



Étude de l'implication du facteur de transcription FOXM1 en hypertension artérielle pulmonaire

Mémoire

Alice Bourgeois

Maîtrise en médecine moléculaire - avec mémoire
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est nouvellement caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne au-dessus de 20mmHg, une pression capillaire pulmonaire inférieure à 15 mmHg et une résistance vasculaire pulmonaire supérieure ou égale à 3 unités Wood. Cette élévation de la pression et de la résistance vasculaire pulmonaire entraîne une hypertrophie cardiaque droite et peut éventuellement mener à la mort prématurée des patients. L'augmentation de la résistance vasculaire est causée par une vasoconstriction et un remodelage important des artères pulmonaires distales, due en grande partie à une prolifération excessive et une résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (PASMCs), mais également d'autres cellules constituant la paroi des artères pulmonaires distales telles que les cellules endothéliales et les fibroblastes. Malheureusement, les traitements actuellement disponibles sont limités et ne permettent pas une rémission complète de la maladie. Dans le cancer, le facteur de transcription FOXM1 est fréquemment surexprimé et a été décrit comme un régulateur important de plusieurs processus cellulaires tels que la prolifération, l'inflammation et la réparation des dommages à l'ADN, favorisant le développement et la progression tumorale. Considérant les similitudes entre les PASMCs HTAP et les cellules cancéreuses, nous avons posé l'hypothèse qu'une surexpression de FOXM1 favorise le phénotype des PASMCs HTAP et que son inhibition pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique potentielle.

Lors de cette étude, nous avons démontré que FOXM1 est surexprimé dans les PASMCs isolées et dans les poumons de patients HTAP comparativement aux individus témoins, de même que dans différents modèles précliniques. Nous démontrons que la diminution de l'expression de miR-204 observée en HTAP est en partie responsable de la surexpression de FOXM1. L'inhibition moléculaire de FOXM1 par ARN interférant et son inhibition pharmacologique à l'aide de la thiostrepton diminue *in vitro* la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. *In vivo*, l'administration de la thiostrepton permet d'améliorer l'HTAP établie dans deux modèles. L'amélioration des données hémodynamiques est associée à une diminution du remodelage vasculaire. Nous avons montré que la réversion du phénotype HTAP des PASMCs est attribuable à la diminution de l'expression du facteur anti-apoptotique Survivin et de NBS1, membre du complexe MRN impliqué dans la

reconnaissance des dommages à l'ADN, entraînant une diminution de l'activation de voie de réparation des dommages à l'ADN.

Nous avons par la présente étude démontré pour une première fois l'implication de FOXM1 dans l'étiologie de l'HTAP et l'intérêt de cibler cette protéine dans le développement de futures thérapies.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive vascular disease newly characterized by increased mean pulmonary artery pressure above 20 mmHg, capillary pressure under 15 mmHg and vascular resistance above or equal to 3 Wood units. This increase in pressure leads to right heart hypertrophy, failure and, eventually, premature death. Increased vascular resistance is caused by vasoconstriction and remodeling of the distal pulmonary arteries, mainly due to excessive proliferation and resistance to apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), but also from other cells found in the vascular wall such as endothelial cells and fibroblasts. Despite recent advances made in understanding the cellular mechanisms involved in PAH etiology, available treatments remain limited and do not provide a complete cure. In cancer, transcription factor FOXM1 is frequently overexpressed and has been described as a master regulator of multiple cellular process such as proliferation, inflammation and DNA damage repair signaling, thus promoting tumor development and progression. Because of the similarities between PAH-PASMCs and cancer cells, we hypothesized that overexpression of FOXM1 promotes cell proliferation and resistance to apoptosis in PAH and that its inhibition could represent a new therapeutic target.

In this study, we demonstrated that FOXM1 is overexpressed in isolated PASMCs and total lung from PAH patients compared to controls as well as in two preclinical animal models. Decreased expression of miR-204 in PAH-PASMCs accounts for FOXM1 overexpression. Molecular (siRNA) and pharmacological inhibition of FOXM1 using thiostrepton decrease cell proliferation and resistance to apoptosis. Daily administration of thiostrepton improves established PAH in two animal models. Improved hemodynamic data are associated with decreased vascular remodeling. We demonstrated that reversal of PAH phenotype is in part due to the downregulation of anti-apoptotic factor Survivin and NBS1, member of the MRN complex involved in DNA damage recognition, which impairs activation of DNA damage repair signaling.

With this study, we demonstrated for the first time that FOXM1 is involved in PAH etiology and the interest in targeting FOXM1 for the development of futures therapies.

Table des matières

Résumé.....	II
Abstract.....	IV
Table des matières.....	V
Liste des tableaux.....	VII
Liste des figures.....	VIII
Liste des abréviations	IX
Remerciements	XIII
Avant-propos	XV
Introduction.....	1
1. Le système cardiovasculaire	2
1.1 Le cœur.....	2
1.2 Circulation sanguine.....	3
1.3 Vaisseaux sanguins	5
2. Hypertension pulmonaire	7
2.1 Hypertension pulmonaire et classification.....	7
2.2 Symptômes et diagnostic de l'HTAP.....	10
2.2.1 Symptômes et présentation clinique	10
2.2.2 Outils diagnostiques de l'HTP.....	10
2.2.2.1 Échocardiographie	10
2.2.2.2 Cathétérisme cardiaque droit	11
2.2.3.1 Classe fonctionnelle.....	13
2.2.3.2 Test de marche	14
2.3 Traitements actuels de l'HTAP.....	14
2.3.1 Inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5	15
2.3.2 Analogues de la prostacycline	16
2.3.3 Antagonistes des récepteurs à l'endothéline	17
2.3.4 Inhibiteurs des canaux calciques.....	18
3. Physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'HTAP.....	19
3.1 Susceptibilité génétique	20
3.2 Cellules endothéliales.....	21
3.2.1 Lésions plexiformes.....	22
3.2.2 Transition endothéliale – mésoenchymateuse	23
3.3 Inflammation et immunité.....	23
3.4 Facteurs de croissance.....	24
3.4.1 Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF).....	25
3.4.2 Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).....	25
3.4.3 Superfamille des TGF- β (transforming growth factor beta).....	26
3.6 Altérations métaboliques (effet Warburg) et mitochondries.....	26
3.7 Facteurs de transcription, oncogènes et voies de signalisation.....	29
3.7.1 Facteur de transcription STAT3.....	29
3.7.2 Facteur de transcription NFAT	30
3.7.3 Facteur de transcription HIF	30
3.7.4 Facteurs FOX	33
3.7.5 Facteur anti-apoptotique Survivin.....	34
3.9 Facteurs épigénétiques	36

3.9.1 Méthylation de l'ADN	36
3.9.2 Modification des histones	37
3.9.3 Les ARN non codants	38
3.10 Dommages à l'ADN.....	40
3.10.1 Recombinaison non homologue (NHEJ)	42
3.10.2 Recombinaison homologue (HR)	42
3.10.3 Dommages à l'ADN en HTAP	43
4. Modèles animaux de l'HTAP	44
4.1 Le modèle monocrotaline (MCT)	45
4.2 Le modèle Sugén – Hypoxie (Su/Hx).....	46
4.3 Autres modèles animaux de l'HTAP	46
4.3.1 Hypoxie chronique.....	46
4.3.2 Modèle «fawn hooded rat» (FHR).....	47
4.3.3 Modèles transgéniques.....	47
4.3.4 Constriction de l'artère pulmonaire	48
4.4 Limitations associées aux études précliniques dans les modèles animaux	49
5. Le facteur de transcription FOXM1.....	49
5.1 FOXM1 et la grande famille des FOX.....	50
5.2 FOXM1 dans le cycle cellulaire.....	51
5.3 FOXM1 dans le développement pulmonaire	52
5.4 FOXM1 dans l'inflammation.....	52
5.5 FOXM1 dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN.....	53
5.6 FOXM1 et métabolisme cellulaire	54
5.7 Inhibiteurs connus de FOXM1.....	54
5.8 FOXM1 en hypertension artérielle pulmonaire	55
6. Hypothèses et objectifs de recherche	56
Chapitre 1	57
Résultats - Insertion d'article	57
Résumé.....	59
Abstract	60
Introduction	61
Materials and methods.....	62
Results.....	64
Discussion	68
Acknowledgements.....	71
References	72
Figure legends	85
Electronic supplementary material.....	88
Supplementary Figures	92
References	98
Discussion et conclusion	99
Discussion	100
Limites de l'étude	104
Conclusion et perspectives	106
Bibliographie	107
Annexe.....	124
Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets	125

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Classification de l'hypertension pulmonaire.....p.7

Tableau 1.2 : Classes fonctionnelles de l'hypertension pulmonaire.....p.13

Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma anatomique du cœur humain en vue quatre chambres	p.2
Figure 1.2 : Système circulatoire sanguin	p.4
Figure 1.3 : Structure des vaisseaux sanguins.....	p.5
Figure 1.4 : Cathétérisme cardiaque droit – insertion de la sonde et tracé de pression correspondant	p.12
Figure 1.5 : Voies thérapeutiques ciblées dans l’hypertension artérielle pulmonaire	p.15
Figure 1.6 : Représentation schématique de la progression pathologique de l’HTAP	p.19
Figure 1.7 : Schéma représentatif de l’effet Warburg	p. 27
Figure 1.8 : Représentation de la voie de signalisation HIF-1 et sa régulation en normoxie vs hypoxie.....	p.32
Figure 1.9 : Schéma représentatif des microARNs impliqués dans le remodelage vasculaire en HTAP.....	p.39
Figure 1.10 : Représentation schématique de la réparation des dommages à l’ADN.....	p.41
Figure 1.11 : Structure du gène et des domaines fonctionnels de FOXM1	p.50

Liste des abréviations

α SMA	Alpha-smooth muscle actin
ANP	Peptide natriurétique de type A
AP	Artère pulmonaire
APD	Artère pulmonaire distale
ATP	Adénosine triphosphate
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BMP	Bone morphogenic proteins
BMPR2	Bone morphogenetic receptor protein type II
BNP	Peptide natriurétique de type B
BRD	Bromodomaine
BRD4	Bromodomain containing protein 4
Ca ²⁺	Ions calcium
CE	Cellule endothéliale
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CO	Débit cardiaque
CO ₂	Dioxyde de carbone
DCA	Dichloroacetate
DHEA	Dehydroepiandrosterone
Dnmt	DNA methyl transferase
EGF	Facteur de croissance endothéliale
endoMT	Transition endothéliale à mésenchymateuse
ET-1	Endothéline-1
ET _A	Récepteur de l'endothéline type A
ET _B	Récepteur de l'endothéline type B
FADH	Flavin adénine dinucleotide
FAO	Oxydation des acides gras
FHR	Fawn hooded rat
FOX	Protéine Forkhead box
FOXM1	Forkhead box protein M1
GLUT1	Transporteur de glucose de type 1
GLUT3	Transporteur de glucose de type 3
GMP	Guanosine monophosphate
GTP	Guanosine triphosphate
HAT	Histone acétyl transferase
HDAC	Histone désacétylase
HIF	Facteur inductible à l'hypoxie
HK-II	Hexokinase 2

HR	Recombinaison homologue
HTP	Hypertension pulmonaire
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
IL	Interleukine
JAK	Janus Kinase
KO	Knock out
Ku70	Lupus Ku autoantigen protein p70
LDHA	Lactate déshydrogénase A
lncRNA	long ARN non codant
LPS	Lipopolysaccharide
MCT	Monocrotaline
miR	Micro ARN
mmHg	Millimètre de mercure
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NFAT	Nuclear factor of activated T cell
NHEJ	Non-homologous end joining
NO	Oxyde nitrique
O ₂	Oxygène
OD	Oreillette droite
OG	Oreillette gauche
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PAPO	Pression artérielle pulmonaire occluse
PARP-1	Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PASMC	Cellule musculaire lisse d'artère pulmonaire
PDE-5	Phosphodiesterase type 5
PDGF	Platelet derived growth factor
PDH	Pyruvate déshydrogénase
PKM2	Pyruvate kinase de type M2
PLK1	Polo-like Kinase 1
POD	Pression de l'oreillette droite
RVP	Résistance vasculaire pulmonaire
RVSP	Pression systolique du ventricule droit
SOD2	Superoxide dismutase 2
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Su/Hx	Sugen/Hypoxie
TGF- β	Transforming growth factor beta
TNF α	Tumor necrosis factor alpha
TRV	Vitesse de régurgitation valve tricuspide
VD	Ventricule droit
VEGF	Facteur de croissance endothéliale vasculaire

VG	Ventricule gauche
γ H2AX	Phospho-histone H2A.X

*À ma famille, à François
Pour leur soutien*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur et codirecteur de recherche, les Dr Sébastien Bonnet et Dr Olivier Boucherat. Merci de m'avoir permis d'effectuer et de mener à terme l'ensemble de ces travaux. Sébastien, un merci tout particulier de m'avoir fait confiance et accepté dans ton laboratoire il y a déjà plus de cinq ans de cela alors qu'à ce moment l'HTAP était pour moi une pathologie complètement inconnue. Merci pour toute cette confiance démontrée au cours des années qui m'ont permis de repousser mes limites. Olivier, un merci tout particulier pour ta patience et ta passion qui ont pour moi été une inspiration. Merci de m'avoir prise sous ton aile et de maintenant poursuivre cette aventure de recherche avec moi.

Merci également aux Drs Steeve Provencher et Roxane Paulin qui ont toujours su m'encourager et être de bons conseils, à s'être intéressés à mes travaux et d'avoir toujours été disponible pour moi.

Merci aux Drs Richard Kinkead et François Maltais d'avoir accepté de réviser et corriger ce manuscrit. Vos précieux commentaires auront permis d'améliorer et de donner la touche finale à ce manuscrit.

Merci à toute l'équipe de professionnels de recherche, Valérie, Sandra B, Eve, Sandra M et Mark, de même qu'aux anciennes, Caroline et Renée, de m'avoir appris, appuyé et encouragé au cours de toutes ces années. Votre aide si précieuse et vos conseils m'auront guidé au long de ces études.

Au cours de mes études, j'aurai eu la chance de côtoyer grand nombre de personnes qui, de près ou de loin, directement ou indirectement, auront contribué à ce manuscrit. Aux anciens, Jolyane, François, Benoit, merci de m'avoir partagé votre passion pour la recherche. J'en garde de très bons souvenirs et vous serez toujours pour moi des modèles de réussite. MC my friend et ma Gégé, merci pour tous ces moments de complicité hors pair et pour votre présence qui aura été d'un très grand soutien. Karima, merci pour ta bonne humeur qui était pour moi comme un petit rayon de soleil dans mes journées. J'apprécie la complicité qu'on a développée au cours des dernières années et qui a mon grand bonheur pourra continuer,

bienvenue dans l'équipe. Charifa, Yan, Charlotte, Victoria, Émilie, grâce à vous notre petite équipe s'est agrandie peu à peu, votre arrivée a apporté un vent de fraîcheur qui m'aura permis de développer de belles amitiés et découvrir de nouvelles passions. Un merci particulier à Sarah-Eve, ma sauveuse sans qui je me demande encore comment j'aurais pu mener à terme mon été 2020. Je ne le dirai jamais assez, mais merci (oui, tu dois être particulièrement tannée de l'entendre, mais je le dirai encore et encore). J'ai plus que hâte de te compter parmi nous pour ta maîtrise. Junichi, Tsukasa, Wen-Hui, merci de m'avoir fait découvrir de nouvelles cultures et je suis chanceuse de pouvoir compter sur vos amitiés outre-mer.

Un merci à toutes les personnes que j'aurai pu croiser au quotidien et qui ont su rendre mes journées plus agréables. Michel et Anne-Marie, vous croiser en fin de journée m'apportait toujours un petit plus à ma journée. Merci de prendre soin de mes plantes, le talent de pouce vert va se développer lorsque le temps le voudra.

Un gros merci à ma famille de m'avoir supporté depuis le début, de m'avoir encouragée dans ma décision de poursuivre dans les études graduées même si ça ne faisait pas toujours beaucoup de sens pour vous.

Tout dernièrement un mot particulier pour toi, François. On peut dire qu'on aura vécu une dernière année « rock and roll » entre les deux virus, mais qui aura su m'ouvrir les yeux vers de nouveaux horizons. Merci pour ta bonne humeur contagieuse, ton honnêteté et des petites bulles qui pigmentent mon quotidien. Merci pour tout ce que tu me fais découvrir et pour tes encouragements sans précédent qui rendent le tout beaucoup plus agréable.

Avant-propos

Mon expérience dans le laboratoire de recherche en hypertension artérielle pulmonaire a débuté par deux stages d'été effectués au cours de mon baccalauréat. Bien qu'à ce moment je n'avais toujours pas entamé mes études de deuxième cycle, j'ai eu la chance de contribuer très rapidement à plusieurs articles qui ont depuis été publiés dans de prestigieuses revues scientifiques et qui ont permis d'améliorer grandement la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de la pathologie. Les travaux auxquels j'ai contribué sont listés ci-dessous. Parmi ceux-ci, nous avons entre autres démontré l'importance du facteur épigénétique BRD4 dans l'étiologie de l'hypertension artérielle pulmonaire (Meloche et al 2015). Cette étude nous a permis de pousser plus loin en réalisant une première étude multicentrique préclinique pour évaluer le potentiel thérapeutique du RVX-208, un inhibiteur de la famille des BET ayant une affinité préférentielle pour BRD4, en hypertension pulmonaire (Van Der Fen et al 2019). Les résultats prometteurs de ces études ont permis de développer un partenariat avec la compagnie pharmaceutique Resverlogix pour l'initiation d'une étude clinique servant à évaluer le potentiel thérapeutique de l'Apabetalone (RVX-208) en hypertension artérielle pulmonaire (étude APPRoAcH-p, NCT03655704). Lors de mes études de deuxième cycle, j'ai contribué en tant qu'auteure principale à l'article présenté au chapitre 2 de ce mémoire, publié dans la revue scientifique « Journal of Molecular Medicine ». J'ai également participé en tant que première auteure à la rédaction d'une revue portant sur les nouvelles découvertes physiopathologiques et avenues thérapeutiques en hypertension artérielle pulmonaire, qui sera insérée en annexe. Totalisant toutes ces années, j'aurai ainsi contribué à la production de 8 articles scientifiques et d'une revue de littérature, en plus d'avoir contribué à plus d'une vingtaine de résumés soumis dans le cadre de congrès internationaux. Au cours de ces années, j'ai également eu la chance de collaborer sur plusieurs projets menés à l'international.

CHAPITRE 1:

FOXO1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension.

Alice Bourgeois, Caroline Lambert, Karima Habbout, Benoit Ranchoux, Stéphanie Paquet-Marceau, Isabelle Trinh, Sandra Breuils-Bonnet, Renée Paradis, Valérie Nadeau, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Sébastien Bonnet, Olivier Boucherat

Journal of Molecular Medicine

Received: 4 October 2017 / Revised: 16 November 2017 / Accepted: 20 December 2017

Facteur d'impact : 4.938

Dans cet article, j'ai été responsable de l'exécution d'environ 70% des expériences, de la collecte de données et des analyses statistiques associées. J'ai également contribué à la réalisation des figures de même qu'à la révision du manuscrit. Caroline Lambert, Karima Habbout, Isabelle Trinh, Valérie Nadeau, Sandra Breuils-Bonnet et Renée Paradis m'ont soit apporté une aide technique ou ont participé à la collecte de données pour certaines expériences. Benoit Ranchoux et Stéphanie Paquet-Marceau m'ont apporté un soutien lors de l'analyse des résultats. Le Dr Steeve Provencher a permis l'accès aux échantillons humains ainsi qu'à la consultation des données cliniques des patients, en plus d'apporter un soutien sur l'orientation du projet avec la Dre Roxane Paulin. Les Drs Sébastien Bonnet et Olivier Boucherat ont participé à l'élaboration, à la supervision du projet et à la rédaction du manuscrit.

ANNEXE:

Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets

Bourgeois A, Omura J, Habbout K, Bonnet S, Boucherat O.

Int J Biochem Cell Biol. Novembre 2018

Facteur d'impact : 4.240

Dans cette revue, j'ai été la principale rédactrice, appuyée par les coauteurs ayant également tous participé à la rédaction et à la révision du manuscrit. J'ai également contribué à l'élaboration des figures intégrées à la revue avec O. Boucherat.

Au cours de mes études, j'ai également contribué en tant que coauteure aux articles référencés ci-dessous.

Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension.

Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Nadeau V, Lambert C, Paradis R, Provencher S, Bonnet S

Circ Res. 2015 Aug 28;117(6):525-35

Facteur d'impact : 15.862

Contribution : Réalisation d'expérience *in vitro* et analyse de données

Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension.

Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, Péchoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay E, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmueller P, Breuils-Bonnet S, Fadel E, Ranchoux B, Jourdon P, Girerd B, Montani D, Provencher S, Bonnet S, Simonneau G, Humbert M, Perros F

Circulation. 2016 Apr 5;133(14):1371-85

Facteur d'impact : 23.045

Contribution : Apport d'un support technique pour les expérimentations *in vivo* et analyse de données

HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension.

Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, Lampron MC, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Goncharova EA, Provencher S, Bonnet S.

Sci Rep. 2017 Jul 3;7(1):4546.

Facteur d'impact : 4.122

Contribution : Réalisation d'expériences *in vitro* et analyse de données, expérimentations *in vivo*

Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension.

Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, Nadeau V, Breuils-Bonnet S, Boilet-Molez S, Potus F, Meloche J, Chabot S, Lambert C, Tremblay E, Chae YC, Altieri DC, Sutendra G, Michelakis ED, Paulin R, Provencher S, Bonnet S.

Am J Respir Crit Care Med. 2018 Jul 1;198(1):90-103.

Facteur d'impact : 16.49

Contribution : Réalisation d'expériences *in vitro* et analyse de données, expérimentations *in viv*

Multicenter Preclinical Validation of BET Inhibition for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension.

Van der Feen DE, Kurakula K, Tremblay E, Boucherat O, Bossers GPL, Szulcek R, Bourgeois A, Lampron MC, Habbout K, Martineau S, Paulin R, Kulikowski E, Jahagirdar R, Schaliq I, Bogaard HJ, Bartelds B, Provencher S, Berger RMF, Bonnet S, Goumans MJ.

Am J Respir Crit Care Med. 2019 Oct 1;200(7):910-920.

Facteur d'impact : 16.49

Contribution : Réalisation d'expériences *in vitro* et analyse de données

Metabolic Syndrome Exacerbates Pulmonary Hypertension due to Left Heart Disease.

Ranchoux B, Nadeau V, Bourgeois A, Provencher S, Tremblay É, Omura J, Côté N, Abu-Alhayja'a R, Dumais V, Nachbar RT, Tastet L, Dahou A, Breuils-Bonnet S, Murette A, Pibarot P, Dupuis J, Paulin R, Boucherat O, Archer SL, Bonnet S, Potus F.

Circ Res. 2019 Aug 2;125(4):449-466.

