Fibroblasts », p. 8.
- [237] K. Kikuchi *et al.*, « Growth Regulation in Scleroderma Fibroblasts: Increased Response to Transforming Growth Factor- β 1 », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 105, n° 1, p. 128-132, juill. 1995, doi: 10.1111/1523-1747.ep12313452.
- [238] A. Simm, M. Nestler, et V. Hoppe, « PDGF-AA, a Potent Mitogen for Cardiac Fibroblasts from Adult Rats », *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 29, n° 1, p. 357-368, janv. 1997, doi: 10.1006/jmcc.1996.0280.
- [239] A. Pontén *et al.*, « Transgenic Overexpression of Platelet-Derived Growth Factor-C in the Mouse Heart Induces Cardiac Fibrosis, Hypertrophy, and Dilated Cardiomyopathy », *Am. J. Pathol.*, vol. 163, n° 2, p. 673-682, août 2003, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63694-2.

- [240] R. Tuuminen *et al.*, « The Effect of Platelet-Derived Growth Factor Ligands in Rat Cardiac Allograft Vasculopathy and Fibrosis », *Transplant. Proc.*, vol. 38, n° 10, p. 3271-3273, déc. 2006, doi: 10.1016/j.transproceed.2006.10.056.
- [241] P. Zymek *et al.*, « The Role of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Healing Myocardial Infarcts », *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 48, n° 11, p. 2315-2323, déc. 2006, doi: 10.1016/j.jacc.2006.07.060.
- [242] L. Wang *et al.*, « Platelet Derived Growth Factor Alpha (PDGFR α) Induces the Activation of Cardiac Fibroblasts by Activating c-Kit », *Med. Sci. Monit.*, vol. 23, p. 3808-3816, août 2017, doi: 10.12659/MSM.906038.
- [243] « Ross 1973.pdf ».
- [244] R. Ross, « THE PATHOGENESIS OF ATHEROSCLEROSIS », p. 6.
- [245] J. N. Wilcox, K. M. Smith, L. T. Williams, S. M. Schwartz, et D. Gordon, « Platelet-derived Growth Factor mRNA Detection in Human Atherosclerotic Plaques by In Situ Hybridization », p. 10.
- [246] R. Ross *et al.*, « Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis », *Science*, vol. 248, n° 4958, p. 1009-1012, mai 1990, doi: 10.1126/science.2343305.
- [247] R. Ross, « The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s », *Nature*, vol. 362, n° 6423, p. 801-809, avr. 1993, doi: 10.1038/362801a0.
- [248] E. W. Raines, « PDGF and cardiovascular disease », *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 15, n° 4, p. 237-254, août 2004, doi: 10.1016/j.cytogfr.2004.03.004.
- [249] L. Li, D. K. Blumenthal, C. M. Terry, Y. He, M. L. Carlson, et A. K. Cheung, « PDGF-induced proliferation in human arterial and venous smooth muscle cells: Molecular basis for differential effects of PDGF isoforms », *J. Cell. Biochem.*, vol. 112, n° 1, p. 289-298, janv. 2011, doi: 10.1002/jcb.22924.
- [250] B. S. Buetow, K. A. Tappan, J. R. Crosby, R. A. Seifert, et D. F. Bowen-Pope, « Chimera Analysis Supports a Predominant Role of PDGFR β in Promoting Smooth-Muscle Cell Chemotaxis after Arterial Injury », vol. 163, n° 3, p. 6, 2003.
- [251] P. Boucher, « LRP: Role in Vascular Wall Integrity and Protection from Atherosclerosis », *Science*, vol. 300, n° 5617, p. 329-332, avr. 2003, doi: 10.1126/science.1082095.
- [252] J. Zhao *et al.*, « Knockdown of SCARA5 inhibits PDGF-BB-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration through suppression of the PDGF signaling pathway », *Mol. Med. Rep.*, vol. 13, n° 5, p. 4455-4460, mai 2016, doi: 10.3892/mmr.2016.5074.
- [253] H. Akiyama *et al.*, « Intraocular injection of an aptamer that binds PDGF-B: A potential treatment for proliferative retinopathies », *J. Cell. Physiol.*, vol. 207, n° 2, p. 407-412, mai 2006, doi: 10.1002/jcp.20583.