Facteur d'impact : 15.862

Contribution : Réalisation d'expériences *in vitro* et analyse de données, expérimentations *in vivo*, révision de l'article

Inhibition of CHK 1 (Checkpoint Kinase 1) Elicits Therapeutic Effects in Pulmonary Arterial Hypertension

Bourgeois A, Bonnet S, Breuils-Bonnet S, Habbout K, Paradis R, Tremblay E, Lampron MC, Orcholski M. E., Potus F, Bertero T, Peterlini T, Chan S. Y., Norris K. A., Paulin R, Provencher S, Boucherat O

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2019 Aug ; 39 (8):1667-1681

Facteur d'impact : 6.607

Contribution : Pour la réalisation de cet article, j'ai effectué environ 80% des expériences et analyses de données. J'ai également participé à la rédaction et à la révision du manuscrit.

Introduction

1. Le système cardiovasculaire

Au cours de l'évolution, les organismes multicellulaires les plus complexes ont développé un système cardiovasculaire essentiel à leur vie. Ce système peut être vu tel un véritable réseau de distribution au sein de l'organisme. Il permet d'alimenter les cellules du corps en oxygène et nutriments nécessaires à leur fonctionnement, tout en favorisant l'évacuation de composés toxiques issus du métabolisme cellulaire. Afin de maintenir l'homéostasie du système, de nombreux organes travaillent de concert afin d'en assurer son bon fonctionnement.

1.1 Le cœur

Le cœur sert de pompe mécanique permettant de faire circuler le sang dans le réseau vasculaire. Au cours de l'évolution animale, ce système s'est grandement transformé pour devenir celui que l'on connaît aujourd'hui chez l'humain. Notre cœur est composé de quatre cavités, soit l'oreillette droite (OD), le ventricule droit (VD), l'oreillette gauche (OG) et le ventricule gauche (VG). Il est directement connecté au réseau vasculaire complexe que forment artères et veines (Figure 1.1).

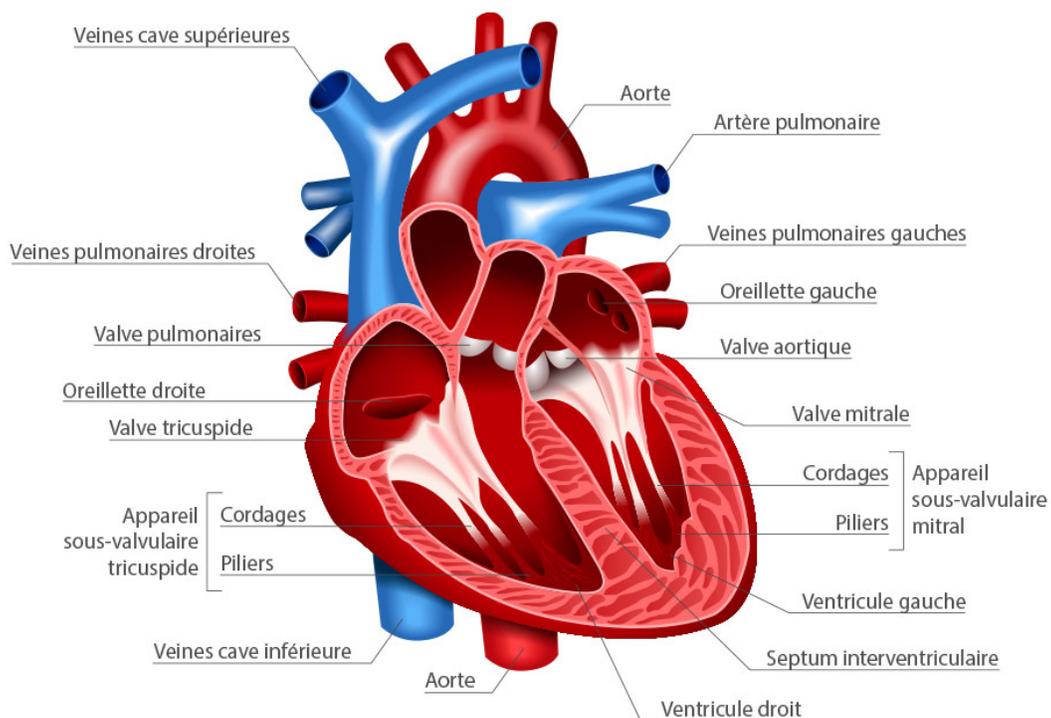


Figure 1.1 : Schéma anatomique du cœur humain en vue quatre chambres. Adapté de <https://www.sante-sur-le-net.com/maladies/cardiologie/generalites-coeur/>

D'un point de vue physiologique, l'OD reçoit le sang pauvre en oxygène (O_2) provenant des veines caves (supérieure et inférieure). Celui-ci va ensuite être dirigé vers le VD, passant par la valve tricuspide qui sépare l'OD et le VD, puis sera éjecté dans l'artère pulmonaire. Au niveau des poumons, les artères se divisent de façon à ne devenir que des petits capillaires. En contact avec les alvéoles, le sang se recharge en oxygène et se débarrasse de métabolites toxiques comme le dioxyde de carbone (CO_2). Suite à son passage dans les capillaires pulmonaires, le sang oxygéné est acheminé jusqu'à l'OG par la veine pulmonaire. Le sang passe de l'OG au VG, et suite au remplissage de celui-ci, le sang est éjecté dans la circulation systémique par l'aorte au moment de la contraction.

Quatre valves sont présentes dans le cœur. Leur structure permet au sang de circuler de façon unidirectionnelle, l'empêchant de refluer vers la cavité d'où il provient. Deux valves se trouvent à la jonction des oreillettes et ventricules ; on retrouve du côté droit la valve tricuspide et du côté gauche la valve mitrale. Les deux autres valves, la valve pulmonaire et la valve aortique, sont situées à la sortie des deux ventricules et empêchent le retour du sang vers le cœur suite à la systole.

1.2 Circulation sanguine

Le système cardiovasculaire humain a évolué de façon à ce qu'il y ait une séparation complète entre la circulation pulmonaire et la circulation systémique. Cette distinction est cruciale considérant qu'il existe des différences fondamentales entre ces deux types de circulations. La circulation systémique fait référence au système circulatoire permettant d'alimenter en sang oxygéné l'ensemble des organes du corps humain. Suite à l'expulsion du sang par le VG dans l'aorte (Figure 1.2 #3), celui-ci va cheminer jusqu'aux plus petits capillaires sanguins, où les principaux échanges entre O_2 , CO_2 et nutriments se font (Figure 1.2 #4). Le sang pauvre en oxygène est ensuite réacheminé au cœur par le système veineux (Figure 1.2 #1). La pression du système artériel est à son maximum au niveau de l'aorte, puis diminue progressivement jusqu'aux capillaires sanguins. En moyenne, la pression est évaluée à 120 mmHg lors de la systole et 80 mmHg lors de la diastole.

Dans de la circulation pulmonaire, le sang pauvre en oxygène est d'abord éjecté par le ventricule droit dans l'artère pulmonaire, où il sera acheminé jusqu'aux capillaires alvéolaires pour y être oxygéné (Figure 1.2 #1-2). La pression au sein du réseau vasculaire pulmonaire est beaucoup plus faible que celle du réseau systémique. Au moment de la systole, on évalue la pression comme étant de 25 mmHg et celle de la diastole 8 mmHg.

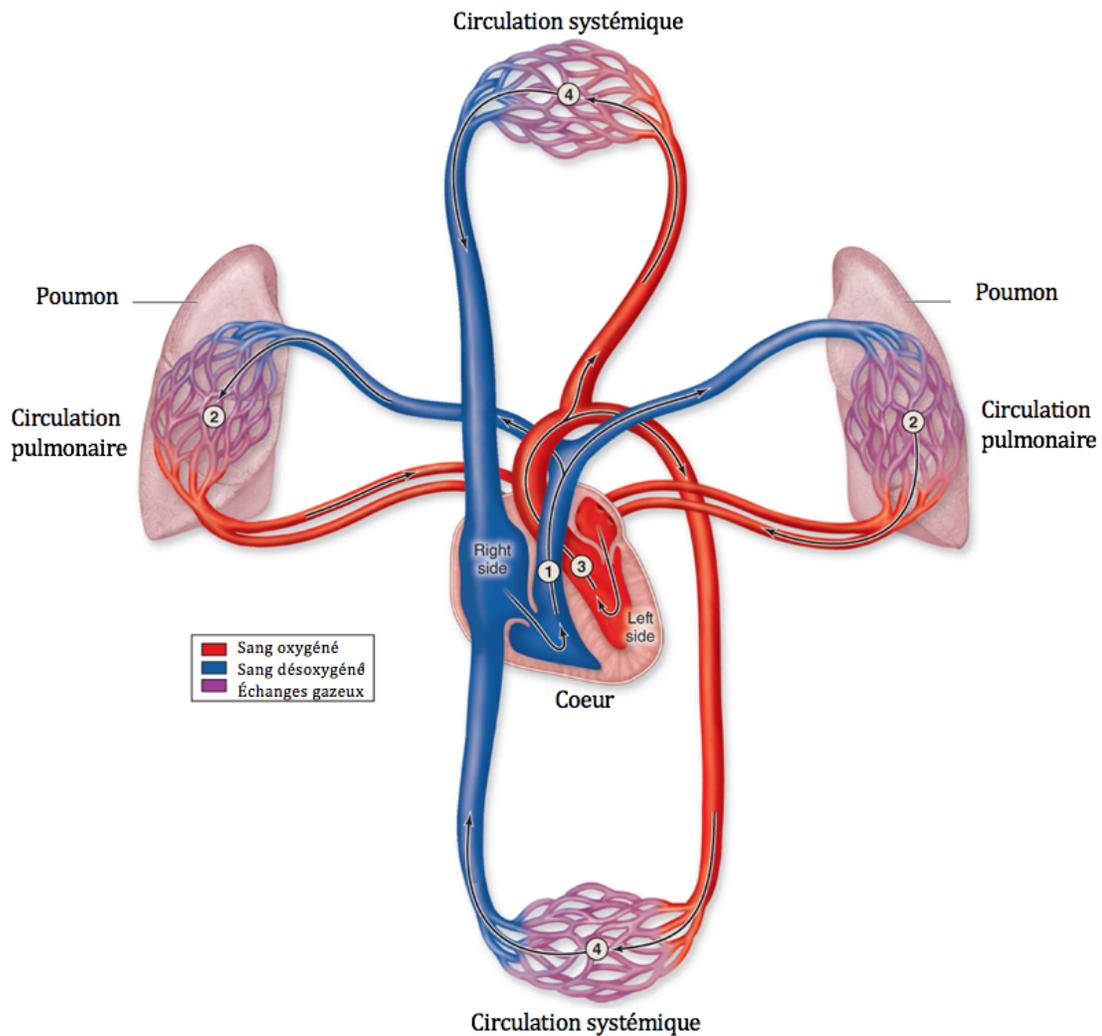


Figure 1.2: Système circulatoire sanguin. Adaptée de The Circulatory System, Mescher AL. *Junqueira's Basic Histology: Text and Atlas, 15e*; 2018

1.3 Vaisseaux sanguins

La structure et la fonction des vaisseaux composant le système vasculaire sont variables. On distingue deux catégories principales de vaisseaux sanguins : les artères et les veines. Les artères reçoivent le sang quittant le cœur, expulsé par les ventricules droit et gauche au moment de la systole. D'un diamètre assez imposant au départ, elles vont rapidement se diviser en petites artérioles de diamètre plus petit, jusqu'à en devenir de minuscules capillaires sanguins. Les veinules et les veines constituent quant à elles les vaisseaux qui réacheminent le sang vers le cœur. Elles varient dans leur taille et leur composition.

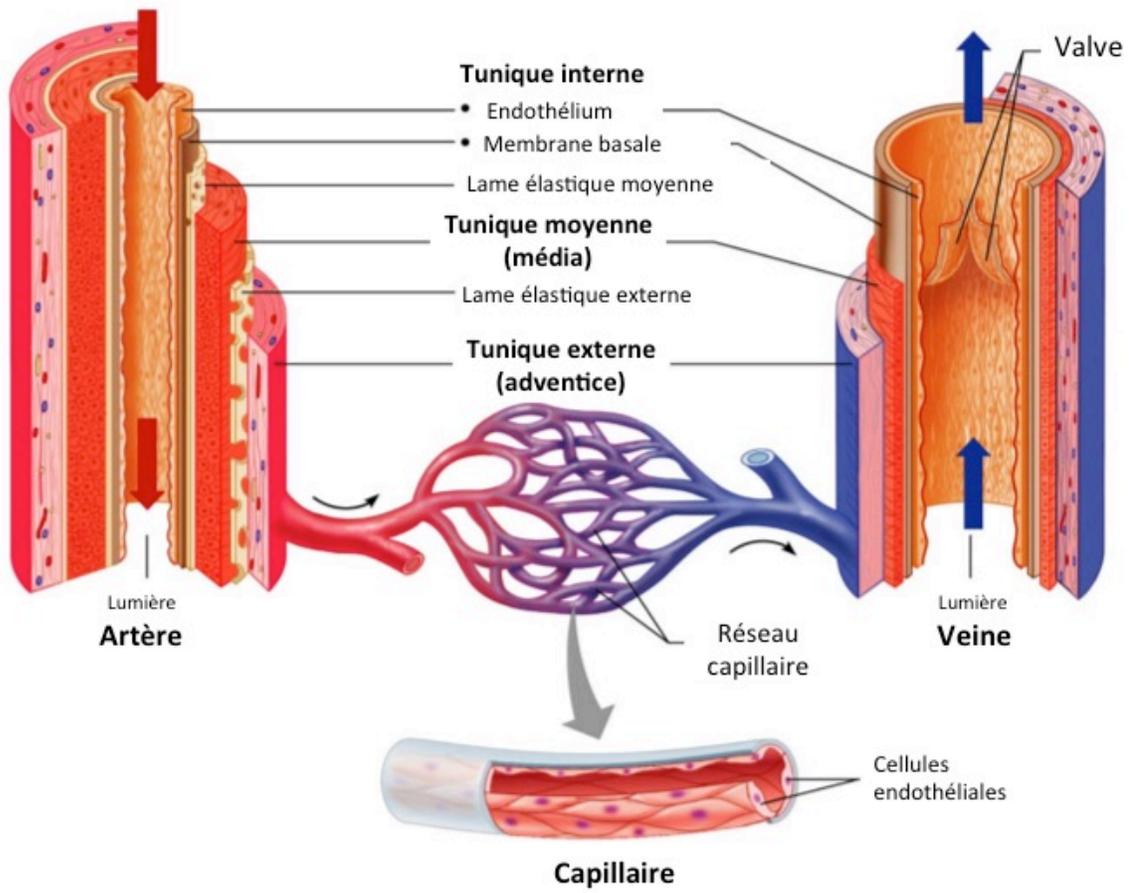


Figure 1.3: Structure des vaisseaux sanguins. Adaptée de Reisner HM. *Pathology: A Modern Case Study*; 2015.

Il est possible de discerner trois tuniques distinctes composant la paroi des artères. La tunique interne (intima) est composée d'une première couche de cellules endothéliales (CE). Ces cellules sont les seules à être en contact direct avec le sang circulant dans la lumière du vaisseau. Elles forment une barrière étanche, empêchant les cellules sanguines et inflammatoires d'infiltrer la paroi artérielle. Cette tunique comprend également une fine membrane basale, servant de support aux cellules endothéliales. La tunique moyenne (média) est composée exclusivement de cellules musculaires lisses (PASMCS). Cette couche cellulaire est également délimitée par deux couches d'élastine. La média joue un rôle important dans le maintien du tonus vasculaire et de la régulation du flux sanguin. En effet, les cellules musculaires lisses ont la capacité de se contracter ou de se relâcher selon les stimuli perçus, ce qui induit les phénomènes de vasoconstriction et vasodilatation. La tunique externe des artères, l'adventice, est constituée principalement de matrice extracellulaire (fibres de collagène et d'élastine) et de fibroblastes. D'autres types cellulaires sont également retrouvés dans l'adventice, notamment des cellules immunitaires et des adipocytes.¹ De plus, au sein des artères de grand diamètre, on retrouve dans cette couche de petits vaisseaux sanguins nommés *vaso vasorum*. Cette tunique joue un rôle essentiel dans la régulation de fonction vasculaire et de la structure des artères.

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux sanguins retrouvés dans le corps. Ils servent de sites d'échanges entre le système circulatoire et les cellules environnantes. Les petits capillaires sanguins ne comportent pas de cellules musculaires. Ils sont constitués uniquement d'une couche de cellules endothéliales et d'une membrane basale, ce qui les rend perméables à de nombreux composés et médiateurs (Figure 1.3).

La structure de la paroi des veines est semblable à celle des artères, excepté qu'elle est plus mince. La plus grande différence se retrouve au niveau de la couche de cellules musculaires lisses, beaucoup plus fine dans les veines que dans les artères. Ainsi, la lumière des veines est de diamètre plus important. La tunique interne des veines forme des projections à l'intérieur de la lumière qui agissent en tant que valvules veineuses. Comme la pression dans ce type de vaisseau est moindre, les valvules empêchent les reflux et favorisent le retour du sang vers le cœur.

2. Hypertension pulmonaire

2.1 Hypertension pulmonaire et classification

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une condition pathologique caractérisée par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 20 mmHg au repos (la moyenne chez un patient sain étant de 14 ± 3 mmHg).^{2,3} L'HTP est considérée comme une maladie rare. En effet, bien qu'il existe peu d'études sur l'épidémiologie de l'HTP en général, il a récemment été démontré que l'incidence et la prévalence de l'HTP tendent à augmenter au Canada. On estime que la prévalence dans la population canadienne serait d'environ 127 cas par 100 000 habitants.⁴

Initialement, on distinguait seulement deux types d'hypertension, soit l'hypertension dite primaire (qui survient en absence de cause connue) et l'hypertension secondaire (secondaire à une autre cause).⁵ Au fil des années, la recherche nous a permis d'avoir une meilleure compréhension des différentes causes et mécanismes impliqués dans la physiopathologie, ce qui a mené à une révision de la classification qui a plutôt été divisée en cinq catégories. À ce jour, cette classification demeure celle qui est préconisée, suivant quelques révisions mineures effectuées au cours des dernières années.⁶

Groupe 1. Hypertension artérielle pulmonaire
1.1 Idiopathique
1.2 Héritable
1.3 Induit par drogues ou toxines
1.4 HTAP associée
1.4.1 Maladies tissu conjonctif
1.4.2 Infection VIH
1.4.3 Hypertension portale
1.4.4 Maladie cardiaque congénitale
1.4.5 Schistosomiase
1.5 HTAP répondant aux bloqueurs des canaux calciques
1.6 HTAP avec atteintes veineuses et capillaires (PVOD/PCH)
1.7 HTAP persistante du nouveau-né
Groupe 2. HTP causée par maladie cardiaque gauche
2.1 HP due à insuffisance cardiaque avec FEVG préservée
2.2 HP due à insuffisance cardiaque avec FEVG non préservée

2.3 Cardiopathie valvulaire
2.4 Affections cardiovasculaires congénitales / acquises conduisant à un HP post-capillaire
Groupe 3. HTP causée par maladie pulmonaire et / ou hypoxie
3.1 Maladie pulmonaire obstructive
3.2 Maladie pulmonaire restrictive
3.3 Autres maladies pulmonaires de type restrictif / obstructif
3.4 Hypoxie sans maladies pulmonaires
3.5 Troubles pulmonaires du développement
Groupe 4. HTP causée par obstruction des artères
4.1 HTP thromboembolique chronique
4.2 Autres types d'obstruction artérielle
Groupe 5. HTP causée par mécanismes non définis et / ou multifactoriels
5.1 Troubles hématologiques
5.2 Troubles systémiques et métaboliques
5.3 Autres
5.4 Cardiopathie congénitale complexe

Tableau 1.1 : Classification de l'hypertension pulmonaire. HTP : hypertension pulmonaire ; FEVG : fraction d'éjection du ventricule gauche. *Adapté de Simonneau et al «Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension», 2018*

Groupe 1 - Hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) représente la catégorie étudiée dans le travail présenté au chapitre 1 (insertion d'article) de ce mémoire. Ce sera donc la seule à être décrite en détail et à laquelle il sera référé par la suite.

Depuis 1973, l'HTAP se caractérisait par une PAPm supérieure à 25 mmHg au repos, mais également par une pression capillaire pulmonaire inférieure à 15 mmHg et une résistance vasculaire pulmonaire (RVP) supérieure ou égale à 3 unités Wood.² Ce n'est que vers la fin de l'année 2018 que les experts ont suggéré de revoir la définition de l'HTAP et d'abaisser le seuil de pression à 20 mmHg, soutenant que ce seuil dépasse le percentile supérieur des valeurs normalement observées dans la population générale.⁶ De plus, une proportion importante des patients à risque d'HTAP (ex. patients avec sclérodémie) présentant une PAPm de 21-25 mmHg évolue ultimement vers une HTAP répondant à la définition initiale (PAPm > 25 mmHg).⁷ Finalement, une PAPm >20mmHg a également été associée à une mortalité accrue dans la population générale.⁸ Les implications cliniques et surtout thérapeutiques de cette nouvelle définition seront cependant à confirmer dans les prochaines

années puisque les patients HTAP avec une PAPm de 21-25mmHg étaient initialement exclus de l'ensemble des études pharmacologiques récentes.

Contrairement aux autres types d'HTP, les patients avec HTAP sont généralement plus jeunes au moment du diagnostic et les femmes sont plus affectées que les hommes, selon un ratio de 1,5 : 1.⁴ La prévalence varie de 15 à 50 cas par million selon les registres.⁹ Bien qu'il y ait eu une amélioration considérable de la survie depuis la mise en marché des thérapies ciblées, le taux de survie est loin d'être optimal, approchant 65% cinq ans suivant le diagnostic.¹⁰

L'HTAP peut être subdivisée en plusieurs sous-catégories (voir le tableau 1.1 pour la liste complète). La première, l'HTAP idiopathique, ne comporte aucune cause connue pouvant expliquer le développement de la pathologie. Elle est la plus fréquente du groupe 1, représentant environ 50% des cas.¹¹ Comme autre sous-catégorie, on retrouve également l'HTAP héritable, qui est généralement attribuable à des mutations génétiques, la plus fréquente étant celle du gène *BMPR2* (bone morphogenetic receptor protein type II).¹² Les autres groupes comprennent l'HTAP associée à diverses conditions (maladie du tissu conjonctif, infection par le VIH, etc), induite par la prise de drogues ou toxines et autres.

L'élévation de la PAPm caractéristique de l'HTAP est causée par une vasoconstriction importante et une obstruction progressive des petites artères pulmonaires distales (APD). De multiples causes sont à l'origine de cette obstruction et elles seront discutées plus en détail dans la section 3 de ce chapitre. Néanmoins, l'oblitération des APD a pour effet d'augmenter la RVP. Afin de maintenir un débit cardiaque constant, le cœur n'a d'autres choix que de s'adapter à l'élévation de la résistance, ce qu'on appelle phase d'hypertrophie adaptative ou de compensation. Après un certain temps, le cœur ne pourra plus compenser à l'augmentation soutenue des pressions, va se dilater, menant ainsi vers la défaillance cardiaque droite et éventuellement au décès prématuré du patient.

2.2 Symptômes et diagnostic de l'HTAP

2.2.1 Symptômes et présentation clinique

Un individu atteint d'HTAP se présente généralement en clinique avec des symptômes non spécifiques à la pathologie. Dans les cas précoces, les symptômes vont surtout se faire ressentir lors d'un effort physique, où on perçoit un essoufflement rapide et une difficulté à respirer. Les individus peuvent également se présenter avec des nausées, une toux sèche ou des douleurs thoraciques. Dans les cas les plus sévères, la dyspnée sera ressentie même au repos ou dans des activités quotidiennes ne demandant qu'un moindre effort. Les symptômes d'insuffisance cardiaque droite (ex. ascite ou œdème des membres inférieurs) et des syncopes peuvent également survenir.¹³

2.2.2 Outils diagnostiques de l'HTP

2.2.2.1 Échocardiographie

L'échocardiographie est une méthode diagnostique non invasive permettant d'estimer les pressions systoliques du VD et de l'artère pulmonaire (AP), en plus d'évaluer la fonction cardiaque et d'identifier des signes associés à la décompensation cardiaque. Ainsi, des patients pour lesquels une HTAP est suspectée vont avoir comme recommandation de se soumettre à une échocardiographie.

L'estimation de la pression systolique du ventricule droit (RVSP) est possible à partir de l'échocardiographie en mesurant la vitesse de régurgitation maximale de la valve tricuspide (TRV), qui estime la différence de pression entre le VD et OD.¹⁴

$$\Delta P = 4(TRV)^2$$

où : ΔP représente le gradient de pression entre le VD et l'OD

En y ajoutant la valeur de la pression de l'oreillette droite (POD) estimée à partir du diamètre de la veine cave inférieure, on obtient la valeur estimée de la RVSP.¹⁵

$$RVSP = 4(TRV)^2 + POD$$

Lors de l'échocardiographie, il est également possible d'estimer la PAPm à partir de la RVSP selon la formule suivante¹⁶ :

$$mPAP = 0.61RVSP + 2$$

Bien qu'il existe une corrélation entre les valeurs de RVSP et PAPm estimées lors de l'échocardiographie et les valeurs réelles obtenues par cathétérisme cardiaque (seul outil permettant de poser un diagnostic définitif), elles ne sont pas toujours équivalentes et l'utilisation seule de l'échocardiographie peut conduire à un mauvais diagnostic. C'est pourquoi les lignes directrices recommandent que l'échocardiographie ne devrait servir qu'à déterminer la probabilité qu'un patient souffre d'HTP et non poser un diagnostic.¹⁷

2.2.2.2 Cathétérisme cardiaque droit

Le cathétérisme cardiaque droit est le seul outil diagnostique permettant de confirmer hors de tout doute la présence d'une HTP. Lors de cet examen, un cathéter est inséré par une veine, typiquement la veine fémorale, brachiale ou jugulaire, afin de se rendre jusqu'au cœur. Une fois dans le cœur, la pression intravasculaire est transmise à rebours via l'extrémité du cathéter vers un capteur de pression situé à l'autre extrémité, ce qui permet de mesurer les pressions dans l'OD, VD et dans l'AP.¹⁸

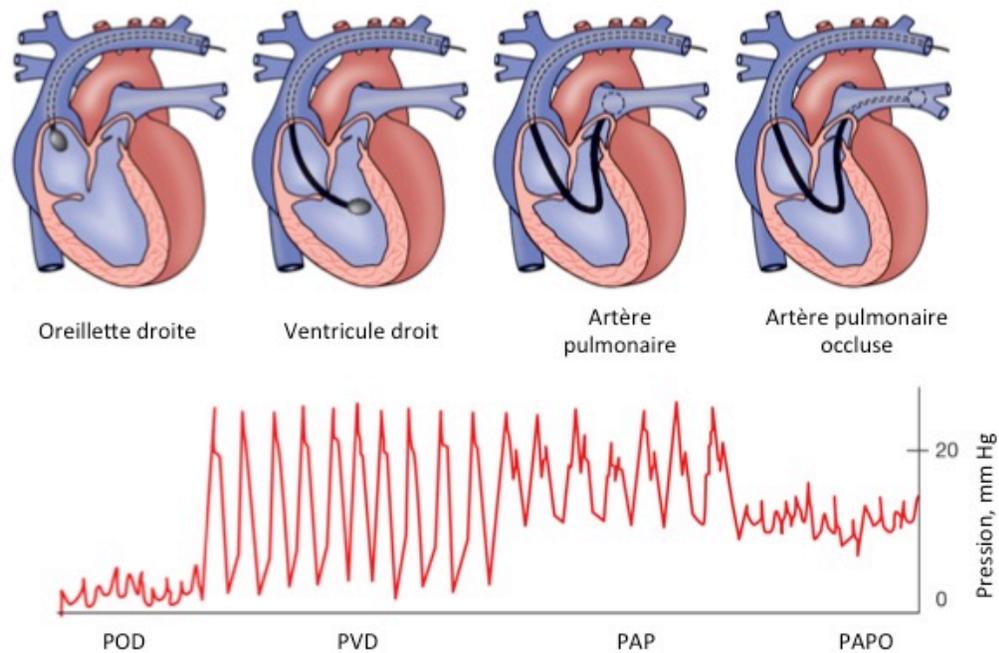


Figure 1.4 : Cathétérisme cardiaque droit – insertion de la sonde et tracé de pression correspondant. Adaptée de *Fishman's Pulmonary Diseases and Disorders, 5e; 2015*

Il est essentiel d'obtenir la mesure de la PAPm pour poser un diagnostic d'HTAP définitif. Tel que mentionné précédemment, l'HTAP est d'abord caractérisée par une PAPm supérieure ou égale à 20 mmHg. Par la suite, la mesure de la pression artérielle pulmonaire occluse (PAPO) permet d'estimer la pression au niveau de l'OG. Elle s'obtient par le gonflement d'un ballonnet situé à l'extrémité de la sonde, faisant ainsi obstruction au flux sanguin. Une PAPO inférieure à 15 mmHg permet d'exclure une HTP secondaire due à une maladie cardiaque gauche et de confirmer la présence d'une HTP précapillaire.¹⁹

Il est également nécessaire d'établir la mesure de la RVP pour diagnostiquer une HTAP. En effet, une RVP > 3 unités Wood constitue l'un des trois critères de la définition de l'HTAP suggérée par World Health Organisation (WHO).² Pour obtenir ce paramètre, il est nécessaire de mesurer le débit cardiaque (CO). Une fois ce paramètre connu, il est possible de mesurer la RVP selon la formule suivante²⁰ :

$$RVP = \frac{PAPm - PAPOm}{CO}$$

Cet outil diagnostique est également utilisé dans les modèles animaux (décrits à la section 4 de l'introduction). Il est important de noter que le modèle de cathéter utilisé chez nos animaux ne permet pas de mesurer le CO. On en fait plutôt une estimation en multipliant le volume de sang éjecté lors de la systole par le nombre de battements par minute.

2.2.2.3 Autres

Une fois le diagnostic d'HTP établi, les causes secondaires incluant l'insuffisance cardiaque gauche (HTP groupe 2), les maladies respiratoires chroniques (HTP groupe 3) et les maladies thromboemboliques chroniques (HTP groupe 4) devront être exclues avant de confirmer une HTAP véritable. Ainsi, l'investigation sera généralement complétée par des tests de fonction respiratoire, une recherche de maladie du sommeil en présence de symptômes compatibles et une imagerie thoracique à la recherche d'une maladie parenchymateuse ou embolique.

2.2.3 Évaluation fonctionnelle

2.2.3.1 Classe fonctionnelle

Les cliniciens peuvent utiliser le système de classification suggéré par la « New York Heart Association » afin d'établir la classe fonctionnelle d'HTAP. Celle-ci permet d'orienter la prise en charge du patient ainsi que la stratégie thérapeutique à utiliser.

Classe	Description
I	Le patient ne présente aucune limitation pour l'activité physique. Les efforts quotidiens ne causent pas de symptômes tels qu'une dyspnée, fatigue ou douleur thoracique.
II	Le patient présente une faible limitation lors de l'activité physique, lors de laquelle il peut y avoir dyspnée, fatigue, douleur thoracique et présyncope. Aucun inconfort n'est ressenti au repos.
III	Le patient ne ressent pas de symptômes au repos, mais il ressent une fatigue, douleur thoracique et difficulté à respirer lors d'un moindre effort.
IV	Le patient n'est pas capable d'effectuer aucune activité physique et la dyspnée et fatigue peuvent être présentes même

	au repos. Ces patients peuvent présenter des signes d'insuffisance cardiaque.
--	---

Tableau 1.2 : Classes fonctionnelles de l'hypertension pulmonaire. Adapté de *Barnett CF, Marco T. Pulmonary Hypertension. In: Crawford MH. eds. CURRENT Diagnosis & Treatment: Cardiology, 5e New York, NY: McGraw-Hill*

2.2.3.2 Test de marche

Le test de marche six minutes est grandement utilisé afin d'évaluer la capacité fonctionnelle des patients. Ce test est simple d'utilisation, généralement sécuritaire et non invasif, excepté l'inconfort pouvant être ressenti par le patient lors de l'activité physique. Il consiste à mesurer la distance parcourue à la marche sur une période de six minutes. Il est possible d'associer les résultats de ce test à la classe fonctionnelle de l'HTAP ; les classes 3 et 4 ont généralement des résultats significativement plus bas que les deux premières.²¹ Il a été démontré que les résultats obtenus lors du test corrélaient avec le CO, la résistance pulmonaire totale et la pression de l'OD.²² De plus, la distance parcourue lors de ce test est associée à la mortalité, donc peut servir d'outil afin d'établir un pronostic. Il est grandement utilisé pour effectuer un suivi chez les patients et valider la réponse aux traitements. Vu son caractère non invasif et sa simplicité d'utilisation, il sert beaucoup dans les études cliniques en tant que critère d'évaluation principal.²¹

2.3 Traitements actuels de l'HTAP

Malgré les avancées faites dans les dernières années, les traitements disponibles ne permettent toujours pas de guérir complètement la pathologie. Les stratégies thérapeutiques utilisées visent à améliorer la qualité de vie des patients en soulageant leurs symptômes et en leur permettant de maintenir au maximum leur qualité de vie. Actuellement, l'intervention thérapeutique chez les patients atteints d'HTAP est principalement établie en fonction du stade de la maladie et des facteurs pronostiques du patient. En plus des traitements dits non spécifiques (ex : diurétique, oxygène, anticoagulant) considérés comme des thérapies de support favorisant le bien-être du patient, une monothérapie sera généralement préconisée

dans les cas moins sévères. Dans les stades plus avancés, une intervention beaucoup plus agressive sera mise en place, incluant la combinaison de traitements pharmacologiques oraux spécifiques à l'HTAP ou même des thérapies parentérales.¹⁴ La stratégie thérapeutique actuelle vise à mener l'individu à une classe fonctionnelle inférieure (se référer au tableau 1.2). Il est intéressant de noter qu'il s'agit du seul groupe d'HTP pour lequel il existe des thérapies spécifiques. Les traitements ciblés pour l'HTAP actuellement disponible sur le marché ont pour but de favoriser la vasodilatation. Cependant, ils ne sont véritablement efficaces que pour une faible proportion des patients, laissant la transplantation pulmonaire comme étant l'unique issue possible dans les cas les plus sévères.²³

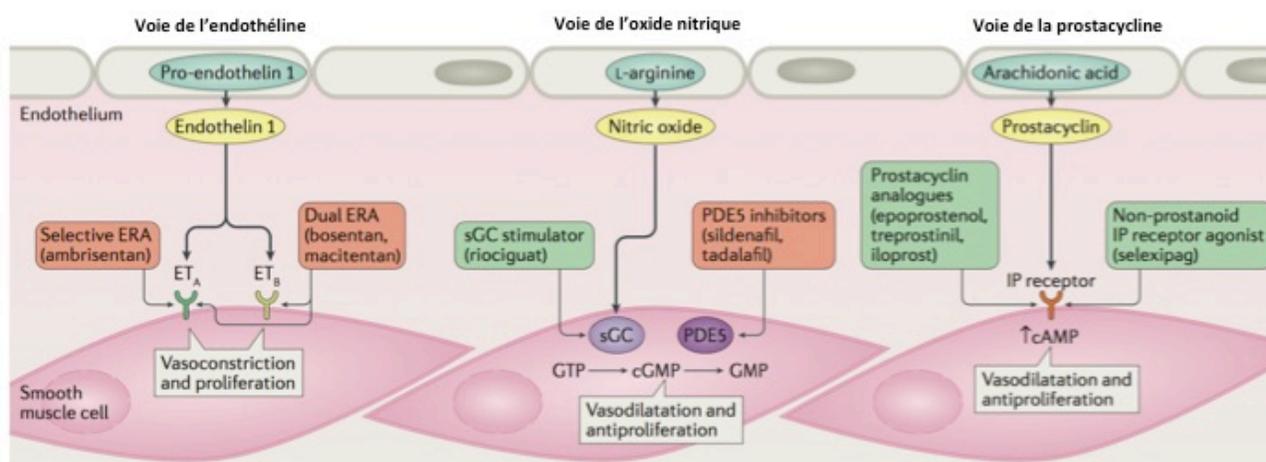


Figure 1.5 : Voies thérapeutiques ciblées dans l'hypertension artérielle pulmonaire. Adaptée de *Humbert et al Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension, 2017*

2.3.1 Inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5

Les phosphodiesterases sont des enzymes catalysant l'hydrolyse de liens phosphodiester. Onze classes ont été identifiées et chacune de ces enzymes se lie à des substrats différents. La phosphodiesterase de type 5 (PDE-5) se lie spécifiquement à la guanosine mono phosphate cyclique (cGMP) et la dégrade en GMP. Le cGMP est l'un des principaux médiateur favorisant la relaxation des cellules musculaires lisses suivant une stimulation par l'oxyde nitrique (NO) et/ou par les peptides natriurétiques (ANP et BNP).²⁴ L'administration de NO s'est révélée être une stratégie efficace dans le traitement de l'hypertension persistante

du nouveau-né et est actuellement approuvée pour ce groupe.^{25,26} Cependant, chez l'adulte, la difficulté d'administration et la potentielle toxicité suivant une exposition à long terme ont mené au développement de thérapies alternatives.²⁷ L'inhibition de la PDE-5 a été identifiée comme solution alternative au traitement par le NO. En inhibant la PDE-5, on empêche la dégradation du cGMP en GMP, ce qui résulte en une augmentation de sa concentration intracellulaire et favorise la relaxation des cellules musculaires lisses.²⁸ Deux de ces inhibiteurs sont actuellement approuvés et utilisés pour le traitement de l'HTAP, le Sildenafil (Viagra) et le Tadalafil (Cialis).²⁹

Ciblant cette même voie, il est intéressant de mentionner que le Riociguat fait partie des thérapies récemment approuvées pour le traitement de l'HTAP.⁹ Il cible également la voie de signalisation du NO et agit en tant que stimulateur des guanylates cyclases, une catégorie d'enzyme catalysant la formation de cGMP à partir de la guanosine triphosphate (GTP). L'objectif de ce traitement est d'augmenter la concentration intracellulaire de cGMP, et ce même en absence du NO.³⁰ Les études cliniques ont montré une importante amélioration lors du test de marche et une baisse de la RVP suivant l'administration de ce traitement.³¹

2.3.2 Analogues de la prostacycline

La prostacycline est produite principalement par les cellules endothéliales du système vasculaire. Une fois excrétée, elle exerce son action au niveau des cellules musculaires lisses vasculaires et des plaquettes.³² En se liant à son récepteur, elle augmente la concentration intracellulaire en cAMP, ce qui entraîne l'activation de la protéine kinase A et une réduction de la concentration intracellulaire en calcium, favorisant ainsi la relaxation des cellules musculaires lisses.³³ En plus de son effet vasodilatateur, la prostacycline est également un anti thrombotique puisqu'elle empêche l'agrégation des plaquettes sanguines. Il a été démontré que la production de prostacycline est diminuée en HTAP.³⁴ Les stratégies thérapeutiques utilisant des analogues à la prostacycline visent à augmenter leur concentration intracellulaire. Il existe actuellement deux analogues approuvés pour le traitement de l'HTAP au Canada, soit l'Epoprostenol et le treprostinil.³⁵

Le selexipag, un agoniste des récepteurs à la prostacycline, a été récemment approuvé comme thérapie ciblée pour l'HTAP au Canada suite à la publication des résultats de l'étude clinique GRIPHON, menée sur 1156 patients.³⁶ Le traitement au selexipag diminue significativement le risque de morbidité et de complications associées à l'HTAP.

2.3.3 Antagonistes des récepteurs à l'endothéline

Contrairement aux précédentes classes de traitements présentées qui avaient pour but de favoriser la vasodilatation, les antagonistes des récepteurs à l'endothéline servent plutôt à limiter l'effet vasoconstricteur de ce peptide. Il existe trois isoformes différentes des endothélines : l'endothéline-1, 2 et 3. L'endothéline-1 (ET-1), la forme la plus fréquente, est sécrétée en grande majorité par les cellules endothéliales du système cardiovasculaire.³⁷ Sa concentration est plus élevée dans les poumons que dans tout autre organe. Giaid et collaborateurs ont montré une surexpression de ET-1 dans les poumons de patients atteints d'HTAP comparativement aux individus sains, laissant suggérer qu'un déséquilibre de son expression contribue à la vasoconstriction observée dans la maladie.³⁸ Deux types de récepteurs à l'ET-1 ont été identifiés, ET_A et ET_B. Au niveau des vaisseaux pulmonaires, ET_A est exclusivement exprimé dans les cellules musculaires lisses tandis que ET_B se retrouve autant dans les cellules musculaires lisses que dans les cellules endothéliales.³⁹ Bien que ces deux récepteurs aient pour ligand l'ET-1, les études suggèrent que leur mécanisme de réponse suivant la liaison du ligand diffère. Lorsque ET-1 se lie aux récepteurs de type ET_A, il favorise la vasoconstriction des cellules musculaires lisses en permettant ultimement d'augmenter la concentration de calcium intracellulaire.³⁹ Cependant, il a été montré que la liaison de ET-1 sur les récepteurs de type ET_B des cellules endothéliales favorise la production de NO, ce qui engendre un stimulus plutôt vasodilatateur.⁴⁰ Cela suggère qu'une balance est essentielle au maintien du tonus vasculaire.

Plusieurs pistes ont été explorées lors du développement d'inhibiteurs des récepteurs à l'endothéline, où une attention particulière a été portée quant à la spécificité du récepteur ciblé par les antagonistes. Le Bosentan fut le premier de cette classe à être utilisé en clinique pour traiter l'HTAP. Il cible autant les récepteurs de type ET_A et ET_B, et est encore largement

utilisé à ce jour.⁴¹ Le Macitentan est également un inhibiteur ciblant les récepteurs ET_A et ET_B ayant été approuvé dans les dernières années.⁴² Contrairement au Bosentan, la dose nécessaire pour atteindre les mêmes effets est plus faible et peu d'effets hépatotoxiques ont été observés suite à l'administration de ce médicament, qui permet en plus d'améliorer la qualité de vie des patients.^{43,44} L'Ambrisentan est quant à lui un inhibiteur spécifique des ET_A. En théorie, son utilisation permettrait de conserver les effets bénéfiques de la production de NO par les cellules endothéliales. Cependant, aucun avantage particulier n'aurait été observé à utiliser des inhibiteurs spécifiques ou non aux récepteurs à l'endothéline.³⁷ La présence de ces deux types d'antagonistes sur le marché suggère que les deux stratégies offrent des effets bénéfiques.

2.3.4 Inhibiteurs des canaux calciques

Les inhibiteurs des canaux calciques sont moins utilisés puisque seulement une faible proportion des patients (environ 5%) y répondent de façon chronique.⁴⁵ Ces patients sont généralement identifiés lors du cathétérisme cardiaque menant au diagnostic. Selon les plus récentes lignes directrices, tous les patients pour lesquels une HTAP est confirmée devraient se soumettre à un test de vasoréactivité pulmonaire aigu au moment du cathétérisme cardiaque droit afin de confirmer la réponse au traitement.⁴⁶ L'identification des patients répondeurs est nécessaire puisque ce traitement peut engendrer une détérioration de l'état du patient s'il est utilisé chez un individu pour qui l'utilisation n'en est pas recommandée.

3. Physiopathologie cellulaire et moléculaire de l'HTAP

Les dérégulations au niveau des cellules des parois vasculaires représentent une composante importante de la pathologie. Il est de plus en plus accepté dans la communauté que la progression de la pathologie se fait en deux phases. Une combinaison de différents facteurs de stress environnementaux et d'altérations génétiques provoquerait dans un premier temps une lésion au niveau de l'endothélium, induisant l'apoptose d'un certain nombre de cellules endothéliales (CE).⁴⁷ Un changement de perméabilité au niveau de la barrière endothéliale favorise l'infiltration de médiateurs inflammatoires et de facteurs de croissance, affectant les autres couches de la paroi artérielle comme la média et l'adventice. Dans la seconde phase de la pathologie, les CE résidentes, les PASMCs et les fibroblastes pulmonaires acquièrent différents mécanismes adaptatifs favorisant leur survie et leur prolifération, menant au remodelage progressif et à l'oblitération des artères pulmonaires distales (se référer à la revue de littérature présentée dans l'annexe I).

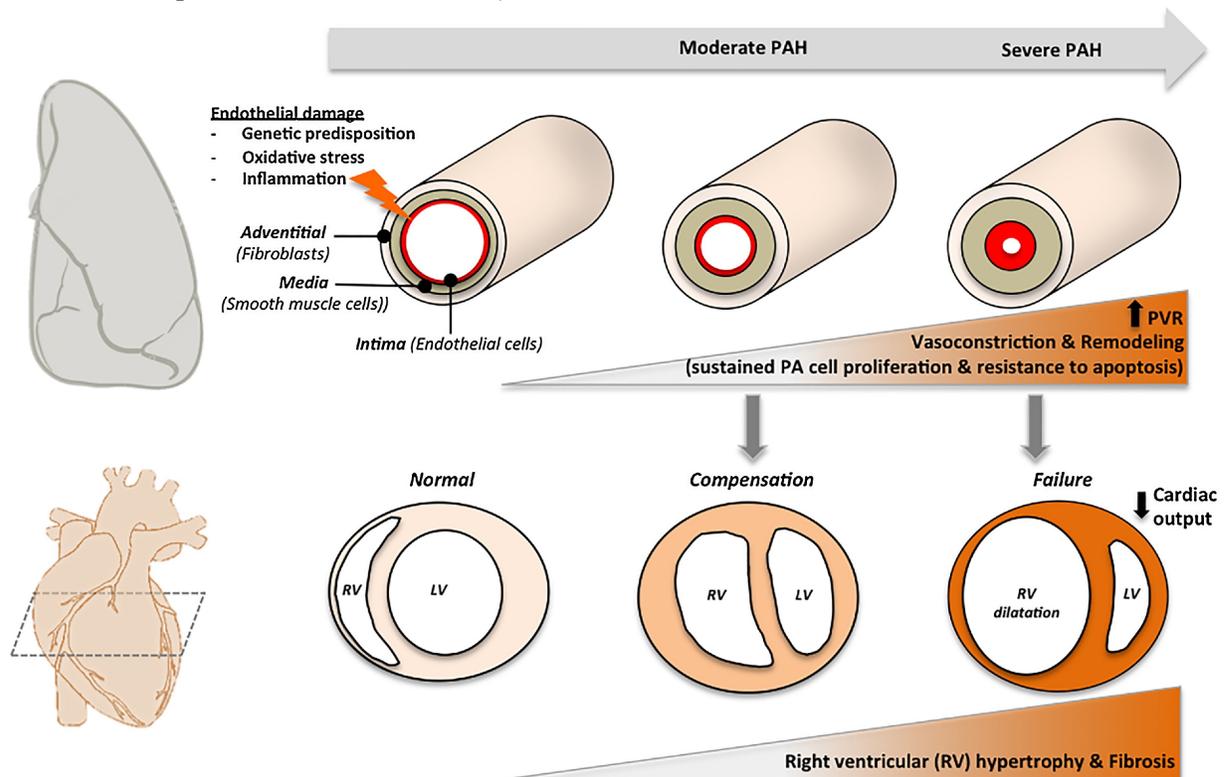


Figure 1.6 : Représentation schématique de la progression pathologique de l'HTAP. Tirée de *Bourgeois et al. Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets, Int. J. Biochem. Cell Biol, 2018*

Dans les sections suivantes, je présenterai brièvement les principales dérégulations impliquées dans le développement de la pathologie associées au remodelage vasculaire. L'emphase sera mise sur l'acquisition du phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des PASMCs puisque mon étude présentée au chapitre 2 se concentre spécifiquement sur ce type cellulaire. Bien entendu, les désordres présentés ne représentent pas une liste exhaustive et il faut garder en tête que les relations entre les processus sont beaucoup plus complexes en réalité. Il ne faut pas non plus négliger le fait que l'environnement vasculaire est dynamique et qu'une communication constante se produit entre les différentes cellules et l'environnement extracellulaire.