- [254] N. Jo *et al.*, « Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor B Signaling Enhances the Efficacy of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Therapy in Multiple Models of Ocular Neovascularization », *Am. J. Pathol.*, vol. 168, n° 6, p. 2036-2053, juin 2006, doi: 10.2353/ajpath.2006.050588.
- [255] L. Zhou *et al.*, « Imatinib Ameliorated Retinal Neovascularization by Suppressing PDGFR- α and PDGFR- β », *Cell. Physiol. Biochem.*, vol. 48, n° 1, p. 263-273, 2018, doi: 10.1159/000491726.
- [256] C. Lu, Q. Zhang, H. Zhang, X. Li, Q. Jiang, et J. Yao, « A small molecular multi-targeting tyrosine kinase inhibitor, anlotinib, inhibits pathological ocular neovascularization », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 138, p. 111493, juin 2021, doi: 10.1016/j.biopha.2021.111493.
- [257] J. L. Wilkinson-Berka *et al.*, « Inhibition of Platelet-Derived Growth Factor Promotes Pericyte Loss and Angiogenesis in Ischemic Retinopathy », *Am. J. Pathol.*, vol. 164, n° 4, p. 1263-1273, avr. 2004, doi: 10.1016/S0002-9440(10)63214-2.
- [258] T. Shiraya *et al.*, « Ursodeoxycholic Acid Attenuates the Retinal Vascular Abnormalities in Anti-PDGFR- β Antibody-Induced Pericyte Depletion Mouse Models », *Sci. Rep.*, vol. 10, n° 1, p. 977, déc. 2020, doi: 10.1038/s41598-020-58039-x.

- [259] S. Pennock, L. J. Haddock, S. Mukai, et A. Kazlauskas, « Vascular Endothelial Growth Factor Acts Primarily via Platelet-Derived Growth Factor Receptor α to Promote Proliferative Vitreoretinopathy », *Am. J. Pathol.*, vol. 184, n° 11, p. 3052-3068, nov. 2014, doi: 10.1016/j.ajpath.2014.07.026.
- [260] T. P. Fleming, A. Saxena, W. C. Clark, J. T. Robertson, S. A. Aaronson, et I. U. Ali, « Amplification and/or Overexpression of Platelet-derived Growth Factor Receptors and Epidermal Growth Factor Receptor in Human Glial Tumors », p. 5.
- [261] M. Hermanson, K. FuÃ, B. Westermarck, et M. Nister, « Platelet-derived Growth Factor and Its Receptors in Human Glioma Tissue »:, p. 8.
- [262] N. A. Lokker, C. M. Sullivan, S. J. Hollenbach, M. A. Israel, et N. A. Giese, « Platelet-derived Growth Factor (PDGF) Autocrine Signaling Regulates Survival and Mitogenic Pathways in Glioblastoma Cells: Evidence That the Novel PDGF-C and PDGF-D Ligands May Play a Role in the Development of Brain Tumors », p. 8.
- [263] C. Brennan *et al.*, « Glioblastoma Subclasses Can Be Defined by Activity among Signal Transduction Pathways and Associated Genomic Alterations », *PLoS ONE*, vol. 4, n° 11, p. e7752, nov. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007752.
- [264] The Cancer Genome Atlas Research Network, « Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways », *Nature*, vol. 455, n° 7216, p. 1061-1068, oct. 2008, doi: 10.1038/nature07385.
- [265] T. Ozawa *et al.*, « PDGFRA gene rearrangements are frequent genetic events in PDGFRA-amplified glioblastomas », *Genes Dev.*, vol. 24, n° 19, p. 2205-2218, oct. 2010, doi: 10.1101/gad.1972310.
- [266] J. Cools *et al.*, « A Tyrosine Kinase Created by Fusion of the *PDGFRA* and *FIP1L1* Genes as a Therapeutic Target of Imatinib in Idiopathic Hypereosinophilic Syndrome », *N. Engl. J. Med.*, vol. 348, n° 13, p. 1201-1214, mars 2003, doi: 10.1056/NEJMoa025217.
- [267] A. Pardanani *et al.*, « *CHIC2* deletion, a surrogate for *FIP1L1*-*PDGFRA* fusion, occurs in systemic mastocytosis associated with eosinophilia and predicts response to imatinib mesylate therapy », *Blood*, vol. 102, n° 9, p. 3093-3096, nov. 2003, doi: 10.1182/blood-2003-05-1627.