3.1 Susceptibilité génétique

Les mutations du gène *BMPR2* (bone morphogenetic protein receptor type II, membre de la superfamille des TGF- β) sont parmi les plus fréquemment retrouvées en HTAP. Elles sont présentes dans environ 75 % des cas d'HTAP héréditaires et retrouvées de façon sporadique dans environ 25% des cas d'HTAP idiopathique.⁴⁸ À ce jour, plus de 300 mutations différentes ont été identifiées dans ce gène.⁴⁹ Elles sont de type autosomale dominante, mais avec une pénétrance qui est plutôt faible (environ 20 %).⁵⁰ Il n'en demeure pas moins qu'il s'agit du facteur de risque le plus important pour le développement de l'HTAP. Il a été montré que les porteurs de mutations sont plus jeunes au moment du diagnostic et présentent des données hémodynamiques plus sévères, en plus de présenter un risque de mortalité plus élevé.⁵¹ Les mutations répertoriées résultent toutes en une altération ou une perte de fonction de la protéine. Les études ont permis de démontrer qu'environ 20% des animaux portant la mutations développement une HTAP, un ratio similaire à la pénétrance de la mutation observée chez l'humains.⁵² De façon intéressante, le rats hétérozygotes développent une HTAP plus sévère comparativement aux animaux WT suivant une exposition à différents facteurs de stress comme l'hypoxie et l'inflammation, suggérant que la perte de *BMPR2* serait un facteur de risque favorisant le développement de la pathologie.^{52,53} D'un point de vue moléculaire, les études montrent que les mutations *BMPR2* sensibilisent les CE à l'apoptose, ce qui pourrait expliquer pourquoi les porteurs de mutations sont plus susceptibles à développer la maladie.⁵⁴ Il a aussi été montré que la perte de *BMPR2* est

associée à divers processus impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. Une diminution de l'expression de BMPR2 est associée à une augmentation de la transition endothéliale à mésenchymateuse (processus décrit à la section 3.2.2) et une augmentation dans la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires.^{54,55} De façon intéressante, d'autres mutations liées aux voies de signalisation de la superfamille des TGF- β ont été identifiées en HTAP, notamment dans les gènes ALK1 (Activin A receptor type II-like kinase 1, récepteur TGF- β), ENG (endoglin), SMAD4 et SMAD9 (agissant en tant que transducteur du signal), ce qui supporte l'hypothèse qu'une altération des voies de signalisation TGF- β sont d'une importance cruciale dans le développement de la pathologie.^{56,57}

D'autres mutations ont également été identifiées en HTAP mais ont été nettement moins étudiées que celles du gène BMPR2. Des mutations dans le gène KCNK3, codant pour un canal potassium K⁺, ont été identifiées chez un certain pourcentage d'individus atteints d'HTAP familiale et idiopathique. Il a été montré qu'une inhibition chronique de KCNK3 utilisant un bloqueur sélectif du canal chez le rat induit une prolifération exagérée des CE et également des PSMCs, suggérant que la perte de fonction de ce canal ionique favorise le remodelage vasculaire.⁵⁸

3.2 Cellules endothéliales

Tel que mentionné précédemment, le consensus actuel suggère que la pathologie est initiée par une apoptose précoce des CE induite par des facteurs de stress environnementaux, pouvant être combinés ou non à une susceptibilité génétique. Suite à l'apoptose initiale des CE, il y aurait une sélection des CE résistantes à l'apoptose. Les cellules résidentes des artères vont par la suite développer des mécanismes adaptatifs leur permettant d'assurer leur survie et leur prolifération, contribuant ainsi à l'obstruction de la lumière.⁵⁹ Bien que dans ce mémoire l'accent est mis sur les PSMCs, il est important de comprendre que la dysfonction endothéliale contribue également de façon importante au remodelage vasculaire. On observe en HTAP un déséquilibre dans la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs et une diminution de production de vasodilatateurs. On observe une diminution du NO, un acteur majeur impliqué dans la vasodilatation.⁶⁰ De plus, l'ET-1 est un puissant vasoconstricteur produit

entre autres par les CE et est exprimé de façon importante en HTAP comparativement aux contrôles, favorisant la constriction des artères pulmonaires.³⁹ Tel que mentionné précédemment, la grande majorité des thérapies actuellement utilisées en HTAP vont cibler ce déséquilibre afin de favoriser la vasodilatation (voir section 2.3). Les lésions dans l'endothélium causées par l'apoptose initiale des CE exposent également les autres cellules de la média et l'adventice (PASMCs et fibroblastes) aux facteurs circulants, ce qui favorise leur activation et les déséquilibres phénotypiques observés. D'autres altérations liées à la dysfonction endothéliale sont observées dans la pathologie et seront décrites subséquemment. De façon intéressante, bien que les thérapies actuellement en développement visent majoritairement à induire la mort cellulaire et diminuer la prolifération des cellules, il a été montré que d'empêcher l'apoptose et favoriser la survie des CE dans les stades précoces limite grandement le développement de l'HTAP.^{61,62} Ainsi, il serait intéressant de considérer cette relation spatio-temporelle dans le développement d'éventuelles thérapies pour l'HTAP puisque la réponse à certains traitements pourrait différer selon le stade de la pathologie.

3.2.1 Lésions plexiformes

La présence de lésions plexiformes représente une caractéristique commune aux différents types d'HTAP et est souvent associée à un mauvais pronostic. Elles se présentent sous forme de structures vasculaires d'apparence gloméruloïde prenant leur origine à partir de petites artérioles sanguines (d'un diamètre de 50 à 300 μ M).⁶³ Ces lésions sont caractérisées par une prolifération désordonnée des CE, qui auraient acquis un avantage de croissance par rapport aux cellules « normales ». ⁶⁴ Les lésions plexiformes sont hétérogènes. On y retrouve des CE, des cellules mésenchymateuses exprimant ou non l'alpha smooth muscle actin (α SMA) un marqueur typique aux cellules musculaires lisses, des myofibroblastes et des cellules inflammatoires.^{65,66} Il est reconnu que les lésions plexiformes évoluent dans le temps et peuvent devenir fibrotiques, avec une accumulation importante de matrice extracellulaire.⁶⁷ Bien que leur présence soit caractéristique de l'HTAP, on ne comprend toujours pas aujourd'hui quel est l'impact de ces lésions au niveau hémodynamique et sur la progression de la maladie.

3.2.2 Transition endothéliale – mésenchymateuse

Le remodelage des artères pulmonaires est associé à une hyper prolifération des CE et des PASMCs. Plus récemment, la transition « endothéliale à mésenchymateuse » (endoMT) a été identifiée comme processus pouvant également contribuer à l'épaississement de la paroi vasculaire.⁶⁸ Lors de ce processus, les CE changent progressivement de phénotype, perdant des marques typiques des CE (tels que VE-cadhérine, PECAM-1), adoptent l'apparence morphologique et expriment des marqueurs caractéristiques de cellules mésenchymateuses tels que (α SMA).⁶⁹ Lorsque les interactions cellules-cellules sont rompues, les CE en transition phénotypique peuvent acquérir la capacité de migrer vers l'intérieur de la paroi vasculaire. Dans le contexte de l'HTAP, une certaine proportion de cellules mésenchymateuses présente dans la néointima des patients de même que dans différents modèles précliniques sont d'origine endothéliale.⁷⁰ Les études ont associé l'endoMT à une altération de la voie de signalisation BMPR2, gène fréquemment muté en HTAP.^{55,70} Rétablir la signalisation de cette voie améliore l'HTAP, mais l'impact direct sur l'endoMT reste à démontrer.⁷¹

3.3 Inflammation et immunité

La prévalence élevée de l'HTAP dans les cas de pathologies auto-immunes et infectieuses comme les maladies des tissus conjonctifs (ex: sclérodémie systémique) et le VIH a été une première indication qu'une composante inflammatoire et immunitaire pouvait avoir un rôle à jouer dans la pathologie.⁷² Dans les dernières années, les recherches ont démontré l'importance de ces réponses dans la pathologie. Plusieurs types de cellules immunitaires (macrophages, monocytes, lymphocytes T, lymphocytes B, cellules dendritiques) sont retrouvées au sein des lésions vasculaires de même qu'en périphérie des vaisseaux sanguins remodelés.⁷³⁻⁷⁵ De plus, on a retrouvé des auto-anticorps dirigés contre les cellules endothéliales dans le sang de patients HTAP, suggérant un rôle de l'auto-immunité.⁷⁶ Cependant, son implication exacte dans l'étiologie de l'HTAP demeure inconnue à ce jour. On retrouve un niveau élevé de plusieurs cytokines inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF α , de même que les interleukines IL-2, IL-4, IL-8, IL-10) dans le sérum des patients HTAP.⁷⁷

L'étude menée par Soon et collaborateurs a mis en évidence une corrélation entre la quantité de cytokines circulantes retrouvées dans le sang et la survie de patients atteints d'HTAP.⁷⁷ Certaines cytokines inflammatoires telles que le TNF α et l'IL-1 β contribuent à la dysfonction endothéliale en induisant l'endoMT *in vitro*, suggérant un rôle de l'inflammation dans la progression du remodelage vasculaire.^{78,79} La surexpression de IL-6 dans un modèle de souris transgénique entraîne une musculation des APDs et sensibilise les souris au développement de l'HTAP suivant une mise en hypoxie.⁸⁰ *In vitro*, cette cytokine induit la prolifération des PSMCs. L'utilisation d'antagonistes des récepteurs à l'IL-6 prévient et améliore l'HTAP dans deux modèles précliniques (MCT et Su/Hx, qui seront décrits à la section 4 de l'introduction).⁸¹

Beaucoup d'efforts ont été mis dans les dernières années afin de développer de nouvelles thérapies ciblées pour l'HTAP. Considérant l'importance de la réponse inflammatoire dans la pathologie, plusieurs équipes ont tenté de la cibler comme nouvelle thérapie. Plusieurs études précliniques ont démontré que cibler la voie IL-6 semble être une stratégie prometteuse (revue par Pullamsetti et al).⁸² Cette voie a également fait l'objet d'une étude clinique de phase 2 avec le Tocilizumab (NCT02676947), un anticorps dirigé contre récepteur IL-6.⁸³ Une étude clinique de phase 2 est également en cours avec le Rituximab, un anticorps anti-CD20 (antigène présent sur les lymphocytes B), pour le traitement de l'HTAP associée à la sclérodermie (NCT01086540). À ce jour, aucune thérapie ciblant directement la réponse inflammatoire n'est cependant acceptée pour une utilisation chez les patients, mais les avancées concernant cette stratégie thérapeutique seront à surveiller dans les prochaines années.

3.4 Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des médiateurs circulants et grand nombre d'entre eux ont été impliqués dans l'étiologie de l'HTAP. Ceux-ci affectent plusieurs types cellulaires. Suivant la rupture de l'endothélium dans les phases initiales de la pathologie, l'exposition des PSMCs à ces facteurs de croissance favorisent leur prolifération, leur migration et leur survie, ce qui contribue grandement au remodelage vasculaire. Ils ont fait l'objet de

nombreuses études et plusieurs se sont intéressés à ceux-ci en tant que cible thérapeutique potentielle. Certains parmi les plus étudiés seront décrits ci-dessous.

3.4.1 Facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF)

Le PDGF est un facteur de croissance jouant un rôle important dans la prolifération des PSMCs en HTAP. Différents isoformes du PDGF de même que ses récepteurs sont surexprimés dans les APDs et les poumons de patients HTAP comparativement aux individus contrôles.⁸⁴ Le PDGF stimule la prolifération des PSMCs en activant la voie STAT3, en plus de favoriser l'effet Warburg via l'activation de HIF-1 α par la voie PI3K/AKT/mTOR (décrits plus en détails subséquentement).^{85,86} L'inhibition de la voie du PDGF avec l'imatinib, un antagoniste du récepteur au PDGF, améliore les données hémodynamiques et diminue le remodelage vasculaire dans deux modèles précliniques.⁸⁷ L'imatinib a été le premier inhibiteur à être utilisé dans l'objectif de cibler le remodelage vasculaire, considérant que ces effets sont principalement anti-prolifératifs et pro-apoptotiques. Ghofrani et collaborateurs ont été les premiers à rapporter une amélioration significative des données hémodynamiques, de la distance de marche et de la classe fonctionnelle chez un patient suivant l'utilisation de l'imatinib combiné à la trithérapie actuelle.⁸⁸ Cette drogue a ensuite fait l'objet d'études cliniques de phase 2 et 3. Son utilisation entraîne une importante amélioration du CO, de la RVP et de la capacité d'exercice chez une grande majorité des patients.^{89,90} Cependant, les effets secondaires néfastes observés chez une certaine proportion des patients ont limité la poursuite des études.⁹¹

3.4.2 Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)

Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) est trouvé en quantité élevée dans le plasma des patients HTAP de même que dans les lésions plexiformes.⁹² Il joue un rôle important dans le tonus vasculaire puisqu'il favorise la synthèse de NO et de prostacycline, deux médiateurs impliqués dans la vasodilatation.⁹³ La production de VEGF est stimulée par l'activation de HIF-1 α et plusieurs autres facteurs de croissance tels que le PDGF et le TGF- β . Le VEGF serait un modulateur important dans l'hypertension induite par l'hypoxie et il

aurait un rôle protecteur sur les cellules endothéliales. L'inhibition de cette voie de signalisation dans les modèles animaux entraîne une HTAP sévère tel qu'il sera décrit à la section 4.2.

3.4.3 Superfamille des TGF- β (transforming growth factor beta)

Cette super famille comprend plus d'une trentaine de facteurs circulants dont certains facteurs de croissance et différenciation, de même que les « bone morphogenetic proteins » (BMP).⁹⁴ Les membres de cette super famille sont des ligands qui s'associent à des récepteurs transmembranaires de type sérine/thréonine kinase. La cascade de signalisation est ensuite transmise via l'action de protéines SMAD qui vont permettre la régulation de l'expression de gènes spécifiques. Les BMPs font partie des facteurs les plus étudiés dans la pathologie en raison des mutations fréquentes du gène BMPR2. De plus, même si aucune mutation du gène BMPR2 n'est identifiée, certains individus peuvent tout de même présenter une altération dans cette voie de signalisation, faisant d'elle un centre d'intérêt majeur dans les études sur la pathologie. Le ligand TGF- β a aussi fait l'objet de plusieurs études. Il est augmenté dans la média et l'intima d'artères remodelées, en plus d'être retrouvé en grande quantité dans les lésions plexiformes.⁹⁵ Il agirait en tant qu'inhibiteur de la voie BMP, en plus de favoriser divers processus cellulaires tels que la prolifération cellulaire, l'inflammation et la fibrose pulmonaire chez les patients HTAP.⁹⁵

3.6 Altérations métaboliques (effet Warburg) et mitochondries

En 1956, Otto Warburg a démontré que les cellules cancéreuses présentent un métabolisme altéré.⁹⁶ Elles utilisent de façon accrue la glycolyse anaérobie aux dépens de la phosphorylation oxydative, et ce même si le taux d'oxygène est suffisant pour soutenir normalement le processus de respiration cellulaire. Cette dérégulation est depuis connue sous le nom d'effet Warburg. De façon similaire aux cellules cancéreuses, ce même changement métabolique est observée dans les PSMCs et les CE HTAP.^{97,98}

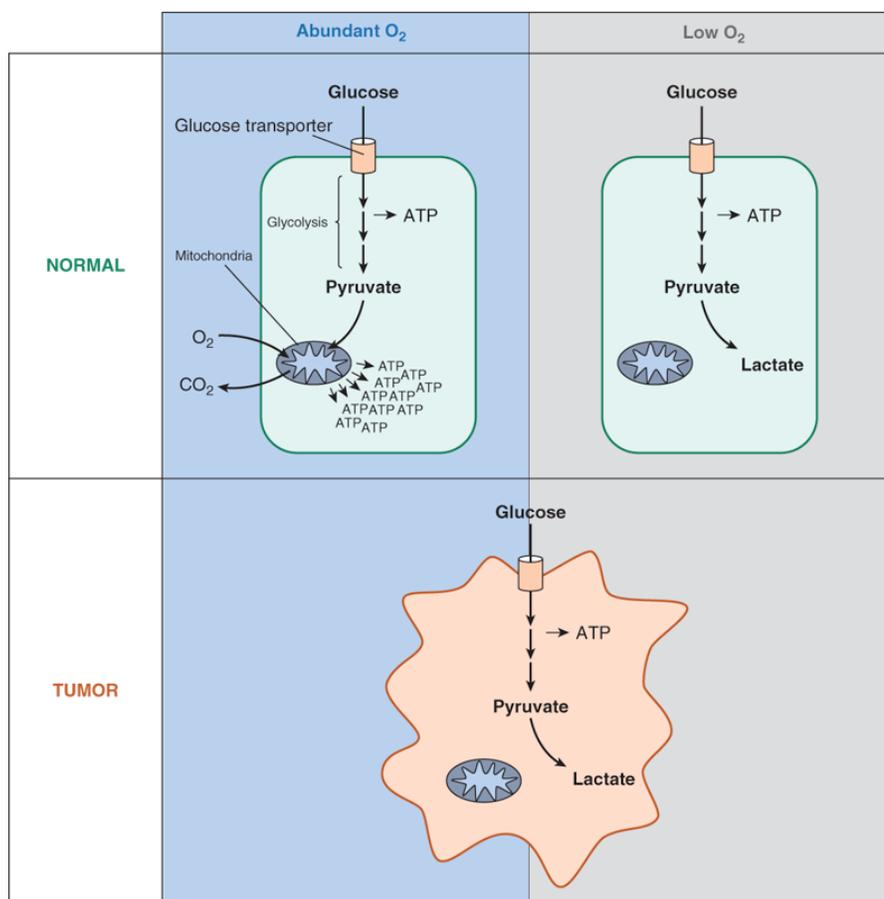


Figure 1.7 : Schéma représentatif de l'effet Warburg. Adaptée de *Neoplasia, Hammer GD, McPhee SJ. Pathophysiology of Disease: An Introduction to Clinical Medicine, 8e; 2019*

À la fin du processus de la glycolyse, le glucose est transformé en pyruvate puis est ensuite converti en acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase (PDH), pour ensuite être complètement dégradé dans le cycle de Krebs. Lors du cycle de Krebs, il y aura production de NADH, qui sert de source d'électrons pour la phosphorylation oxydative ayant lieu dans la mitochondrie.⁹⁹ Après la complétion du processus de la phosphorylation oxydative, 36 mol d'adénosine triphosphate (ATP) sont produites. Il s'agit du principal processus de production d'ATP pour les organismes aérobie (c'est à dire lorsqu'il y a présence d'O₂). Contrairement à cela, la glycolyse anaérobie (absence d'O₂) est beaucoup moins efficace pour produire de l'énergie, puisque seulement 2 mol d'ATP sont produites pour 1 mol de glucose. Cependant, elle procure d'autres avantages aux cellules, notamment en favorisant la production de biomasse nécessaire à la prolifération cellulaire.¹⁰⁰

En HTAP, l'effet Warburg a grandement été associé à l'activation normoxique de HIF-1 α . Son activation contribue à l'altération métabolique des PASMCs en augmentant entre autres l'expression des transporteurs de glucose GLUT1 et GLUT3, ce qui favorise l'incorporation du glucose dans la cellule. L'expression normoxique de HIF-1 α favorise également la surexpression de plusieurs autres enzymes impliquées dans la glycolyse comme l'hexokinase 2 (HK-II), la pyruvate kinase de type M2 (PKM2) et LDHA (lactate déshydrogénase A).^{101,102} De plus, HIF-1 α régule l'expression de PDK (pyruvate déshydrogénase kinase), qui peut phosphoryler la PDH et en retour inhiber son activité, favorisant ainsi la conversion du pyruvate en lactate plutôt qu'en acétyl-CoA. Le métabolisme cellulaire a fait l'objet de cible thérapeutique avec le dichloroacetate (DCA), qui favorise la phosphorylation oxydative en bloquant l'activité de la PDK. Le DCA améliore les mesures hémodynamiques et la survie dans le modèle MCT. L'inhibition de la PDK est associée à une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose dépendante des mitochondries, dû à une dépolarisation des membranes mitochondriales.¹⁰³ Les traitements avec le DCA ont également fait l'objet d'une étude clinique de phase 1 (NCT01083524) pour évaluer son effet chez les patients atteints d'HTAP idiopathique. Cette étude a révélé que le DCA améliore la PAPm, la résistance vasculaire pulmonaire et le test de marche chez certains individus.¹⁰⁴ De façon intéressante, cette étude montre qu'une absence de réponse au traitement était associée à la présence de polymorphismes (SNP – single nucleotide polymorphism) dans les gènes SIRT3 et UCP2. Il s'agit d'une première évidence ouvrant la porte à l'instauration d'un traitement par médecine de précision, où les individus pourraient subir un dépistage préalable au traitement afin d'évaluer leur réponse potentielle.

L'effet Warburg est souvent associé à une dérégulation mitochondriale. Les PASMCs HTAP des patients et de plusieurs modèles animaux sont déficientes pour le complexe 1 de la chaîne de transport d'électron, ce qui favorise la glycolyse aérobie.^{105,106} Les cellules présentent également des mitochondries hyper polarisées en raison d'une accumulation d'ions H⁺ dans le cytoplasme.¹⁰⁷ Cette hyperpolarisation de la membrane mitochondriale empêche le relâchement de facteurs pro apoptotiques et limite ainsi l'apoptose dépendante des

mitochondries.¹⁰⁸ Les études suggèrent qu'une dérégulation mitochondriale agirait en tant qu'événement précoce dans le développement de la maladie.¹⁰⁵

L'oxydation des acides gras (FAO), processus au cours duquel il y a production d'acétyl-CoA, favorise un changement métabolique vers la glycolyse en inhibant l'oxydation du glucose.¹⁰⁹ L'étude menée par Sutendra et collaborateurs a démontré que bloquer l'enzyme malnoyl-CoA décarboxylase (MCD), responsable de la décarboxylation du malnoyl-CoA et de la production d'acétyl-CoA dans les PSMCs, empêche la FAO et augmente l'oxydation du glucose, diminuant ainsi l'hyperpolarisation des membranes mitochondriales et favorisant l'apoptose dépendante des mitochondries.¹¹⁰ De plus, les modèles de souris KO pour la MCD sont résistantes au développement de l'HTAP induite par une hypoxie chronique. Ces études précliniques ont mené à l'initiation d'études cliniques testant actuellement deux inhibiteurs de FAO comme thérapie pour l'HTAP, le ranolazine (NTC02829034) et le trimetazidine (NTC03273387). Ceux-ci sont principalement exploités dans l'optique d'améliorer la dysfonction du VD en HTAP.¹¹¹

3.7 Facteurs de transcription, oncogènes et voies de signalisation

Au même titre que les cellules cancéreuses, plusieurs oncogènes et facteurs de transcription ont été identifiés comme étant impliqués en HTAP. Leur expression contribue au phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs.

3.7.1 Facteur de transcription STAT3

STAT3 est un facteur de transcription impliqué dans la régulation de plusieurs processus biologiques tels que la prolifération cellulaire, la réponse inflammatoire, la résistance à l'apoptose, etc.¹¹² Il est activé suite à sa phosphorylation par les protéines JAK (Janus kinase), induites par différents facteurs dont l'IL-6 et le PDGF.¹¹³ Paulin et collaborateurs ont démontré une activation constitutive de STAT3 en HTAP, ce qui favorise l'expression de gènes tels que NFAT (nuclear factor of activated T cell) et BCL-2 (B-cell lymphoma 2), impliqués dans la survie et la résistance à l'apoptose des PSMCs.¹¹⁴ Considérant son large

spectre de régulation, on y réfère souvent comme un nœud de signalisation crucial en HTAP.¹¹⁵ L'inhibition de STAT3 par le déhydroépiandrostérone (DHEA, une hormone naturellement produite par le corps connue pour inhiber l'activation de STAT3) améliore l'hypertension *in vivo* et fait actuellement l'objet d'une étude clinique de phase 2 (NCT03648385).¹¹⁶

3.7.2 Facteur de transcription NFAT

Comme il a été vu précédemment, NFAT est un facteur de transcription pouvant être activé par STAT3. L'activation de ce facteur est également dépendante de la concentration intracellulaire en ions calcium (Ca^{2+}), qui est augmentée en HTAP.¹¹⁷ Le Ca^{2+} active la calcineurine qui va déphosphoryler NFAT et favoriser sa translocation nucléaire. L'inhibition de son activation par le VIVIT renverse l'HTAP expérimentale.¹¹⁷ Le FK506 (Tacrolimus), un inhibiteur de la calcineurine, a fait l'objet d'une étude clinique pour le traitement de l'HTAP (NCT01647945). Les résultats ont démontré que le médicament est bien toléré chez les patients et permet d'améliorer la distance au test de marche 6 minutes de même qu'une amélioration des paramètres d'échocardiographie, sans pour autant être significatifs.¹¹⁸ Le manque de puissance statistique pourrait être dû à une cohorte plutôt petite, mais les résultats sont encourageants et les investigations se poursuivent.

3.7.3 Facteur de transcription HIF

Les facteurs inductibles à l'hypoxie HIFs (hypoxia inducible factors) sont des facteurs de transcription constitués de deux sous-unités, α et β . Trois sous-unités alpha ont été identifiées : HIF-1 α , HIF-2 α et HIF-3 α . Ces sous-unités α sont instables en condition de normoxie puisqu'elles sont hydroxylées par les prolyses hydroxylases (PHD) et sont ainsi ciblées pour dégradation par le protéasome.¹¹⁹ En hypoxie, les PHD sont inactives ; les sous-unités α deviennent donc stables et sont transloquées au noyau afin de se dimériser avec la sous unité β et former un complexe transcriptionnellement actif. Les études ayant mené à la découverte des mécanismes moléculaires responsables de l'adaptation cellulaire aux variations des niveaux d'oxygènes ont été récompensées du prix Nobel de médecine en 2019.

HIF-1 α est la sous-unité la mieux caractérisée et de loin la plus étudiée dans la pathologie. À ce jour, les études sur son rôle exact demeurent contradictoires. Cependant, la plupart des études menées *in vitro* et dans les modèles animaux tendent à suggérer un rôle pathologique de l'activation normoxique de HIF et de sa surexpression. L'expression de HIF-1 α est augmentée dans les CE, les PSMCs et les poumons de patients HTAP. HIF-1 α régule l'expression de nombreux gènes impliqués dans l'altération métabolique, l'inflammation, la survie cellulaire et la prolifération des PSMCs.^{105,120,121} Une étude a cependant rapporté des résultats contradictoires en montrant une sous expression de HIF-1 α dans les PSMCs et que cette sous expression favoriserait la constriction des cellules.¹²² Plusieurs facteurs de croissance tels que le PDGF et l'EGF (facteur de croissance endothélial), des cytokines inflammatoires et l'ET-1 favorisent l'activation de HIF-1 α en induisant sa transcription via la voie de signalisation PI3K/AKT.^{123,124} Les souris hétérozygotes pour HIF-1 α présentent moins de vaisseaux muscularisés et un remodelage moins important suivant la mise en hypoxie.¹²⁵ La délétion de HIF-1 α spécifique aux cellules musculaires lisses prévient également le remodelage vasculaire induit par l'hypoxie chronique.¹²⁶ HIF-1 α stimule l'effet Warburg en régulant l'activation de plusieurs gènes impliqués dans la glycolyse comme la PDK, GLUT1, HK-II et LDHA (voir section 3.6).⁸⁶ Au vue de ces études, cibler HIF-1 α semble être une stratégie thérapeutique prometteuse. La digoxine est une drogue souvent utilisée pour traiter les défaillances cardiaques. De plus, elle inhibe l'activité transcriptionnelle de HIF-1. Abud et collaborateurs ont démontré que cette drogue peut prévenir et renverser le remodelage vasculaire et l'hypertrophie du VD dans modèle de souris exposées à l'hypoxie chronique.¹²⁷

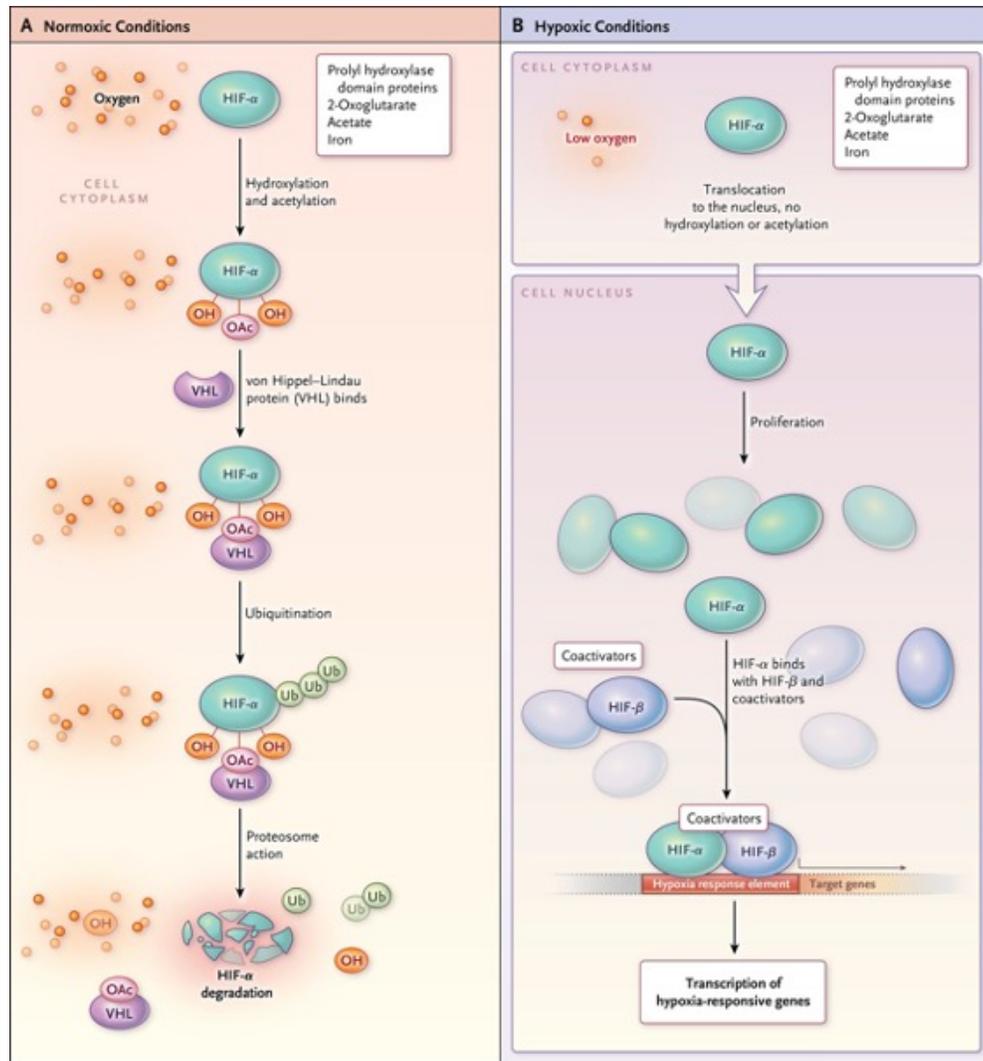


Figure 1.8 : Représentation schématique de la voie de signalisation HIF-1 et sa régulation en normoxie vs hypoxie. Figure adaptée de West JB, *NEJM* 2017

Bien que moins étudiée que HIF-1 α , la sous-unité HIF-2 α a également été impliquée dans la pathologie. La suppression partielle de HIF-2 α de façon systémique réduit le développement de l'hypertension dans modèle de souris exposée à l'hypoxie chronique.¹²⁸ Cette même étude a mis en évidence que HIF-2 α est aussi requis dans cellules endothéliales pour développement de l'hypertension induite par hypoxie et qu'elle contribue au phénotype activé des cellules endothéliales. Cependant, une autre étude a montré que les souris KO pour HIF-2 α dans cellules endothéliales développent spontanément HTAP quelques mois après la naissance. Ces souris présentent une élévation de la PAPm et un remodelage du ventricule

droit.¹²⁹ Ces études contradictoires démontrent que beaucoup de travail reste à faire afin de bien comprendre leur implication physiopathologique et de pouvoir les cibler comme thérapie potentielle. Les données suggèrent qu'il pourrait exister des différences spatio-temporelles dans le rôle de HIF-1/2 en HTAP et demeurent à être élucidées.

3.7.4 Facteurs FOX

Les FOX font partie d'une grande famille de facteurs de transcription qui comprend plus d'une cinquantaine de membres identifiés. Certains d'entre eux ont été grandement étudiés et ont été impliqués dans différentes pathologies, en particulier dans le cancer. De façon intéressante, certaines études se sont également penchées sur l'implication des FOX en HTAP.

Les FOXOs sont souvent considérés comme des régulateurs négatifs de la prolifération et sont associés à l'induction d'un arrêt du cycle cellulaire et de l'apoptose.¹³⁰ Savai et collaborateurs ont démontré que l'expression de FOXO1 est fortement diminuée en HTAP. Ils ont démontré que différents facteurs de croissance et cytokines inflammatoires connus pour être impliqués dans l'HTAP (PDGF, IL-6, TNF- α) vont activer des voies de signalisation comme PI3K/AKT et STAT3, ce qui va mener à la phosphorylation de FOXO1.¹³¹ Une fois phosphorylé, FOXO1 est exclu du noyau et est ciblé pour dégradation par le protéasome. Cette équipe a également montré que le paclitaxel, un agent anticancéreux qui augmente l'expression et l'activité de FOXO1, permet de renverser le phénotype des PSMCs – HTAP. *In vivo*, le paclitaxel améliore les paramètres hémodynamiques dans les modèles MCT et Su/Hx. Des résultats similaires ont également été obtenus par une autre équipe dans le modèle MCT.¹³² Certaines études ont également montré que FOXO1 serait un régulateur négatif de FOXM1, un facteur de transcription appartenant à la même famille ayant largement été étudié dans le cas de cancer. Cet axe de régulation favorise la prolifération cellulaire.¹³³ En effet, la diminution de l'expression de FOXO1 serait responsable de la surexpression de FOXM1 et favoriserait la prolifération cellulaire. Le rôle de ce facteur sera décrit plus en détail à la section 5 de l'introduction puisqu'il est l'objet principal de l'étude présentée au chapitre 2.

3.7.5 Facteur anti-apoptotique Survivin

Survivin fait partie de la famille des inhibiteurs de l'apoptose. Son expression élevée dans les PSMCs HTAP en fait un important médiateur du phénotype des PSMCs et contribue au développement de la pathologie.¹³⁴ Son inhibition par thérapie génique permet de renverser l'HTAP *in vitro* de même que dans les modèles animaux. Son expression dans le sérum des patients corrèle généralement avec la sévérité de la pathologie et pourrait être utilisée comme potentiel biomarqueur de la pathologie.¹³⁵

3.7.6 Autres voies de signalisation impliquées en HTAP

La prolifération et la survie des cellules constituant la paroi des AP (CE, PSMCs et fibroblastes) impliquent de nombreux facteurs et l'activation persistante de nombreuses voies de signalisation. Certaines parmi les plus importantes (telles que les voies BMPR2, STAT3 et HIF) ont été décrites dans les sections précédentes, mais d'autres méritent également d'être mentionnées.

Notch3 est un récepteur de la famille des Notch et a été impliqué dans la prolifération et la différenciation des PSMCs. Le récepteur Notch3 est surexprimé en HTAP et son expression corrèle avec la sévérité de la pathologie.¹³⁶ Cette voie de signalisation est connue pour réguler l'expression du récepteur au PDGF, mais également pour interagir avec les voies de signalisation BMPR2 et HIF-1.^{136,137} L'inhibition de sa voie de signalisation a été investiguée par plusieurs équipes et semble avoir un effet bénéfique pour le traitement de l'HTAP dans les modèles *in vivo* (revu par Morris et al.).¹³⁸

Plusieurs études montrent également une activation aberrante des voies MAPK (mitogen activated protein kinases) en HTAP. Les voies des MAPK incluent trois principales voies de signalisation : RAF/ERK1/2, JNK et p38. La voie p38 MAPK contribue à la dysfonction endothéliale et à l'activation des fibroblastes.¹³⁹ *In vitro*, la prolifération des PSMCs est notamment dépendante de l'activation de p38 MAPK.¹⁴⁰ *In vivo*, son inhibition permet de prévenir et renverser l'HTAP dans deux modèles précliniques d'HTAP.¹⁴¹ Une autre étude menée par Kojonazarov et collaborateurs a permis de montrer que l'inhibition de p38 MAPK

améliore les fonctions cardiaques et diminue la fibrose dans le VD.¹⁴² La voie RAF/ERK1/2 est activée principalement suivant la liaison de facteurs de croissance à leurs récepteurs de type tyrosine/kinase tels que VEGFR et PDGFR. Plusieurs équipes ont tenté de cibler ces récepteurs tyrosine kinase puisque ces voies de signalisation sont impliquées dans diverses facettes de la pathologie. On peut penser à l'imatinib, dont l'exemple a été donné précédemment (section 3.4.1), qui montrait initialement un grand potentiel thérapeutique pour le traitement de l'HTAP. En contrepartie, d'autres inhibiteurs des tyrosine/kinase favorisent plutôt le développement de la pathologie. Par exemple, le Su5416 (inhibiteur du VEGFR) est utilisé pour induire la pathologie *in vivo* (le modèle sera décrit plus en détail dans les sections suivantes). Des cas d'HTAP ont aussi été rapportés suivant l'utilisation du Dasatinib, un inhibiteur tyrosine kinase utilisé dans le traitement pour la leucémie.¹⁴³ Ces données suggèrent que les effets de l'inhibition des récepteurs tyrosine/kinase sont complexes et qu'il faut donc demeurer prudent dans l'utilisation de tels inhibiteurs en HTAP.

3.8 Activation des fibroblastes

L'adventice a reçu beaucoup moins d'attention dans l'historique de la recherche en HTAP comparativement aux deux autres couches cellulaires constituant la paroi artérielle. Cependant, les évidences suggèrent que les fibroblastes et l'adventice jouent un rôle nettement sous-estimé dans la régulation et le maintien de l'homéostasie vasculaire en HTAP.

Une fois activés, les fibroblastes habituellement quiescents peuvent proliférer, migrer et se différencier en myofibroblastes exprimant l' α SMA.¹ Ils sont également un producteur important de matrice extracellulaire. L'activation de ces cellules contribue donc au remodelage et à la modulation du tonus vasculaire. Les analyses d'histopathologies chez l'humain ont révélé une accumulation importante de ces myofibroblastes dans l'adventice des patients HTAP.¹⁴⁴

Plusieurs facteurs tels que l'hypoxie, l'IL-6, et le TGF- β induisent la prolifération et la différenciation des fibroblastes d'AP.^{1,145,146} Ces cellules sont également impliquées dans la régulation de la réponse inflammatoire. Une fois activés, les fibroblastes peuvent en retour

produire et sécréter une variété de cytokines pro-inflammatoires, favorisant ainsi le recrutement de cellules inflammatoires dans les régions périvasculaires.¹⁴⁷ Bien que l'on comprenne mieux aujourd'hui l'importance de ces cellules, le manque d'outils spécifiques pour les étudier (par exemple l'absence de marqueurs cellulaires exclusivement spécifiques aux fibroblastes) impose une sévère limitation dans l'étude de ce type cellulaire.

3.9 Facteurs épigénétiques

Un facteur épigénétique est un facteur pouvant réguler l'expression génique sans modifier directement la séquence nucléotidique de l'ADN. Trois principaux types de modifications sont considérées comme étant des modifications épigénétiques : les processus permettant la méthylation de l'ADN, les modifications des histones et la régulation de l'expression par des ARN non codants.¹⁴⁸ Ces modifications peuvent être héritées et transmises lors de la réplication cellulaire ou bien acquises *de novo*.¹⁴⁹

3.9.1 Méthylation de l'ADN

La méthylation de l'ADN consiste à ajouter un groupement méthyl sur nucléotide de l'ADN, typiquement les cytosines.¹⁵⁰ La méthylation de l'ADN est généralement associée à une répression de l'expression génique.¹⁵¹ Plusieurs facteurs ont la possibilité d'ajouter des groupements méthyl sur l'ADN, notamment les « DNA methyl transferase » (Dnmt). En HTAP, on observe une surexpression de Dnmt1 et Dnmt3 dans les poumons de rats FHR (Fawn-hooded rat), un modèle qui développe spontanément la pathologie.¹⁵² Ces facteurs seraient responsables de l'hyper méthylation du gène SOD2, qui est réprimé dans ce modèle et dans les PSMCs de patients. Le promoteur du gène BMP2 est souvent hyper méthylé dans les patients atteints comparativement à des membres de leur famille non atteints, suggérant un mécanisme potentiel pouvant expliquer la répression de l'expression de ce gène en HTAP chez les individus ne portant pas de mutations.¹⁵³ De façon intéressante, on a récemment identifié des mutations dans le gène TET2 (Tet-methylcytosine-dioxydenase-2), codant pour une enzyme impliquée dans la déméthylation de l'ADN.¹⁵⁴ Les souris KO pour TET2 développent de façon spontanée un HTAP. Ces études renforcent l'hypothèse voulant

que les processus épigénétiques permettant la méthylation et la déméthylation de l'ADN puissent avoir une incidence sur le développement de la pathologie.

3.9.2 Modification des histones

Les histones sont également susceptibles de subir des modifications épigénétiques. En HTAP, la plus étudiée est l'acétylation. Trois groupes d'enzymes vont veiller à l'équilibre entre les marques d'acétylation : les marqueurs (histones acétyl transférase – HATs), les effaceurs (histones désacétylases – HDACs) et les lecteurs. Un équilibre entre l'activité de ces enzymes est essentiel à la régulation de la transcription.

Les lecteurs reconnaissent les marques acétylées sur les histones. Les domaines protéiques permettant la reconnaissance des marques acétylées sont les bromodomains (BRD) et on les retrouve dans une grande diversité de protéines. Les lecteurs ont la capacité de réguler l'expression génique en favorisant le remodelage de la chromatine et la modification des histones (acétylation/phosphorylation), mais aussi en favorisant le recrutement de facteurs de transcription et de co-facteurs.¹⁵⁵ Parmi ces lecteurs, BRD4 (bromodomain containing protein 4) est surexprimé chez les patients HTAP et contribue au phénotype hyper prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs en régulant positivement l'expression de plusieurs oncogènes, notamment NFAT, BCL-2 et Survivin.¹⁵⁶ Sa surexpression est en partie due à la diminution du microARN miR-204 en HTAP, qui sera discutée plus en détail dans la section suivante. BRD4 a largement été étudié en tant que cible thérapeutique en HTAP. Plusieurs études précliniques ont démontré une réversion du phénotype HTAP des PSMCs et une amélioration de la sévérité de la maladie dans plusieurs modèles animaux suivant l'utilisation d'inhibiteurs de BRD4.^{156,157} Parmi les inhibiteurs de BRD4, l'Apabetalone fait en ce moment l'objet d'une étude clinique pour le traitement de l'HTAP (NCT03655704).