- [268] E. H. Stover *et al.*, « Activation of *FIP1L1*-*PDGFR* requires disruption of the juxtamembrane domain of *PDGFR* and is *FIP1L1*-independent », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n° 21, p. 8078-8083, mai 2006, doi: 10.1073/pnas.0601192103.
- [269] « golub 1994.pdf ».
- [270] A. Reiter et J. Gotlib, « Myeloid neoplasms with eosinophilia », *Blood*, vol. 129, n° 6, p. 704-714, févr. 2017, doi: 10.1182/blood-2016-10-695973.
- [271] F. A. Arts *et al.*, « *PDGFRB* gain-of-function mutations in sporadic infantile myofibromatosis », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 26, n° 10, p. 1801-1810, mai 2017, doi: 10.1093/hmg/ddx081.
- [272] G. Dachy *et al.*, « Association of *PDGFRB* Mutations With Pediatric Myofibroma and Myofibromatosis », *JAMA Dermatol.*, vol. 155, n° 8, p. 946, août 2019, doi: 10.1001/jamadermatol.2019.0114.
- [273] K. Forsberg, I. Valyi-Nagy, C. H. Heldin, M. Herlyn, et B. Westermarck, « Platelet-derived growth factor (PDGF) in oncogenesis: development of a vascular connective tissue stroma in xenotransplanted human melanoma producing PDGF-BB. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, n° 2, p. 393-397, janv. 1993, doi: 10.1073/pnas.90.2.393.
- [274] A. Abramsson, P. Lindblom, et C. Betsholtz, « Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors », *J. Clin. Invest.*, vol. 112, n° 8, p. 1142-1151, oct. 2003, doi: 10.1172/JCI200318549.
- [275] « dong 2004.pdf ».
- [276] M. L. Tejada *et al.*, « Tumor-Driven Paracrine Platelet-Derived Growth Factor Receptor α Signaling Is a Key Determinant of Stromal Cell Recruitment in a Model of Human Lung Carcinoma », *Clin. Cancer Res.*, vol. 12, n° 9, p. 2676-2688, mai 2006, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1770.

- [277] K. Pietras, J. Pahler, G. Bergers, et D. Hanahan, « Functions of Paracrine PDGF Signaling in the Proangiogenic Tumor Stroma Revealed by Pharmacological Targeting », *PLoS Med.*, vol. 5, n° 1, p. e19, janv. 2008, doi: 10.1371/journal.pmed.0050019.
- [278] F. A. Arts, A. I. Velghe, M. Stevens, J. Renauld, A. Essaghir, et J. Demoulin, « Idiopathic basal ganglia calcification-associated *PDGFRB* mutations impair the receptor signalling », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 19, n° 1, p. 239-248, janv. 2015, doi: 10.1111/jcmm.12443.
- [279] « Humbert et al. - Platelet-derived growth factor expression in prima.pdf ».
- [280] R. T. Schermuly, « Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition », *J. Clin. Invest.*, vol. 115, n° 10, p. 2811-2821, oct. 2005, doi: 10.1172/JCI24838.
- [281] N. Selimovic, C.-H. Bergh, B. Andersson, E. Sakiniene, H. Carlsten, et B. Rundqvist, « Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension », *Eur. Respir. J.*, vol. 34, n° 3, p. 662-668, sept. 2009, doi: 10.1183/09031936.00174908.
- [282] H. ten Freyhaus *et al.*, « Genetic Ablation of PDGF-Dependent Signaling Pathways Abolishes Vascular Remodeling and Experimental Pulmonary Hypertension », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 35, n° 5, p. 1236-1245, mai 2015, doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304864.
- [283] B. K. Dahal *et al.*, « Hypoxic Pulmonary Hypertension in Mice with Constitutively Active Platelet-Derived Growth Factor Receptor- β », *Pulm. Circ.*, vol. 1, n° 2, p. 259-268, avr. 2011, doi: 10.4103/2045-8932.83448.
- [284] M. Quatredeniens *et al.*, « Functional interaction between PDGF β and GluN2B-containing NMDA receptors in smooth muscle cell proliferation and migration in pulmonary arterial hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 316, n° 3, p. L445-L455, mars 2019, doi: 10.1152/ajplung.00537.2017.
- [285] A. Yamamura *et al.*, « Enhanced Ca²⁺-Sensing Receptor Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension », *Circ. Res.*, vol. 111, n° 4, p. 469-481, août 2012, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.112.266361.