Les HAT sont des enzymes qui ajoutent un groupement acétyl sur les histones. L'acétylation des histones est généralement associée à une ouverture de la chromatine, ce qui facilite l'accès à l'ADN pour la machinerie de transcription. Cependant, elles ont peu été étudiées dans le cadre de la maladie. Les HDACs ont en revanche été beaucoup plus étudiées. De

nombreuses études ont montré la surexpression de plusieurs protéines de cette famille en HTAP, notamment HDAC1, HDAC4, HDAC5 et HDAC7.¹⁵⁸ Les modifications épigénétiques dues à une activité plus importante des HDACs seraient aussi associées à l'acquisition du phénotype activé constitutif des fibroblastes pulmonaires.^{159,147} Leur inhibition est généralement associée à une amélioration des données hémodynamiques, à une diminution de la production de cytokines inflammatoires et de la migration de cellules immunitaires vers les régions périvasculaires.^{159,158,160} Des effets contradictoires ont cependant été rapportés quant à l'utilisation de ces inhibiteurs, montrant que les inhibiteurs pan-HDAC n'améliorent pas nécessairement l'HTAP et peuvent même détériorer les fonctions cardiaques.^{161,162} Ils sont donc à utiliser avec prudence. De façon intéressante, HDAC6, qui est une HDAC exclusivement cytoplasmique dont sa fonction n'affecte pas l'acétylation des histones, est également surexprimée en HTAP.¹⁶³ La suppression de HDAC6 permet de maintenir Ku70 à un état non acétylé, ce qui empêche la translocation de BAX à la mitochondrie et la cascade apoptotique résultante. *In vivo*, l'inhibition de HDAC6 par la Tubastatin A améliore l'HTAP dans deux modèles animaux, en plus de potentialiser l'effet de thérapies actuellement approuvées.¹⁶³

3.9.3 Les ARN non codants

Les microARNs (miR) sont des ARNs composés d'une vingtaine de nucléotides. Ils modifient l'expression génique en se liant à un ARN messager cible et empêchent sa traduction en protéine. À ce jour, plus de 2000 miR ont été découverts.¹⁶⁴ De façon générale, un seul miR a la capacité de reconnaître et de cibler plusieurs ARNm différents. Les évidences suggèrent que les miR peuvent réguler jusqu'à 30% du génome.¹⁶⁵ De nombreuses études ont montré leur implication dans l'étiologie de la pathologie et le rôle central qu'ils occupent dans la dérégulation génique en HTAP.¹⁶⁶ À titre d'exemple, l'expression de miR-204 est diminuée en HTAP et elle corrèle avec la sévérité de la pathologie.¹⁶⁷ Cette diminution est causée par l'activation de STAT3 et serait responsable de l'augmentation de l'expression de plusieurs acteurs impliqués en HTAP notamment NFAT, HIF-1 α et RUNX2, favorisant le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs.^{167,168,169} En HTAP, l'activation normoxique de HIF-1 α est aussi responsable de la diminution de l'expression de

miR-223, qui entraîne l'augmentation subséquente de PARP-1 (Poly [ADP-ribose] polymérase 1), enzyme impliquée dans la réparation des dommages à l'ADN.¹⁷⁰ De façon intéressante, PARP-1 est connu pour favoriser la répression de miR-204, qui lui-même favorise l'activation normoxique de HIF-1 α .¹⁷¹ Cette relation entre les différents facteurs met en évidence une possible boucle rétroactive qui favorise le maintien de l'état activé de HIF-1 α en HTAP. Outre ces exemples, de nombreux autres miRs ont été impliqués en HTAP. Ils ont été décrits en détail et ont fait l'objet de plusieurs revues de littérature.^{172, 173 174}

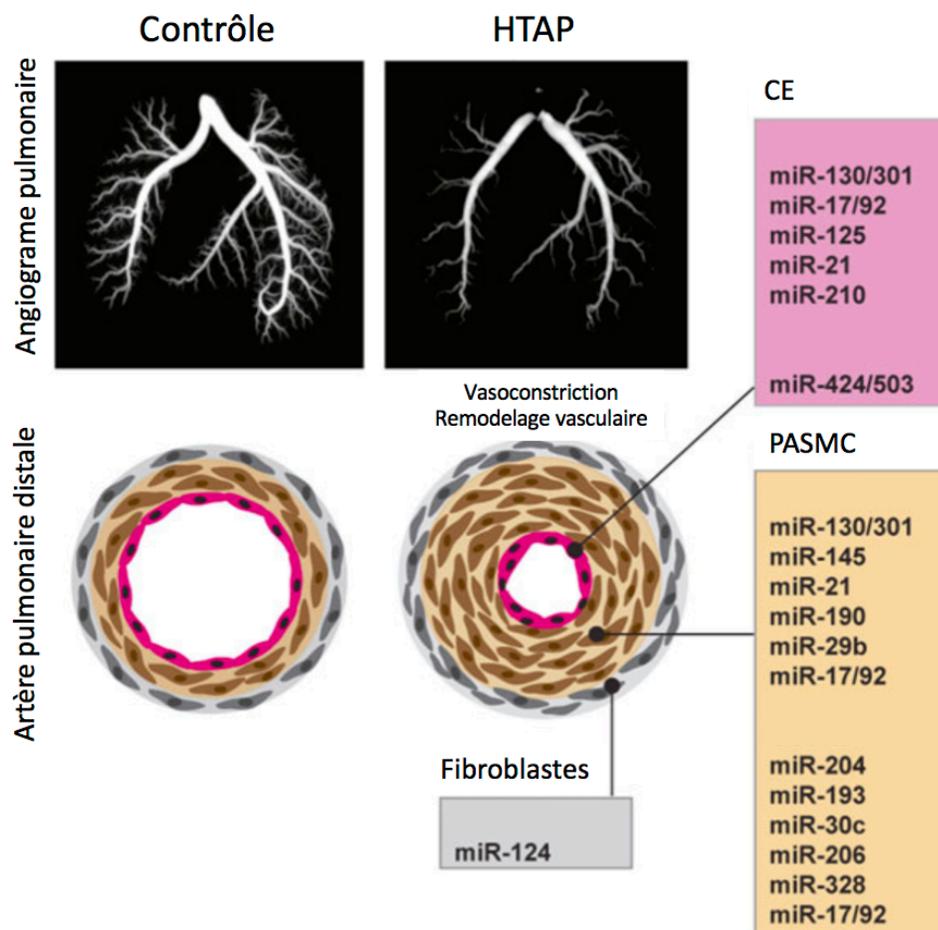


Figure 1.9 : Schéma représentatif des microARNs impliqués dans le remodelage vasculaire en HTAP. Figure adaptée de Boucherat *et al. microRNA and pulmonary hypertension Springer* 2015

Outre les miRs, les longs ARN non codants (lncRNA) sont également des modulateurs épigénétiques et ont été impliqués dans de nombreux processus physiopathologiques. Typiquement, les lncRNA sont définis comme étant des ARNs de plus de 200 nucléotides

qui ne sont pas traduits en protéines.¹⁷⁵ Ce n'est que tout récemment que leur implication a été mise en évidence en HTAP, le nombre d'articles portant sur les lncRNA sont en constante augmentation depuis les dernières années.¹⁷⁶ L'implication des lncRNA a été décrite dans de nombreux processus impliqués dans la pathologie tels que la prolifération, la migration cellulaire, l'apoptose, l'endoMT, etc. À titre d'exemple, MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1) est surexprimé en HTAP et a été impliqué dans la prolifération et la migration des CE et PSMCs. Il agit en tant «qu'éponge» pour miR-124, ce qui empêche son activité et favorise l'expression de protéines comme KLF5, un facteur de transcription qui favorise la prolifération des PSMCs en régulant l'expression de cyclin B1 et l'expression de survivin.^{177,178} MALAT1 a aussi été impliqué dans la transition endoMT induite par le TGF- β via la diminution de l'expression de miR-145.¹⁷⁹ Il a aussi été démontré que le lncRNA H19 est augmenté dans le VD compensé des patients HTAP comparativement aux contrôles, résultat répliqué dans le modèle monocrotaline.¹⁸⁰ Les niveaux circulants de H19 permet de discriminer les patients HTAP des contrôles, ce qui en fait un nouveau biomarqueur potentiel.

3.10 Dommages à l'ADN

Au cours de la vie d'une cellule, celle-ci peut être exposée à différents stress endogènes et exogènes induisant des dommages au niveau de l'ADN. Afin de préserver l'intégrité du code génétique, la cellule est dotée de plusieurs mécanismes lui permettant de réparer un ADN compromis. Les lésions de l'ADN peuvent être de différente nature. Plusieurs vont induire des modifications de bases nucléotidiques, ce qui peut mener à un mésappariement de base. D'autres sources de stress vont plutôt induire des cassures au niveau de l'ADN, qui peuvent être simples brins (qui sont les formes les plus fréquentes) ou doubles brins (beaucoup plus dommageables pour la cellule). Bien que les cellules soient dotées de mécanismes pour réparer les dommages, ils peuvent parfois induire des mutations somatiques. Ces mutations peuvent être silencieuses, mais dans certains cas, elles peuvent accorder un avantage de croissance considérable aux cellules tel qu'observé dans le cas des cellules cancéreuses. Inversement, si les lésions s'accumulent et les mécanismes de réparation sont insuffisants, il va y avoir induction de la mort cellulaire par apoptose.

Selon la nature des dommages, il existe plusieurs mécanismes de réparation impliquant différents processus et acteurs moléculaires, mais la séquence des événements est sensiblement la même pour toutes les voies de réparation. Lorsqu'il y a présence de dommages dans la cellule, les mécanismes de réparation sont mis en marche de façon séquentielle : les premières protéines impliquées ont pour rôle de détecter les dommages. Elles vont ensuite transmettre le signal à des protéines effectrices qui vont induire l'activation de différents processus associés à la réparation de l'ADN, la réponse transcriptionnelle, à l'activation des points de contrôle aux dommages à l'ADN et à l'apoptose.¹⁸¹

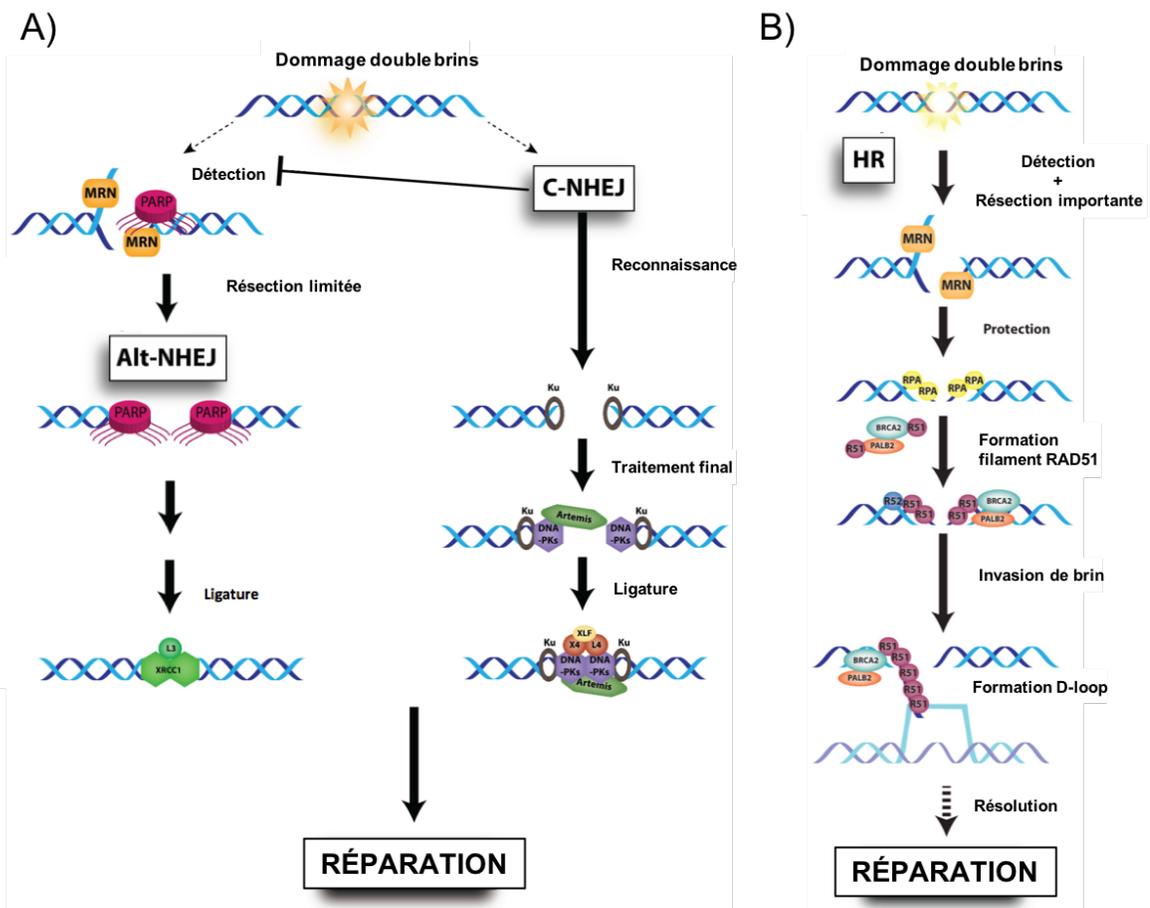


Figure 1.10 : Représentation schématique de la réparation des dommages à l'ADN par A) recombinaison non homologue (NHEJ) et B) recombinaison homologue (HR). Adaptée de *Velic et al DNA Damage Signalling and Repair Inhibitors: The Long-Sought-After Achilles' Heel of Cancer, Biomolecules 2015*

3.10.1 Recombinaison non homologue (NHEJ)

La NHEJ est probablement le plus simple des mécanismes de réparation de dommages doubles brins. Deux voies différentes ont été identifiées ; la voie classique (cNHEJ) et la voie alternative (aNHEJ). En absence d'un brin modèle, les protéines impliquées dans cette voie réparation vont simplement joindre les extrémités en y synthétisant des nucléotides aléatoires, sans gabarit modèle. Le cNHEJ nécessite l'association de Ku70 (protéine impliquée dans la régulation des dommages à l'ADN) aux extrémités libres de l'ADN, ce qui va ensuite permettre le recrutement des protéines kinase dépendantes de l'ADN (DNA-PKs). Les DNA-PKcs vont ensuite permettre le recrutement et l'activation de différents substrats nécessaires à l'appariement des extrémités libres.^{182,183}

Le aNHEJ constitue un autre mécanisme de réparation de cassures doubles brins. Ce mécanisme est normalement réprimé par le cNHEJ, mais peut être activé lorsque ce premier n'est pas fonctionnel.¹⁸⁴ Contrairement au cNHEJ, le aNHEJ est considéré comme une source d'instabilité génomique puisqu'elle est susceptible d'induire des mutations.¹⁸⁵ Cette voie implique l'action de la Poly (ADP-ribose) polymérase 1 (PARP-1) et du complexe MRN (composé de trois protéines : Mre11, Rad50 et NBS1), qui sont mieux connus pour participer respectivement à la réparation de lésions simples brins et doubles brins par recombinaison homologue.

3.10.2 Recombinaison homologue (HR)

La recombinaison homologue consiste en un autre mécanisme de réparation qui survient suite à des cassure doubles brins. Cette voie implique une réparation utilisant un modèle, par recherche de régions homologues sur la chromatide sœur de l'ADN lésé. Cette voie de réparation est moins sujette à induire des mutations puisqu'elle se base sur un modèle d'ADN et ne synthétise pas de nouvelles sections de façon aléatoire.

Le complexe MRN est crucial au processus de recombinaison homologue. Lorsqu'il y a présence de dommages doubles brins, le complexe est recruté aux extrémités libres de l'ADN

et va permettre l'activation de la kinase ATM, qui va ensuite activer la cascade de signalisation impliquée dans la réparation.¹⁸⁶ Des études ont démontré que la présence des trois composantes du complexe est essentielle à sa stabilité. La délétion d'une seule d'entre elles compromet la stabilité du complexe et la capacité de la cellule à réparer correctement l'ADN.¹⁸⁷

3.10.3 Dommages à l'ADN en HTAP

De plus en plus d'évidences suggèrent que les dommages à l'ADN et l'activation des voies de réparation sont impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. *In vitro*, les CE de patients HTAP idiopathique et celles portant une mutation BMPR2 sont plus susceptibles à l'induction de dommages à l'ADN suivant une exposition à l'irradiation.¹⁸⁸ La mutation BMPR2 est associée à une diminution de BRCA1, protéine impliquée dans les processus de recombinaison homologue et du NHEJ. Ces cellules sont également plus susceptibles à l'apoptose.^{188,189} Une étude menée par de Jesus Perez et collaborateurs a également permis d'identifier TOPBP1 (topoisomerase DNA binding 2-binding protein 1) comme gène de susceptibilité pour l'HTAP.¹⁹⁰ Ce gène code pour la protéine TopBP1, connue pour être impliquée dans les mécanismes de réparations des dommages à l'ADN. Ils ont démontré que l'expression de TopBP1 est diminuée dans les CE des patients HTAP comparativement aux contrôles et que cette diminution augmente la susceptibilité aux dommages à l'ADN et à l'apoptose. Ces données suggèrent qu'une diminution des mécanismes de réparation des dommages pourrait contribuer à la dysfonction endothéliale et à l'apoptose précoce des CE observée en HTAP.

Meloche et collaborateurs ont mis en évidence que les PSMCs HTAP présentent plus de dommages à l'ADN que les cellules saines lorsque mis en culture tel que vu par une accumulation de γ H2AX (phospho histone H2A.X).¹⁷¹ Les PSMCs HTAP conservent tout de même une prolifération beaucoup plus élevée que les cellules saines, ce qui suggère qu'elles auraient développé des mécanismes leur permettant de faire face à ces dommages et d'échapper au processus apoptotique. Cette augmentation des dommages est également observée *in vivo* au sein des PSMCs tant chez les humains que dans les différents modèles

animaux d'HTAP (modèle MCT et Su/Hx). La présence élevée de dommages est associée à une surexpression de PARP-1, une enzyme connue pour être impliquée dans la réparation de l'ADN. L'inhibition de PARP-1 dans les PASMC mène à une accumulation de γ H2AX, vraisemblablement due à l'incapacité des cellules à réparer l'ADN lésé, ce qui induit une diminution de la prolifération cellulaire et une augmentation de l'apoptose. Les inhibiteurs de PARP-1 ont largement été étudiés en tant que stratégie thérapeutique dans le cancer. Actuellement, l'Olaparib est utilisé pour les traitements de cancers déficients en BRCA1 ou BRCA2. Au vu des résultats prometteurs obtenus par Meloche et al, une étude clinique de phase 1 a été entamée afin d'évaluer l'efficacité de l'Olaparib en HTAP (NCT03251872), montrant l'intérêt potentiel de cibler le processus de réparation de l'ADN en HTAP. Bien qu'aux stades précoces de la pathologie, une diminution des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN semble à la dysfonction endothéliale et à leur apoptose précoce, il a été suggéré qu'aux stades plutôt tardifs, l'activation des mécanismes de réparation contribue grandement à la survie cellulaire et à leur prolifération. Cibler ces voies dans les stades tardifs de la pathologie s'avère être une stratégie thérapeutique intéressante.

4. Modèles animaux de l'HTAP

Au cours des années, plusieurs modèles animaux ont été développés pour étudier l'HTAP. On y a reproduit différentes composantes physiopathologiques similaires à celles retrouvées chez l'humain. Bien qu'aucun de ces modèles ne soit parfait, leur utilisation n'en demeure pas moins essentielle dans l'optique de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement de la maladie et dans le but de développer de nouvelles thérapies. Les rongeurs sont les modèles les plus utilisés dans les études précliniques d'HTAP. Dans ces modèles, l'HTAP peut être induite (exemple : modèle de rat monocrotaline, modèle de souris hypoxie, rat et souris sugen-hypoxie) ou développée spontanément suite à des mutations génétiques héréditaires ou induites (Fawn-hooded rat, rat muté pour le gène BMPR2, souris transgéniques, etc.). Vu leur grande diversité, je vous décrirai en détail les deux modèles les plus fréquemment utilisés, qui correspondent à ceux ayant servi à l'étude présentée au chapitre 2 de ce mémoire. Pour ce qui est des autres

modèles, ils ne seront qu'évoqués brièvement. Ils ont fait l'objet de plusieurs revues de littérature.¹⁹¹⁻¹⁹³

4.1 Le modèle monocrotaline (MCT)

La crotaline est une substance alcaloïde provenant de la plante *Crotalaria spectabilis*. Une fois métabolisée au niveau du foie par l'enzyme cytochrome P-450, elle est convertie en monocrotaline pyrrole, un composé induisant une toxicité pulmonaire et hépatique.¹⁹⁴ En 1967, J. Kay et collaborateurs ont montré chez les rats Wistar que cette toxicité était associée au développement d'une hypertension pulmonaire.¹⁹⁵ Le modèle utilisé de nos jours a beaucoup évolué depuis. Typiquement, l'HTAP est induite par une unique injection sous-cutanée de monocrotaline, à une dose de 60mg/kg.¹⁹² Dans les premiers jours suivant l'injection, la forme activée de la monocrotaline induit une toxicité au niveau des cellules endothéliales vasculaires pulmonaire et hépatique. Une hypertrophie de la média au niveau des artères pulmonaires distales peut être observée environ 8 jours suivant l'injection de monocrotaline et survient plus tardivement dans les artères de plus grand diamètre.¹⁹⁶ L'épaississement de la média entraîne une élévation de pression au niveau de l'AP et du VD, ce qui va résulter en une hypertrophie du VD. Dans ce modèle, la progression de l'HTAP est assez fulgurante et si aucune intervention n'est faite, ces rats meurent généralement d'une insuffisance cardiaque droite à partir de la cinquième semaine. On retrouve une composante inflammatoire importante dans ce modèle, marquée par une accumulation de macrophages péri vasculaire et une augmentation de cytokines inflammatoires comme l'IL-6.^{197,198} Cependant, ces animaux ne développent pas de lésions vasculaires complexes telles que les lésions plexiformes, présentes chez l'humain. Le développement de la pathologie est également très rapide, contrairement à une progression plutôt lente observée chez l'humain. De plus, ce modèle est souvent critiqué puisqu'une proportion anormalement élevée de molécules testées permettent d'améliorer les pressions et renverser la progression de la maladie, mais il n'en demeure pas moins l'un des plus utilisés à ce jour grâce à sa reproductibilité, son accessibilité et son faible coût.¹⁹⁹

Ce modèle peut aussi être utilisé en combinaison avec une seconde source de stress. Par exemple, il est possible de combiner l'injection de monocrotaline à une pneumonectomie ou à une chirurgie permettant une dérivation du flux sanguin, ce qui induit une augmentation du débit sanguin dans les poumons.^{200,201} La combinaison de ces deux insultes résulte en une hypertension plus sévère telle que vu par l'apparition de lésions néointimales et une hypertrophie du ventricule droit plus importante que le modèle MCT seul.

4.2 Le modèle Sugén – Hypoxie (Su/Hx)

Le Sugén 5416 est un inhibiteur du récepteur au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGFR). Pour ce modèle, l'HTAP est induite par une unique injection sous-cutanée de Su-5416 à 20 mg/kg combinée à trois semaines d'hypoxie (10% O₂) et suivie d'une stabilisation en condition de normoxie pour deux semaines.¹⁹¹ Suivant cinq semaines, une HTAP sévère et non réversible est développée. La chronologie du développement pathologique est similaire à ce qui se produit chez l'humain. On observe une première phase où il y a mort des cellules endothéliales, puis une seconde phase où la pathologie progresse et se stabilise avec une acquisition de CE qui prolifèrent et résistent à l'apoptose, menant d'abord à un épaissement important de l'intima et puis de la média des petites artérioles.⁶¹ De façon intéressante, lorsque ces rats sont maintenus pour une période de temps prolongée (plus de 13 semaines), ils vont développer des lésions vasculaires similaires aux lésions plexiformes observées chez les humains atteints d'HTAP sévère.²⁰² Ils développent également une RVSP et pression de l'AP plus élevée que le modèle MCT, mais étonnamment son taux de mortalité est plus faible. Les mécanismes responsables ne sont toujours pas bien compris à ce jour.¹⁹¹ En contrepartie, on n'observe pas dans ce modèle une infiltration importante de cellules inflammatoires.¹⁹⁷ Malgré cela, il est souvent considéré comme étant l'un des meilleurs modèles disponibles puisqu'il récapitule plusieurs composantes de l'HTAP humaine.