- [286] H. Tang *et al.*, « Pathogenic role of calcium-sensing receptors in the development and progression of pulmonary hypertension », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 310, n° 9, p. L846-L859, mai 2016, doi: 10.1152/ajplung.00050.2016.
- [287] A. Yamamura, M. J. Nayeem, A. A. Mamun, R. Takahashi, H. Hayashi, et M. Sato, « Platelet-derived growth factor up-regulates Ca²⁺-sensing receptors in idiopathic pulmonary arterial hypertension », *FASEB J.*, vol. 33, n° 6, p. 7363-7374, juin 2019, doi: 10.1096/fj.201802620R.
- [288] A. Ntokou *et al.*, « Macrophage-derived PDGF-B induces muscularization in murine and human pulmonary hypertension », *JCI Insight*, vol. 6, n° 6, p. e139067, mars 2021, doi: 10.1172/jci.insight.139067.
- [289] L. Ciucan *et al.*, « Imatinib Attenuates Hypoxia-induced Pulmonary Arterial Hypertension Pathology via Reduction in 5-Hydroxytryptamine through Inhibition of Tryptophan Hydroxylase 1 Expression », *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 187, n° 1, p. 78-89, janv. 2013, doi: 10.1164/rccm.201206-1028OC.
- [290] Y. Liu, M. Li, R. R. Warburton, N. S. Hill, et B. L. Fanburg, « The 5-HT transporter transactivates the PDGF β receptor in pulmonary artery smooth muscle cells », *FASEB J.*, vol. 21, n° 11, p. 2725-2734, sept. 2007, doi: 10.1096/fj.06-8058com.
- [291] W. Ren, S. W. Watts, et B. L. Fanburg, « Serotonin transporter interacts with the PDGF β receptor in PDGF-BB-induced signaling and mitogenesis in pulmonary artery smooth muscle cells », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 300, n° 3, p. L486-L497, mars 2011, doi: 10.1152/ajplung.00237.2010.
- [292] R. Jones, D. Capen, M. Jacobson, et L. Munn, « PDGF and microvessel wall remodeling in adult rat lung: imaging PDGF-AA and PDGF-R α molecules in progenitor smooth muscle cells developing in experimental pulmonary hypertension », *Cell Tissue Res.*, vol. 326, n° 3, p. 759-769, nov. 2006, doi: 10.1007/s00441-006-0177-5.
- [293] M. J. Overbeek *et al.*, « Platelet-derived growth factor receptor- β and epidermal growth factor receptor in pulmonary vasculature of systemic sclerosis-associated pulmonary arterial hypertension versus idiopathic pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-

- occlusive disease: a case-control study », *Arthritis Res. Ther.*, vol. 13, n° 2, p. R61, 2011, doi: 10.1186/ar3315.
- [294] E. Panzhinskiy, W. M. Zawada, K. R. Stenmark, et M. Das, « Hypoxia induces unique proliferative response in adventitial fibroblasts by activating PDGF β receptor-JNK1 signalling », *Cardiovasc. Res.*, vol. 95, n° 3, p. 356-365, août 2012, doi: 10.1093/cvr/cvs194.
- [295] J. Q. Liu, I. N. Zelko, E. M. Erbynn, J. S. K. Sham, et R. J. Folz, « Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91^{phox}) », *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 290, n° 1, p. L2-L10, janv. 2006, doi: 10.1152/ajplung.00135.2005.
- [296] R. E. Nisbet *et al.*, « The Role of NADPH Oxidase in Chronic Intermittent Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice », *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, vol. 40, n° 5, p. 601-609, mai 2009, doi: 10.1165/2008-0145OC.
- [297] F. Fresquet *et al.*, « Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia: Pulmonary endothelial dysfunction in hypoxic mice », *Br. J. Pharmacol.*, vol. 148, n° 5, p. 714-723, juill. 2006, doi: 10.1038/sj.bjp.0706779.
- [298] A. M. Shah *et al.*, « Effect of imatinib as add-on therapy on echocardiographic measures of right ventricular function in patients with significant pulmonary arterial hypertension », *Eur. Heart J.*, vol. 36, n° 10, p. 623-632, mars 2015, doi: 10.1093/eurheartj/ehu035.
- [299] M. M. Hoeper *et al.*, « Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: Results of the Randomized IMPRES Study », *Circulation*, vol. 127, n° 10, p. 1128-1138, mars 2013, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.000765.
- [300] H. ten Freyhaus, D. Dumitrescu, E. Berghausen, M. Vantler, E. Caglayan, et S. Rosenkranz, « Imatinib mesylate for the treatment of pulmonary arterial hypertension », *Expert Opin. Investig. Drugs*, vol. 21, n° 1, p. 119-134, janv. 2012, doi: 10.1517/13543784.2012.632408.
- [301] A. E. Frost *et al.*, « Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension », *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 34, n° 11, p. 1366-1375, nov. 2015, doi: 10.1016/j.healun.2015.05.025.
- [302] M. P. Lythgoe, C. J. Rhodes, P. Ghataorhe, M. Attard, J. Wharton, et M. R. Wilkins, « Why drugs fail in clinical trials in pulmonary arterial hypertension, and strategies to succeed in the future », *Pharmacol. Ther.*, vol. 164, p. 195-203, août 2016, doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.04.012.
- [303] A. Galkin *et al.*, « Pharmacologic characterization of GB002, a novel inhaled PDGFR kinase inhibitor in development for pulmonary arterial hypertension (PAH) », in *Pulmonary hypertension*, sept. 2020, p. 3550. doi: 10.1183/13993003.congress-2020.3550.
- [304] R. Frantz *et al.*, « Phase 2 Clinical Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Inhaled GB002 for the Treatment of World Health Organization Group 1 Pulmonary Arterial Hypertension », *J. Heart Lung Transplant.*, vol. 40, n° 4, p. S107, avr. 2021, doi: 10.1016/j.healun.2021.01.346.
- [305] G. X. Y. Zheng *et al.*, « Massively parallel digital transcriptional profiling of single cells », *Nat. Commun.*, vol. 8, n° 1, p. 14049, avr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14049.
- [306] T. Stuart *et al.*, « Comprehensive Integration of Single-Cell Data », *Cell*, vol. 177, n° 7, p. 1888-1902.e21, juin 2019, doi: 10.1016/j.cell.2019.05.031.
- [307] F. A. Wolf *et al.*, « PAGA: graph abstraction reconciles clustering with trajectory inference through a topology preserving map of single cells », *Genome Biol.*, vol. 20, n° 1, p. 59, déc. 2019, doi: 10.1186/s13059-019-1663-x.
- [308] M. Guo *et al.*, « Single cell RNA analysis identifies cellular heterogeneity and adaptive responses of the lung at birth », *Nat. Commun.*, vol. 10, n° 1, p. 37, déc. 2019, doi: 10.1038/s41467-018-07770-1.
- [309] S. Akagi *et al.*, « Delivery of Imatinib-Incorporated Nanoparticles into Lungs Suppresses the Development of Monocrotaline-Induced Pulmonary Arterial Hypertension », *Int. Heart J.*, vol. 56, n° 3, p. 354-359, 2015, doi: 10.1536/ihj.14-338.

- [310] B. Baumgart *et al.*, « In vitro and in vivo evaluation of dasatinib and imatinib on physiological parameters of pulmonary arterial hypertension », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 79, n° 4, p. 711-723, avr. 2017, doi: 10.1007/s00280-017-3264-2.
- [311] Z. P. Leong, A. Okida, M. Higuchi, Y. Yamano, et Y. Hikasa, « Reversal effects of low-dose imatinib compared with sunitinib on monocrotaline-induced pulmonary and right ventricular remodeling in rats », *Vascul. Pharmacol.*, vol. 100, p. 41-50, janv. 2018, doi: 10.1016/j.vph.2017.10.006.
- [312] S. A. Antoniu, « Targeting PDGF pathway in pulmonary arterial hypertension », *Expert Opin. Ther. Targets*, vol. 16, n° 11, p. 1055-1063, nov. 2012, doi: 10.1517/14728222.2012.719500.
- [313] H. Boström *et al.*, « PDGF-A Signaling Is a Critical Event in Lung Alveolar Myofibroblast Development and Alveogenesis », *Cell*, vol. 85, n° 6, p. 863-873, juin 1996, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81270-2.
- [314] C. Qian *et al.*, « Stage specific requirement of platelet-derived growth factor receptor- α in embryonic development », *PLOS ONE*, vol. 12, n° 9, p. e0184473, sept. 2017, doi: 10.1371/journal.pone.0184473.