4.3 Autres modèles animaux de l'HTAP

4.3.1 Hypoxie chronique

L'hypoxie chronique est l'un des modèles qui a été le plus utilisé pour induire une HTAP légère à modérée, autant chez les rats que les souris. Typiquement, les animaux sont placés dans une chambre hypoxique à 10% d'O₂ pour une durée de trois semaines. On observe suite à l'exposition à l'hypoxie une néomuscularisation des petites artères pulmonaires, une vasoconstriction importante et un remodelage modéré des artères pulmonaires distales (très léger dans les souris et plus sévère dans les rats).^{203,204} Les animaux présentent également une hypertrophie du VD, mais rarement des signes de défaillance cardiaque droite.¹⁹⁷ Une importante limite à ce modèle est qu'il est partiellement réversible lorsque les animaux sont remis en normoxie.²⁰⁵

4.3.2 Modèle «fawn hooded rat» (FHR)

Le FHR est un modèle de rat qui développe spontanément une HTAP, modérée ou sévère. Le développement de l'HTAP est exacerbé et plus précoce chez les rats élevés en condition hypoxique comparativement à ceux élevés en normoxie.^{206,207} Dans ce modèle, le développement de l'HTAP a été associé à un locus particulier situé sur le chromosome 1.²⁰⁸ Ce locus serait associé à plusieurs dysfonctions associées au développement de l'HTAP, dont une dysfonction mitochondriale (répression de l'expression de HIF-3a et SOD2 et de plusieurs composantes de la chaîne de transport d'électrons, particulièrement complexe 1, hyperpolarisation mitochondriale), une production élevée de l'ET-1 et une prolifération excessive des PASMCs et résistance à l'apoptose, récapitulant ainsi plusieurs composantes de l'HTAP humaine.^{105,152}

4.3.3 Modèles transgéniques

Plusieurs modèles murins ont été utilisés afin d'étudier l'effet de modifications génétiques dans le développement de l'HTAP. Grâce à ces modèles, il est possible d'évaluer l'effet d'une perte ou gain de fonction d'un gène ou d'une protéine cible. L'utilisation de ces modèles est de plus en plus courante de nos jours. Grâce à l'avancement des techniques, il est maintenant possible de créer des lignées murines où l'on étudie les effets d'une perte ou gain de fonction de façon systémique ou spécifique à certains types cellulaires. Comme la manipulation génétique peut en théorie s'appliquer dans l'étude de tous les gènes impliqués

dans la pathologie, seulement quelques modèles seront présentés ci-dessous. Les modèles les plus utilisés ont fait l'objet de plusieurs revues.^{193,204}

Les mutations du gène *BMPR2* représentent le facteur de risque génétique le plus important dans le développement de la pathologie. Les souris transgéniques ont grandement été utilisées dans les études *in vivo* afin d'évaluer l'effet des mutations de *BMPR2* dans le développement de la pathologie. L'avènement de nouvelles technologies facilite maintenant les manipulations génétiques dans les rats. Ranchoux et collaborateurs ont été les premiers à induire une délétion dans le premier exon du gène *BMPR2*. Les rats hétérozygotes présentent un remodelage vasculaire et des évidences de transition EndoMT trois mois suivant la naissance comparativement aux individus non mutés (WT).⁷⁰ Une étude subséquente a montré que les rats portant une mutation dans le même exon développent spontanément une HTAP dans 16 à 27% des cas, ce qui est semblable à la pénétrance observée chez l'humain.⁵² Ces rats sont plus susceptibles au développement de HTAP induite par hypoxie que les WT. De façon intéressante, les rats qui présentent une HTAP ont des niveaux plus élevés d'IL-6. Le développement de ce nouveau modèle offre de nouveaux outils pour étudier le développement de l'HTAP associée à une mutation *BMPR2*.

Outre les modèles pour *BMPR2*, il a été montré que les souris surexprimant un transgène d'IL-6 développent spontanément une HTAP, accentuée par une mise en hypoxie.⁸⁰ Celles-ci présentent une augmentation du remodelage vasculaire, de la RVSP et une hypertrophie cardiaque droite comparativement aux souris contrôles.

4.3.4 Constriction de l'artère pulmonaire

La constriction de l'artère pulmonaire est une chirurgie pouvant être effectuée autant chez le rat que la souris. Elle permet d'induire une résistance au flux sanguin et une surcharge de pression au niveau du VD. Cela résulte en une hypertrophie cardiaque droite et selon le degré de constriction, on peut observer ou non une défaillance cardiaque.^{209,210} Bien qu'il ne s'agissent pas d'un modèle d'HTAP à proprement dit puisqu'il ne présente aucune atteinte physiopathologique au niveau des poumons, c'est un modèle qui permet d'étudier

spécifiquement les processus impliqués dans la réponse à une surcharge de pression et la fonction du VD.

4.4 Limitations associées aux études précliniques dans les modèles animaux

Dans les dernières années, le nombre de publications montrant des effets bénéfiques sur l'HTAP suite à l'utilisation de nouvelles molécules ne cesse d'augmenter. Cependant, seulement une faible proportion de ces drogues se rendent jusqu'au processus d'étude clinique et elles sont encore moins nombreuses à avoir été approuvées pour utilisation chez l'humain. On se rend compte qu'il existe une discordance importante entre les résultats obtenus dans les modèles animaux et ce qui est observé chez les humains, ce qui suggère qu'il reste beaucoup de travail à faire afin de pallier à ces lacunes. Il est certain que les modèles animaux ne sont pas toujours représentatifs de la pathologie humaine, mais de façon générale, le manque de reproductibilité est plutôt associé à un manque de rigueur, de puissance statistiques et à des lacunes lors de la planification des expériences.²¹¹ De nouvelles lignes directrices ont été établies et permettent de guider les scientifiques dans l'élaboration des protocoles expérimentaux.^{211,212} Elles sont généralement utilisées dans la planification d'études cliniques, mais ont souvent été négligées dans la planification des études précliniques par le passé. Il est suggéré pour les futures investigations de s'y référer puisqu'ils aideraient à limiter les biais et à améliorer la reproductibilité et la transparence des études. Ces récentes recommandations proposent entre autres d'effectuer les tests sur plus d'un modèle animal en plus de mentionner les choix motivant l'utilisation d'un modèle plutôt qu'un autre. Il est suggéré d'inclure dans les études autant des mâles et que des femelles (considérant que la grande majorité des études actuelles sont effectuées sur des mâles uniquement). Dans la mesure du possible, les expériences et les analyses devraient être effectuées à l'aveugle et de façon randomisé.²¹² La confirmation des résultats par des équipes indépendantes est également un bon moyen de s'assurer de la validité des résultats obtenus dans le but de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

5. Le facteur de transcription FOXM1

5.1 FOXM1 et la grande famille des FOX

FOXM1, aussi connu sous le nom de TRIDENT, est un facteur de transcription appartenant à la grande famille des FOX (Forkhead box protein). Chez l'humain, cette famille comprend une cinquantaine de membres caractérisés par la structure bien conservée de leur domaine de liaison à l'ADN «winged helix». La séquence conservée du motif de liaison à l'ADN laisse penser que les différents facteurs ont le potentiel de reconnaître des séquences similaires, suggérant une redondance de fonction dans la régulation génique de cette famille de facteur de transcription. Plusieurs groupes se sont attardés à mieux comprendre la fonctionnalité de chacune des protéines et leur rôle potentiellement conservé au sein des différentes espèces.

Initialement, trois isoformes différentes de FOXM1 ont été identifiées.²¹³ Celles-ci sont formées suite à l'épissage alternatif des exons Va et VIIa. La forme FOXM1a contient ces deux exons. La présence de l'exon VIIa au sein de son domaine de transactivation en fait une protéine transcriptionnellement inactive. L'isoforme B ne comprend aucun des deux exons tandis que l'isoforme C contient uniquement l'exon Va au sein de son domaine de liaison à l'ADN et sont toutes les deux transcriptionnellement actives (Figure 1.11).

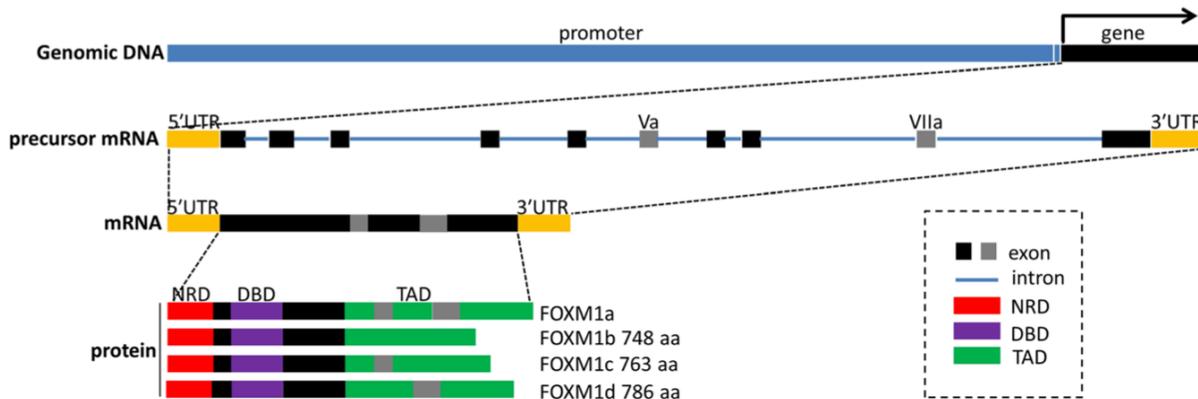


Figure 1.11 : Structure du gène et des domaines fonctionnels de FOXM1. Adaptée de Liao et al. *Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer*

Ces trois isoformes ont été grandement étudiées dans divers processus cellulaires et maladies. Ce n'est que tout récemment qu'une nouvelle isoforme a été identifiée dans le cancer du

côlon.²¹⁴ Zang et collaborateurs ont montré l'importance de cette nouvelle isoforme, FOXM1d, dans le processus de transition épithélio-mésenchymateuse spécifiquement à ce type de cancer.

5.2 FOXM1 dans le cycle cellulaire

Le rôle central de FOXM1 au sein de divers processus cellulaires en a fait de lui une cible d'intérêt dans la recherche sur le cancer, une pathologie à prolifération cellulaire rapide. Normalement éteinte dans les cellules quiescentes et différenciées, l'expression de FOXM1 est régulée de façon très synchronisée selon les différentes phases du cycle cellulaire. L'expression de l'ARNm est d'abord induite au début de la phase G1, pour atteindre son maximum en fin G1/début S. Cependant, son activité est induite seulement plus tard dans le cycle. En effet, lorsque FOXM1 est d'abord exprimé, il est inactif en raison d'une interaction auto-inhibitrice entre son domaine N-terminal et son domaine de transactivation (TAD).^{215,216} Durant la phase G2, la protéine est phosphorylée à plusieurs sites (T600 et T611) par le complexe CyclinA/Cdk, ce qui va rompre l'interaction auto-inhibitrice entre le TAD et le domaine N-terminal.²¹⁷ L'activation complète de FOXM1 nécessaire à la régulation de gènes impliqués dans le processus mitotique nécessite une deuxième vague de phosphorylation. La phosphorylation à la sérine 251 est critique pour l'hyper phosphorylation de FOXM1 par la Cyclin B1/CDK1.²¹⁸ Cette phosphorylation va permettre de recruter PLK1 (reconnaît FOXM1 pré-phosphorylé), ce qui va résulter en une hyper-phosphorylation du domaine C-terminal (aux positions S715 et S724), permettant la transcription de gènes nécessaire à la progression mitotique.²¹⁹

À son tour, FOXM1 régule de façon critique la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire.²²⁰ On retrouve parmi ceux-ci PLK1, CyclinB1, Survivin et cdc25b.²²¹ Une délétion de FOXM1 entraîne des défauts dans la progression mitotique, induisant un arrêt de la prolifération. La majorité des cellules vont entrer en mitose mais seront incapables de la compléter, entraînant mort cellulaire par catastrophe mitotique.²²² Ainsi, en contrôlant l'expression de gènes critiques pour la progression du cycle cellulaire, FOXM1 joue un rôle important dans la prolifération cellulaire.

5.3 FOXM1 dans le développement pulmonaire

L'importance du facteur de transcription FOXM1 lors du développement embryonnaire a été mise en évidence suite à plusieurs études de modulation génique effectuées chez la souris. Lors du développement embryonnaire, FOXM1 est fortement exprimé dans une multitude d'organes et types cellulaires différents (par exemple dans les cellules du foie, intestin, pancréas, thymocytes, précurseurs neuronaux, cardiomyocytes). Il est également exprimé dans plusieurs types cellulaires du poumon dont les cellules épithéliales, musculaires lisses et endothéliales.²²³ La délétion systémique de FOXM1 chez les souris est létale, provoquant la mort des embryons entre les stades de développement E13.5 et E16. Dans ce modèle, la délétion de FOXM1 est associée à une accumulation de cellules polyploïdes (évidence que ces cellules sont incapables de compléter le processus de division mitotique) majoritairement au niveau du foie, des cardiomyocytes et des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires.²²⁴ La délétion de FOXM1 est associée à une réduction du nombre de capillaires sanguins, causé par un défaut dans la prolifération des cellules musculaires lisses, mais ne semble cependant pas affecter les cellules épithéliales. Une autre équipe a développé un modèle de souris knock-out (KO) pour FOXM1 spécifique aux PASMCs.²²⁵ Dans ce modèle, environ 87% des souris meurent dans les 24h suivant la naissance. La mortalité élevée est causée par d'importantes hémorragies pulmonaires survenant suite à des lésions au niveau du système vasculaire et de l'œsophage, encore une fois due à une prolifération altérée des cellules musculaires lisses. Cette observation met en évidence l'importance de FOXM1 dans les cellules musculaires lisses pour le développement du système vasculaire pulmonaire et de l'œsophage.

5.4 FOXM1 dans l'inflammation

Le facteur de transcription FOXM1 a été associé à la réponse inflammatoire. Dans le contexte du cancer du poumon, l'ablation de FOXM1 dans les macrophages résulte en une diminution de la prolifération des cellules cancéreuses, de l'infiltration des macrophages dans le microenvironnement tumoral ainsi qu'une diminution de l'expression de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-6 et IL-1 β .²²⁶ L'expression de FOXM1 dans les CE vasculaires

est essentielle à la reconstitution de la barrière endothéliale suivant l'induction de lésions pulmonaires par lipopolysaccharide (LPS) ou hyperoxie.²²⁷⁻²²⁹ Son expression est induite suite à l'induction des lésions et contribue à la réparation de la barrière endothéliale en favorisant la prolifération des CE. Dans les modèles de souris KO pour FOXM1, on observe une augmentation de la perméabilité vasculaire de même qu'un échec de la résolution de l'inflammation.²³⁰

5.5 FOXM1 dans la régulation de la réponse aux dommages à l'ADN

Le rôle de FOXM1 dans la régulation du cycle cellulaire est connu depuis longtemps, mais ce n'est que plus récemment qu'il a également été impliqué dans la régulation de la réparation des dommages à l'ADN. En condition de culture cellulaire normale, les cellules déficientes en FOXM1 présentent plus de lésions dans l'ADN comparativement aux cellules normales, une première évidence montrant que FOXM1 pourrait être impliqué dans la régulation des processus de réparation de l'ADN.²³¹ D'un point de vue moléculaire, l'inhibition de FOXM1 est aussi associée à une diminution de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les différentes voies de réparation des dommages à l'ADN, tel que BRCA2, RAD51, NBS1 et plusieurs autres.²³¹⁻²³⁴ De façon intéressante, en régulant l'expression de NBS1, FOXM1 est essentiel à la stabilité du complexe MRN, nécessaire à la réparation des liaisons doubles brins.²³⁴

Dans le cancer, FOXM1 a été impliqué dans la résistance aux agents chimio thérapeutiques. La surexpression de FOXM1 protège les cellules de l'apoptose suivant une exposition à des agents génotoxiques.²²⁰ L'accumulation de dommages à l'ADN est nettement diminuée, suggérant que la surexpression de FOXM1 favorise la réparation des dommages. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de FOXM1 permet de sensibiliser les cellules cancéreuses aux différents agents chimio thérapeutiques et d'en potentialiser les effets *in vitro* et *in vivo*.²³⁵ Il semble donc que la surexpression de FOXM1 soit une stratégie adoptée par les cellules cancéreuses leur permettant de résister aux agents génotoxiques et serait une cible thérapeutique de choix pour contrer ce processus.

5.6 FOXM1 et métabolisme cellulaire

Dans le cancer, FOXM1 a été reconnu pour contribuer à l'effet Warburg. Dans le cancer épithélial ovarien, FOXM1 régule l'expression de GLUT1 et de HK-II en se liant directement à leur promoteur, favorisant ainsi la reprogrammation métabolique.²³⁶ Dans ce modèle, la glycolyse aérobie est supprimée suivant l'inhibition de FOXM1 par ARN interférant. De plus, il a été montré dans cancer du pancréas que FOXM1 régule l'expression de LDHA, autre enzyme impliquée dans la glycolyse. Une inhibition de FOXM1 diminue la production de lactate et l'utilisation du glucose.²³⁷

5.7 Inhibiteurs connus de FOXM1

Certains produits naturels ont été identifiés comme étant de potentiels inhibiteurs de FOXM1. La Thiostrepton est un antibiotique thiazole isolée de *Streptomyces azureus*, *S. hawaiiensis* and *S. laurentii*.²³⁸ Il est actuellement utilisée en médecine vétérinaire, mais aucune utilisation clinique chez l'humain n'a été approuvée à ce jour.²³⁹ Hedge et collaborateurs ont montré que ce composé peut se lier directement à FOXM1 et inhiber son activité transcriptionnelle, diminuant la prolifération de cellules cancéreuses.²³⁸ Un autre composé similaire, la Siomycin A, a également été identifiée comme inhibiteur de FOXM1. Ce composé induit des effets semblables à la thiostrepton.²⁴⁰ Il a été montré que ces composés sont spécifiques à FOXM1 et qu'ils n'affectent aucun autre membre de la famille des FOX. En plus d'inhiber l'activité transcriptionnelle de FOXM1, ces composés ont également la capacité de diminuer l'expression de la protéine. Ceci est dû à une boucle de rétroaction positive découlant du principe que FOXM1 possède la capacité de réguler sa propre expression.²⁴¹ Ces deux antibiotiques agissent également en tant qu'inhibiteurs du protéasome, un complexe multiprotéique ayant pour fonction de dégrader les protéines liées à l'ubiquitine. Actuellement, les données disponibles ne permettent pas d'exclure que la diminution de la prolifération cellulaire pourrait être causée par une inhibition du protéasome. Cependant, les études ont montré que lorsqu'on surexprime FOXM1 suivant une exposition à la thiostrepton, on limite son effet sur la prolifération, suggérant l'importance de l'inhibition de FOXM1 dans ces processus.²³⁹

5.8 FOXM1 en hypertension artérielle pulmonaire

Le rôle du facteur de transcription FOXM1 a d'abord été exploré en HTAP dans une étude publiée en 2012 par Raghavan et collaborateurs.²⁴² Ils ont étudié le rôle de FOXM1 dans les PASMCs suivant une exposition à l'hypoxie, un stimulus impliqué dans le développement de l'HTAP puisqu'il avait préalablement été rapporté que le promoteur de FOXM1 contenait des éléments de liaison pour HIF.²⁴³ L'exposition à l'hypoxie induit une augmentation de l'activité du promoteur de FOXM1 et de la transcription de son ARNm. L'inhibition de FOXM1 par ARN interférent prévient la prolifération cellulaire induite par l'hypoxie, suggérant que cette protéine a un rôle important à jouer dans cette réponse et donc potentiellement dans le développement de l'HTAP.

6. Hypothèses et objectifs de recherche

Bien que plusieurs thérapies aient été développées au cours des dernières années pour le traitement de l'HTAP, aucune d'entre elles ne permet à ce jour de guérir de façon définitive la maladie. Elles affectent principalement les voies de vasoconstriction et de dilatation, mais aucune ne permet de cibler réellement le remodelage vasculaire toujours présent au niveau des artères pulmonaires distales des patients. Ainsi, il est impératif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le phénotype hyper-prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs, dans le but d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux traitements. Tel que vu dans la section précédente, le facteur de transcription FOXM1 est un acteur clé dans les processus favorisant la prolifération des cellules cancéreuses (progression du cycle, la réparation des dommages à l'ADN, le métabolisme cellulaire et développement pulmonaire), connues pour partager de nombreuses similitudes avec les PSMCs HTAP. En raison de ces similitudes, nous avons posé l'hypothèse que FOXM1 est essentiel au développement de l'HTAP et que son expression induit une prolifération accrue des PSMCs, favorisant le processus de remodelage vasculaire. Plus précisément, mes travaux présentés au chapitre 1 ont pour objectifs de d'abord déterminer si FOXM1 est surexprimé dans différents tissus de la cohorte de patients HTAP du groupe de recherche en hypertension pulmonaire de Québec de même que dans les différents modèles animaux fréquemment utilisés. On s'est ensuite intéressé à déterminer les mécanismes moléculaires responsables de la surexpression de FOXM1 et à comprendre comment ce facteur contribue au phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs. Finalement, on a tenté de déterminer si FOXM1 pouvait être une nouvelle cible thérapeutique potentielle en HTAP, d'abord au niveau cellulaire en évaluant si son inhibition par approche moléculaire (ARN interférant) et pharmacologique (thiostrepton) induit un changement dans la prolifération et l'apoptose des PSMCs. Ensuite, nous avons évalué le potentiel thérapeutique de la thiostrepton *in vivo* dans deux modèles précliniques d'HTAP afin de déterminer si l'inhibition de FOXM1 diminue la sévérité de la pathologie. Cibler un facteur de transcription impliqué dans autant de processus cellulaires présente un réel intérêt dans le cadre de cette maladie complexe et multifactorielle puisqu'il serait possible de toucher de façon simultanée plusieurs voies de signalisation.

Chapitre 1

Résultats - Insertion d'article

FOXM1 Promotes Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Expansion in Pulmonary Arterial Hypertension

Alice Bourgeois¹, Caroline Lambert¹, Karima Habbout¹, Benoit Ranchoux¹, Stéphanie Paquet-Marceau¹, Isabelle Trinh¹, Sandra Breuils-Bonnet¹, Renée Paradis¹, Valérie Nadeau¹, Roxane Paulin^{1,2}, Steeve Provencher^{1,2}, Sébastien Bonnet^{1,2}, Olivier Boucherat^{1,2*}

¹Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec, QC, Canada.