- [315] S. Song *et al.*, « The role of PDGF-B/TGF- β 1/nepriylsin network in regulating endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary artery remodeling », *Cell. Signal.*, vol. 28, n° 10, p. 1489-1501, oct. 2016, doi: 10.1016/j.cellsig.2016.06.022.
- [316] « xiong 2021.pdf ».
- [317] T. Minamino *et al.*, « Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 98, n° 15, p. 8798-8803, juill. 2001, doi: 10.1073/pnas.161272598.
- [318] E. Vergadi *et al.*, « Early Macrophage Recruitment and Alternative Activation Are Critical for the Later Development of Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension », *Circulation*, vol. 123, n° 18, p. 1986-1995, mai 2011, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.978627.
- [319] T. Hashimoto-Kataoka *et al.*, « Interleukin-6/interleukin-21 signaling axis is critical in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, n° 20, p. E2677-E2686, mai 2015, doi: 10.1073/pnas.1424774112.
- [320] M. Kurosaka et S. Machida, « Interleukin-6-induced satellite cell proliferation is regulated by induction of the JAK 2/ STAT 3 signalling pathway through cyclin D1 targeting », *Cell Prolif.*, vol. 46, n° 4, p. 365-373, août 2013, doi: 10.1111/cpr.12045.
- [321] J. Hester, C. Ventetuolo, et T. Lahm, « Sex, Gender, and Sex Hormones in Pulmonary Hypertension and Right Ventricular Failure », *Compr. Physiol.*, vol. 10, n° 1, p. 125-170, déc. 2019, doi: 10.1002/cphy.c190011.
- [322] R. H. Karas, B. L. Patterson, et M. E. Mendelsohn, « Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. », *Circulation*, vol. 89, n° 5, p. 1943-1950, mai 1994, doi: 10.1161/01.CIR.89.5.1943.
- [323] N. Harada, H. Sasano, H. Murakami, T. Ohkuma, H. Nagura, et Y. Takagi, « Localized Expression of Aromatase in Human Vascular Tissues », *Circ. Res.*, vol. 84, n° 11, p. 1285-1291, juin 1999, doi: 10.1161/01.RES.84.11.1285.
- [324] T. Simoncini, A. Hafezi-Moghadam, D. P. Brazil, K. Ley, W. W. Chin, et J. K. Liao, « Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase », *Nature*, vol. 407, n° 6803, p. 538-541, sept. 2000, doi: 10.1038/35035131.
- [325] W. D. Tap *et al.*, « Olaratumab and doxorubicin versus doxorubicin alone for treatment of soft-tissue sarcoma: an open-label phase 1b and randomised phase 2 trial », *The Lancet*, vol. 388, n° 10043, p. 488-497, juill. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)30587-6.
- [326] T. Higuchi *et al.*, « Olaratumab combined with doxorubicin and ifosfamide overcomes individual doxorubicin and olaratumab resistance of an undifferentiated soft-tissue sarcoma in a PDOX mouse model », *Cancer Lett.*, vol. 451, p. 122-127, juin 2019, doi: 10.1016/j.canlet.2019.03.003.

- [327] A. J. Wagner *et al.*, « A phase II study of a human anti-PDGFR α monoclonal antibody (olaratumab, IMC-3G3) in previously treated patients with metastatic gastrointestinal stromal tumors », *Ann. Oncol.*, vol. 28, n $^{\circ}$ 3, p. 541-546, mars 2017, doi: 10.1093/annonc/mdw659.
- [328] H. Feng *et al.*, « Activation of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180Y1811 mediates PDGFR α -stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans », *J. Clin. Invest.*, vol. 121, n $^{\circ}$ 12, p. 4670-4684, déc. 2011, doi: 10.1172/JCI58559.
- [329] E. A. Pickett, G. S. Olsen, et M. D. Tallquist, « Disruption of PDGFR α -initiated PI3K activation and migration of somite derivatives leads to spina bifida », *Development*, vol. 135, n $^{\circ}$ 3, p. 589-598, févr. 2008, doi: 10.1242/dev.013763.
- [330] F. Dilasser *et al.*, « Essential role of smooth muscle Rac1 in severe asthma-associated airway remodelling », *Thorax*, vol. 76, n $^{\circ}$ 4, p. 326-334, avr. 2021, doi: 10.1136/thoraxjnl-2020-216271.
- [331] J. Ge *et al.*, « RhoA, Rac1, and Cdc42 differentially regulate α SMA and collagen I expression in mesenchymal stem cells », *J. Biol. Chem.*, vol. 293, n $^{\circ}$ 24, p. 9358-9369, juin 2018, doi: 10.1074/jbc.RA117.001113.
- [332] C. M. Kitchen, S. L. Cowan, X. Long, et J. M. Miano, « Expression and promoter analysis of a highly restricted integrin alpha gene in vascular smooth muscle », *Gene*, vol. 513, n $^{\circ}$ 1, p. 82-89, janv. 2013, doi: 10.1016/j.gene.2012.10.073.
- [333] T. Ogawa, Y. Li, I. Lua, A. Hartner, et K. Asahina, « Isolation of a unique hepatic stellate cell population expressing integrin α 8 from embryonic mouse livers: ITGA8 in Liver Mesenchymal Cells », *Dev. Dyn.*, vol. 247, n $^{\circ}$ 6, p. 867-881, juin 2018, doi: 10.1002/dvdy.24634.
- [334] J. Ryu *et al.*, « Highly Expressed Integrin- α 8 Induces Epithelial to Mesenchymal Transition-Like Features in Multiple Myeloma with Early Relapse », *Mol. Cells*, vol. 39, n $^{\circ}$ 12, p. 898-908, déc. 2016, doi: 10.14348/molcells.2016.0210.
- [335] I. Marek *et al.*, « Alpha8 Integrin (Itga8) Signalling Attenuates Chronic Renal Interstitial Fibrosis by Reducing Fibroblast Activation, Not by Interfering with Regulation of Cell Turnover », *PLOS ONE*, vol. 11, n $^{\circ}$ 3, p. e0150471, mars 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0150471.
- [336] N. Nishimichi *et al.*, « Induced hepatic stellate cell integrin, α 8 β 1, enhances cellular contractility and TGF β activity in liver fibrosis », *J. Pathol.*, vol. 253, n $^{\circ}$ 4, p. 366-373, avr. 2021, doi: 10.1002/path.5618.
- [337] C. F. Hung, C. L. Wilson, Y.-H. Chow, et L. M. Schnapp, « Role of integrin alpha8 in murine model of lung fibrosis », *PLOS ONE*, vol. 13, n $^{\circ}$ 5, p. e0197937, mai 2018, doi: 10.1371/journal.pone.0197937.
- [338] S. Matsushima *et al.*, « CD248 and integrin alpha-8 are candidate markers for differentiating lung fibroblast subtypes », *BMC Pulm. Med.*, vol. 20, n $^{\circ}$ 1, p. 21, déc. 2020, doi: 10.1186/s12890-020-1054-9.
- [339] B. Tomkowicz *et al.*, « Endosialin/TEM-1/CD248 regulates pericyte proliferation through PDGF receptor signaling », *Cancer Biol. Ther.*, vol. 9, n $^{\circ}$ 11, p. 908-915, juin 2010, doi: 10.4161/cbt.9.11.11731.
- [340] A. Wilhelm *et al.*, « CD248/endosialin critically regulates hepatic stellate cell proliferation during chronic liver injury via a PDGF-regulated mechanism », *Gut*, vol. 65, n $^{\circ}$ 7, p. 1175-1185, juill. 2016, doi: 10.1136/gutjnl-2014-308325.
- [341] A. Nanda *et al.*, « Tumor endothelial marker 1 (Tem1) functions in the growth and progression of abdominal tumors », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 103, n $^{\circ}$ 9, p. 3351-3356, févr. 2006, doi: 10.1073/pnas.0511306103.
- [342] K. L. Hill *et al.*, « Human embryonic stem cell-derived vascular progenitor cells capable of endothelial and smooth muscle cell function », *Exp. Hematol.*, vol. 38, n $^{\circ}$ 3, p. 246-257.e1, mars 2010, doi: 10.1016/j.exphem.2010.01.001.
- [343] Y. Xu *et al.*, « Differentiation of CD45-/CD31+ lung side population cells into endothelial and smooth muscle cells in vitro », *Int. J. Mol. Med.*, janv. 2019, doi: 10.3892/ijmm.2019.4053.
- [344] I. Osman, L. Wang, G. Hu, Z. Zheng, et J. Zhou, « GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein)-Positive Progenitor Cells Contribute to the Development of Vascular Smooth Muscle Cells and

Endothelial Cells—Brief Report », *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 40, n° 5, p. 1231-1238, mai 2020, doi: 10.1161/ATVBAHA.120.314078.

- [345] A. Shafiee, J. Patel, D. W. Hutmacher, N. M. Fisk, et K. Khosrotehrani, « Meso-Endothelial Bipotent Progenitors from Human Placenta Display Distinct Molecular and Cellular Identity », *Stem Cell Rep.*, vol. 10, n° 3, p. 890-904, mars 2018, doi: 10.1016/j.stemcr.2018.01.011.

Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et sévère due à l'occlusion progressive des artérioles pulmonaires. Les progéniteurs vasculaires pulmonaires $PW1^+/PDGFR\alpha^+$ participent au remodelage vasculaire en proliférant et en se différenciant en cellules musculaires lisses (CML). Au cours de ce travail de thèse, j'ai étudié les populations de progéniteurs vasculaires ainsi que leur régulation par la voie $PDGFR\alpha$. Chez les patients, le nombre de cellules périvasculaires $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^-$ et celui des cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^+$ dans la media et la néointima des vaisseaux pulmonaires sont augmentés, potentiellement suite à l'activation de $PDGFR\alpha$. Dans un modèle d'hypertension pulmonaire (HP) chez la souris, l'hypoxie chronique (HC) induit une prolifération et une différenciation des progéniteurs $PW1^+$ en CML dès 4 jours, contribuant au remodelage des artérioles pulmonaires. L'inhibition de $PDGFR\alpha$ prévient ces phénomènes précoces sans empêcher l'établissement d'une HP à 28 jours d'HC. A l'inverse, en normoxie, l'activation constitutive de $PDGFR\alpha$ induit dès 15 jours la différenciation des progéniteurs $PW1^+$ en CML et la (néo)muscularisation des artérioles pulmonaires, ainsi qu'une HP (uniquement chez les mâles) après 5 semaines. *In vitro*, l'activation de $PDGFR\alpha$ entraîne la prolifération, mais pas la différenciation, des cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^-$. Pour conclure, $PDGFR\alpha$ régule la prolifération des progéniteurs $PW1^+$ et leur différenciation en CML, contribuant ainsi au remodelage vasculaire lors de l'HTAP.

Un second projet a été initié pour caractériser, par single-cell RNA-sequencing, les différentes populations progénitrices $PW1^+$ et celles qui en dérivent. Nous avons identifié 3 clusters de progéniteurs, qui semblent se différencier en CML d'après l'analyse de trajectoire. L'un des clusters de progéniteurs présente une bi-potentialité, observée *in vitro* en différenciant les cellules $PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^+$ en CML et en CE.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease caused by a progressive occlusion of pulmonary arterioles. $PW1^+/PDGFR\alpha^+$ pulmonary vascular progenitors participate in the vascular remodeling by proliferating and differentiating into smooth muscle cells (SMCs). In this work, I studied the vascular progenitor populations and their regulation by the $PDGFR\alpha$ pathway. In patients, the number of perivascular $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^-$ cells and $PW1^+/PDGFR\alpha^+/\alpha SMA^+$ cells in the media and neointima of pulmonary vessels are increased, potentially as a result of $PDGFR\alpha$ activation. In a mouse model of pulmonary hypertension (PH), chronic hypoxia (CH) induces proliferation and differentiation of $PW1^+$ progenitors into SMCs at 4 days of HC, contributing to pulmonary arteriolar remodeling. Inhibition of $PDGFR\alpha$ prevents these early phenomena without preventing the establishment of PH at 28 days of HC. Conversely, in normoxia, constitutive activation of $PDGFR\alpha$ induces differentiation of $PW1^+$ progenitors into SMCs and (neo)muscularization of pulmonary arterioles at 15 days, as well as PH (only in males) after 5 weeks. *In vitro*, $PDGFR\alpha$ activation leads to proliferation but not to differentiation of $PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^-$. In conclusion, $PDGFR\alpha$ regulates the proliferation of $PW1^+$ progenitors and their differentiation into SMCs, thus contributing to vascular remodeling in PAH.

A second project was initiated to characterize, by single-cell RNA-sequencing, the different $PW1^+$ progenitor populations and those derived from them. We have identified 3 clusters of progenitors, which appear to differentiate into SMCs based on trajectory analysis. One of the progenitor clusters exhibits a bi-potentiality, observed *in vitro* by differentiating $PW1^+/PDGFR\alpha^+/c-kit^+$ cells into SMCs and ECs.