²Department of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Running title: FOXM1 in pulmonary hypertension

* Corresponding author: Olivier Boucherat, PhD
Olivier BOUCHERAT, PhD
Pulmonary Hypertention Research Group
IUCPQ Research Centre
2725, chemin Sainte-Foy
Québec, QC
Canada, G1V 4G5
Phone: (418) 656-8711 ext 1438
e-mail: olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca

Total word count (Abstract): 206

Total word count (Main text body): 3593

Résumé

L'HTAP est caractérisée par une obstruction progressive des artères pulmonaires distales (APDs), causé par une prolifération aberrante et une résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses constituant la paroi des APDs. Lors du développement pulmonaire, le facteur de transcription FOXM1 est nécessaire à la prolifération cellulaire. Dans le cancer, pathologie partageant des caractéristiques communes avec l'HTAP, la surexpression de FOXM1 favorise la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose. Par cette étude, nous avons montré que FOXM1 est surexprimé chez les patients atteints d'HTAP comparativement aux sujets sains de même que dans les différents modèles animaux de la pathologie. L'inhibition de FOXM1 *in vitro* permet de renverser le phénotype HTAP. *In vivo*, l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de FOXM1 améliore la maladie. Par cette étude, nous avons mis en évidence l'implication de FOXM1 dans le développement de l'HTAP et confirmé que ce facteur représente une nouvelle cible thérapeutique prometteuse.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive vascular remodeling disease characterized by a persistent elevation of pulmonary artery pressure, leading to right heart failure and premature death. Exaggerated proliferation and resistance to apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is a key component of vascular remodeling. Despite major advances in the field, current therapies for PAH remain poorly effective in reversing the disease or significantly improving long-term survival. Because the transcription factor FOXM1 is necessary for PASMC proliferation during lung morphogenesis and its overexpression stimulates proliferation and evasion of apoptosis in cancer cells, we thus hypothesized that up-regulation of FOXM1 in PAH-PASMCs promotes cell expansion and vascular remodeling. Our results showed that FOXM1 was markedly increased in distal pulmonary arteries and isolated PASMCs from PAH patients compared to controls as well as in two preclinical models. *In vitro*, we showed that miR-204 expression regulates FOXM1 levels and that inhibition of FOXM1 reduced cell proliferation and resistance to apoptosis through diminished DNA repair mechanisms and decreased expression of the pro-remodeling factor Survivin. Accordingly, inhibition of FOXM1 with Thiostrepton significantly improved established PAH in two rat models. Thus, we show for the first time that FOXM1 is implicated in PAH development and represents a new promising target.

Keywords: Vascular remodeling, Proliferation, Apoptosis, Vascular smooth muscle, Pulmonary artery.

Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex disease characterized by a progressive narrowing of the distal pulmonary arteries (PAs) due to vasoconstriction and vascular remodeling. These structural abnormalities are accompanied by a marked and sustained elevation of pulmonary vascular resistance leading to right heart failure and death[1]. Although significant progress has been made in the understanding of PAH, current therapies that mainly focus on vasoconstriction fail to reverse the disease and only offer a modest benefit in both mortality and morbidity[2]. Therefore, the identification and characterization of new therapeutic targets is a pressing need. Accumulated evidence shows that the hyper-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is a key component of the aberrant vascular remodeling in PAH[3]. Although PAH is not a cancer, the similarities between these two disorders suggest that lessons learned from cancer may provide important insights into PAH pathogenesis and thus open new therapeutic avenues[3].

Forkhead box M1 (FOXM1) is a transcription factor known to positively regulate the expression of genes essential for DNA repair, cell cycle progression and cell survival, all of which being important features of PAH[3-5]. In mice, conditional deletion of *Foxm1* targeted to smooth muscle cells caused postnatal lethality due to severe pulmonary hemorrhage in the absence of structural heart abnormalities[6]. Histological examinations revealed that FOXM1 promotes pulmonary vascular development by directly stimulating proliferation of developing smooth muscle cells[6], suggesting that this pathway driving proliferation during normal development could be reawakened in adult vascular diseases characterized by aberrant proliferation such as PAH. Moreover, FOXM1 was repeatedly found to be overexpressed in many types of human cancer[7]; its expression correlating with tumor progression and patient survival[8]. Although transcription factors are usually considered as difficult to target, the druggability of FOXM1 was illustrated by several studies showing that the natural product Thiostrepton physically interacts with FOXM1[9] and potently affects FOXM1 transcriptional activity[9-11]. Consistently, expression of a constitutive active FOXM1 was documented to circumvent the anti-proliferative effects of Thiostrepton in cancer cells[12]. More importantly, inhibition of FOXM1 resulted in a significant reduction

in tumorigenic potential in cancer pre-clinical models[13, 14], further highlighting the critical importance of FOXM1 in promoting cell proliferation.

Given that PAH cells and cancer cells display phenotypic similarities[3], we therefore hypothesized that FOXM1 is overexpressed in PAH contributing to the augmented proliferation and resistance to apoptosis of PSMCs and that FOXM1 inhibition using Thiostrepton may offer a new therapeutic approach for reversing PAH.

Materials and methods

Detailed experimental procedures for quantitative RT-PCR, immunofluorescence studies and protein are provided in the supplemental materials.

Human tissue samples

Experimental procedures using human tissues or cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained from all subjects and the study was approved by *the IUCPQ-UL ethics committee (CER #20773)*. Healthy lung tissues (controls) were obtained during lung resection for tumors. Lung samples were taken at distance from the tumor and demonstrated normal lung parenchyma. All the PAH tissues were obtained from lung explants following transplant or early (“warm”) autopsy (Table S1). PAH and control tissues were obtained from Respiratory Health Network tissue bank. PAH diagnosis was previously confirmed by right heart catheterization, according to current guidelines[15].

Animal studies

All animal protocols were approved by the IUCPQ–UL Biosafety and Ethics Committees. All experiments were in accordance with recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH[16], including animal randomization, sequence allocation concealment and blinded assessments. Two clinically relevant animal models were used. 250-350g male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories) were injected subcutaneously with 60mg/kg of monocrotaline (MCT) (Sigma) or single subcutaneous injection (20mg/kg) of Sugen (Sigma) and then exposed to 3 weeks of normobaric hypoxia (10% O₂) (Su/Hx model). Once PAH was established 2 weeks and 5 weeks post MCT and Sugen injections

respectively, rats were randomly allocated to receive the FOXM1 inhibitor Thiostrepton (10mg/kg) or its vehicle intra-peritoneally administered every day for 2 weeks. Thiostrepton is an FDA-approved macrocyclic thiopeptide antibiotic known to reduce the transcriptional activity and expression of FOXM1[9-11]. A control (no PAH group) was also monitored.

***In vivo* assessment of pulmonary hypertension, RV hypertrophy and pulmonary vascular remodeling.**

Before sacrifice, rats were initially anesthetized with 3%–4% isoflurane and maintained with 2% during procedures. Hemodynamic parameters, including right ventricular systolic pressure (RVSP) and mean PA pressure (mPAP) were measured blindly by closed chest right heart catheterization (SciSence catheters), *as previously described*[17]. Hearts were excised and dissected to determine the RV/(left ventricle + septum) ratio as a parameter of RV hypertrophy. Rat lung tissues were harvested, fixed, embedded, sectioned, and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) or Elastica-van Gieson (EVG) for morphometric analysis to quantify PA wall thickness. At least 20 intra-acinar PAs (diameter inferior to 50 μ m) per rat were examined. The mean of these measurements was used as the representative value for each animal.

Cell culture and treatments

PAH-PAECS (n=3 cell lines) and PAH-PASMCs (n=11 cell lines) were isolated from small PAs (<1000 μ m diameter) from PAH patients. Controls PAECs (n=3 cell lines) and PASMCs (n=9 cell lines) were either purchased from Cell Application or isolated from non-PAH patients. Cells were used at passages 5 to 9 for experiments. As previously published[18], purchased and isolated control PASMCs exhibited the same behavior. PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic/antimycotic (Thermo Fisher Scientific). The purity of PASMCs and PAECs was determined by immunostaining with smooth muscle specific actin and CD31 antibodies, respectively. Thiostrepton (Santa Cruz Biotechnology) and Mirin (Focus Biomolecules) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a stock solution of 10mM and 100mM, respectively, and then added to the culture medium immediately before use. The implication of miR-204 in FOXM1 regulation was assessed using miRIDAN miR-204 mimic (200nM for 48h) (Thermo Fisher Scientific) and antagomiR-204 (hairpin inhibitor,

200nM for 48h) (Thermo Fisher Scientific). For each experiment, a proper control (mimics or hairpin inhibitor negative control from Thermo Fisher Scientific) was used. siFOXM1 (#L-009762-00) and scrambled control siRNA (Dharmacon) were transfected at a final concentration of 50nM with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific).

***In vitro* viability, proliferation and apoptosis measurements**

Cell viability was analyzed by quantification of mitochondrial reduction of MTT (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to formazan. Cell proliferation activity was determined by Ki67 labeling. Apoptosis was evaluated by Annexin V assay in well-fed condition of growth with 10% FBS and complemented using a starved condition of 0.1% FBS to assess resistance to apoptosis. The proliferative and apoptosis indices were calculated as the ratio of immunoreactive cells to the total number of DAPI-stained cells per field. For each cell line, experiments were performed in triplicate and at least 750 cells per condition were counted.

Statistical analysis

One-way ANOVA, and t-tests were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad) when applicable. Values are expressed as fold change or mean±standard error of the mean, as they followed a normal distribution. A significance level inferior to 5% ($P<0.05$) was considered statistically significant.

Results

FOXM1 expression is upregulated in human PAH and experimental models.

We first performed double immunofluorescence for FOXM1 and alpha smooth muscle actin (α SMA, a marker of smooth muscle cells) on lung tissue sections from control and PAH patients. *In situ* analyses revealed a strong FOXM1 nuclear staining in the media of remodeled distal PAs from PAH patients compared to control subjects (Fig. 1a). To validate this result, we measured its expression level by Western blot in PASMCs isolated from PAH patients and control subjects. In agreement with our *in situ* result, we found that FOXM1 is significantly overexpressed in PAH-PASMCs (>2-fold, Fig. 1b) compared to controls. No significant difference was detected between control and PAH-PAECs (Fig. 1c). We next

determined the relative expression of the four FOXM1 isoforms in control and PAH-PASMCs. Only the *FOXM1a*, *b* and *c* were detectable by real-time qPCR. We found that the three *FOXM1* isoforms were up-regulated in PAH-PASMCs compared to control cells and that the *FOXM1* transcript that was predominantly expressed in PAH-PASMCs was the transcriptionally active isoform *FOXM1c* (Fig. S1). As described in Human tissues and cells, the up-regulation of FOXM1 expression was also observed by immunofluorescence (Fig. 1d) and Western blot (Fig. 1e) in distal PAs from MCT and SuHx-induced PAH rat models compared to their respective controls. Altogether, our results indicate that FOXM1 overexpression is a common denominator of human and experimental PAH.

miR-204 regulates FOXM1 expression in PAH-PASMCs.

It was recently demonstrated by bioinformatics-based target prediction analysis and luciferase reporter assay that miR-204 down-regulation accounts for a direct up-regulation of FOXM1 in cancer cells[19]. Given that miR-204 down-regulation contributes to exaggerated proliferation and resistance to apoptosis of PAH-PASMCs[20], we examined the relationship between miR-204 and FOXM1 in PAH using a bidirectional approach. We first measured FOXM1 expression in PAH-PASMCs treated with either a miR-204 mimic or its proper mimic negative control for 48h. Consistent with findings in cancer cells, transfection of synthetic miR-204 markedly lowered FOXM1 expression (Fig. 1f). Conversely, control PASMCs treated with a miR-204 inhibitor “antagomiR” exhibited increased FOXM1 expression as compared to untreated cells or cells transfected with a control antagomiR (Fig. 1g), supporting our hypothesis that down-regulation of miR-204 in PAH-PASMCs contributes to enhanced FOXM1 expression.

Pharmacological and molecular inhibition of FOXM1 reduces PAH-PASMCs proliferation and survival.

Because FOXM1 is considered as a proto-oncogene promoting cell proliferation and protecting cells from apoptosis, we investigated whether FOXM1 inhibition can rescue the abnormal phenotype of PAH-PASMCs *in vitro*. To this end, PAH-PASMCs were exposed to escalating doses of Thiostrepton. Consistent with the fact that FOXM1 positively auto-regulates its own expression[21], treatment with Thiostrepton in PAH-PASMCs caused a

marked down-regulation of FOXM1 expression and resulted in a significant decrease of cell viability (Fig. S2a, b) and cell proliferation (Fig. 2A and S2d) with a concomitant increase in the cell cycle inhibitor p21 (Fig. S2a). In addition to inducing growth arrest, Thiostrepton inhibited PAH-PASMC resistance to serum-starvation-induced apoptosis (Fig. 2b) and induced PAH-PASMC apoptosis, as assessed by Annexin V labeling, TUNEL assay as well as Western blot analysis of the proteolytic cleavage of Caspase-3 protein (Fig. S3). As observed with Thiostrepton, FOXM1 knockdown using siRNA in PAH-PASMCs significantly reduced cell proliferation and resistance to apoptosis (Fig. 2 and S2c, e), further strengthening the implication of FOXM1 in PAH.

FOXM1 inhibition reduces DNA repair pathways and Survivin expression

During disease progression, sustained activation of the DNA repair machinery was identified as an adaptive response used by PAH-PASMCs to face stress, allowing them to survive and hyper-proliferate[4]. Interestingly, accumulated evidence indicates that enhanced FOXM1 expression confers resistance to DNA damage by stimulating the transcriptional network of genes involved in DNA repair[5]. Among them, FOXM1 was demonstrated to positively regulate expression of Nijmegen breakage syndrome 1 (*NBS1*)[22], a member of the tri-protein complex called MRN (MRE11-RAD50-NBS1) sensing DNA lesions and initiating the DNA damage response networks by supporting activation of Ataxia-telangectasis mutated[23, 24]. We thus investigated whether FOXM1 contributes to the enhanced DNA repair capacity of PAH-PASMCs by stimulating NBS1 expression. As previously observed[4], we confirmed that PAH-PASMCs manifest a more pronounced activated DNA damage signaling as revealed by elevated endogenous γ H2AX expression (Fig. 3a) and demonstrated that NBS1 is overexpressed in these cells compared to their normal counterparts (Fig. 3a). A significant positive correlation was found between the expression of FOXM1 and NBS1 in PAH-PASMCs (Fig. 3b). Interestingly, NBS1 up-regulation in isolated PAH-PASMCs was accompanied by an increase in MRE11, whereas no change was observed for RAD50 (Fig. S4a). High levels of NBS1 were also detected in distal PAs of MCT- and Su/Hx-challenged animals. Consistent with the above results in human PAH-PASMCs, a significant positive correlation was found between FOXM1 and NBS1 expression in both models (Fig. S4). More importantly, pharmacological or molecular

inhibition of FOXM1 in PAH-PASMCs caused a marked down-regulation in NBS1 expression (Fig. 3c, d), supporting the direct relationship between these two factors. As a consequence, Thiostrepton-treated PAH-PASMCs exhibited reduced activation of DNA damage signaling (Fig. 3e). Accordingly, the effects of FOXM1 inhibition on DNA damage signaling, cell proliferation and resistance to apoptosis were recapitulated by treatment with Mirin, a small molecular inhibitor of the MRN complex[24] (Fig. 3f, S5). Taken together, our results extend prior research showing that an enhanced DNA damage signaling contributes to exaggerated PAH-PASMC survival and proliferation and identify FOXM1 as a key player in DNA repair capacity.

As a transcription factor, FOXM1 coordinately regulates the expression of a large set of gene[25]. In addition to promoting DNA repair, FOXM1 has been documented in cancer cells to stimulate expression of several factors, such as Survivin[26, 27]. Because the latter was previously documented to promote vascular remodeling in PAH[18, 28], we thus tested whether inhibition of FOXM1 also impacts its expression levels in PAH-PASMCs. As expected, molecular and pharmacological inhibition of FOXM1 reduced Survivin expression in PAH-PASMCs (Fig. 4). Thus, FOXM1 regulates many factors implicated in the cancer-like phenotype of PAH-PASMCs.

Thiostrepton reverses pulmonary hypertension in the monocrotaline rat model.

Because FOXM1 inhibition corrects the abnormal phenotype of PAH-PASMCs *in vitro*, we tested whether Thiostrepton can reverse established PAH in the MCT rat model. Treatment with Thiostrepton in MCT rats markedly reduced expression levels of FOXM1 target genes NBS1 and Survivin, indicating effective inhibition of FOXM1 by Thiostrepton (Fig. S6a). While vehicle-treated rats showed severe PAH, treatment with Thiostrepton for two weeks significantly improved RVSP and mean mPAP in MCT rats (Fig. 5a, b), as assessed by right heart catheterization, whereas cardiac output was slightly but not significantly improved. Heart rate did not significantly change between groups (Fig. S6). As a result, Thiostrepton significantly diminished total pulmonary resistance (TPR) as compared to vehicle-treated rats (Fig. 5c, S6). RV hypertrophy calculated by Fulton index showed a trend towards a decrease in the Thiostrepton group (Fig. S6). As expected, vehicle-treated MCT animals exhibited marked increase in the wall thickness of distal PAs, which was significantly

diminished by Thiostrepton (Fig. 5d), suggesting that the improvement of the hemodynamic parameters was due to reduced vascular remodeling of distal PAs. Consistent with this finding, the proportion of Ki67-positive proliferating vascular cells was reduced by Thiostrepton (Fig. 5e), whereas a significant increase in apoptotic cell death was observed in distal PAs (Fig. 5e).

Thiostrepton improves pulmonary hypertension in the Sugden/Hypoxia rat model.

To further demonstrate the therapeutic benefit of Thiostrepton, we investigated whether the corrective effects observed in the MCT model can be replicated in a second model of PAH. As observed in the MCT model, we found that treatment with Thiostrepton reduced RVSP, mPAP, and TPR (Fig. 6a, b, c), whereas cardiac output slightly rose with Thiostrepton. Conversely, RV hypertrophy remained unaffected (Fig. S6) and no change in heart rate was noted between groups (Fig. S6). Compared with the control group, vehicle-treated Su/Hx rats displayed an obvious increase in thickening in the walls of small PAs, which was significantly attenuated following Thiostrepton administration (Fig. 6d). Cell proliferation in distal PAs was markedly decreased in animals exposed to Thiostrepton (Fig. 6e).

Discussion

In the present study, we showed that FOXM1 is overexpressed in PASMCs from PAH patients as well as in two animal models of PAH and established FOXM1 as a molecular driver of PASMC proliferation and resistance to apoptosis. Importantly, we demonstrated that pharmacological inhibition of FOXM1 transcriptional activity using Thiostrepton significantly improved established PAH in two experimental models (Fig. 7).

There is mounting evidence that epigenetic alterations are involved in PAH[29]. We demonstrated here that FOXM1 abundance in PAH-PASMCs is regulated, at least in part, through miR-204 down-regulation, previously shown to be etiologically implicated in PAH and accounting for the cancer-like phenotype of PAH-PASMCs[20]. In addition to miR-204, the regulation of FOXM1 expression in cancer cells has been attributed to a myriad of factors. Among them, two other members of the forkhead box family, namely FOXO1 and FOXO3 have been shown to antagonize FOXM1-dependent transcription by repressing FOXM1 transcription[30, 31]. Indeed, in response to growth factors like PDGF or IGF1, which are

elevated in PAH patients[32], Akt was found to be activated, leading to the phosphorylation and nuclear exclusion of FOXOs and thus upregulation of FOXM1[30]. Because FOXO1 and FOXO3 are downregulated in PAH-PASMCs contributing to vascular remodeling[32], it can be speculated that the reversal of vascular remodeling observed in preclinical animal models of PAH secondary to FOXO1 reconstitution could be due to the inhibition of FOXM1 activity. In addition to FOXOs, FOXM1 was identified as a direct target of Hypoxia-inducible factors[33, 34] that play a pivotal role in PAH[35, 36]. Notably, it was reported that under hypoxic conditions FOXM1 promoter activity and mRNA expression are induced in control human PASMCs and that FOXM1 is necessary for hypoxia-induced PASMC proliferation[34]. Interestingly, several pro-hypertensive factors including hypoxia have been shown to reduce miR-204 expression in PASMCs[20]. Published data combined to our finding suggest that FOXM1 is a downstream target of multiple signaling pathways and that its overexpression in PAH-PASMCs results from a coordinated transcriptional and post-transcriptional regulation. In light of these results, further studies are warranted to fully dissect the mechanisms involved in FOXM1 up-regulation in PAH cells.

Previous studies have revealed that FOXM1 is an important molecular driver of cancer[7]; a condition frequently characterized by a reawakening of developmental signaling pathways[37]. Consistently with the notion that cancer and PAH have important pathological features in common[3, 38], we found that FOXM1 is strongly increased in PAH-PASMCs and intrinsically related to the cancer-like phenotype of these cells. Interestingly, FOXM1 was documented to be required for proper embryonic development of blood vessels. Likewise, inactivation of *Foxm1* targeted to SMCs is accompanied with decreased PASMC proliferation and survival, leading to pulmonary hemorrhage, vascular defects and massive neonatal lethality[6]. Our findings showing that increased FOXM1 expression promotes PAH-PASMCs expansion support the notion that vascular remodeling in PAH is driven by the aberrant activation of genetic pathways used during normal development.

Importantly, we provide evidence that inhibition of DNA damage repair mechanisms through down-regulation of the DNA damage sensor protein NBS1 combined to repression of the anti-apoptotic and pro-proliferative factor Survivin contribute to the beneficial effects of FOXM1 inhibition on PAH-PASMCs. We previously demonstrated that PASMCs from PAH patients display increased expression of the DNA repair enzyme PARP-1 in comparison with

control subjects allowing cells to survive[4]. We show here that FOXM1 plays a pivotal role in promoting the DNA repair processes by stimulating expression of NBS1, one of the three proteins of the MRN complex involved in the initial processing of DNA damage. Consistent with this, we found that expression levels of NBS1 along with MRE11 are strongly overexpressed in PAH-PASMCs and that pharmacological inhibition of the MRN complex mimics FOXM1 inhibition leading to reduced activation of the DNA repair factor H2AX required for the assembly of DNA repair proteins[39]. This suggests that inhibition of FOXM1 disrupts the integrity of the MRN complex precluding efficient DNA repair required to sustain proliferation and survival of PAH-PASMCs. Interestingly, FOXM1 has been documented to directly enhance the expression of multiple genes involved in metabolic reprogramming towards glycolysis and cell cycle progression, such as GLUT1[40], HK2[40], Cyclin D1[41] and STAT3[42], also implicated in PAH progression[28, 35, 43]. Moreover, studies revealed that FOXM1 interacts and promotes activity of NF- κ B[44] and β -catenin[45], two transcription factors affecting numerous mechanisms involved in PAH progression including stress response, cell proliferation and survival as well as immune response[46, 47]. Therefore, considering the large number of genes influenced by FOXM1 overexpression and described as being implicated in the multi-faceted disease process in PAH, it can be assumed that the beneficial effects of FOXM1 inhibition observed both *in vitro* and *in vivo* are likely the result of a cumulative effect on numerous target pathways.

Limitations: Transcription factors are traditionally considered as difficult to target. Although Thiostrepton was identified as a chemical inhibitor of FOXM1 transcriptional activity, some studies demonstrated that the compound interfere with the proteasome. Therefore, we cannot formally rule out the possibility that some of our *in vitro* and *in vivo* effects may be due to an off-target mechanism. Nevertheless, our findings showing that molecular inhibition of FOXM1 recapitulates those obtained after treatment of Thiostrepton support the notion that the primary consequence of Thiostrepton is due to its effects on FOXM1. It must be underlined that, although the current study was designed to examine the role of FOXM1 in PAH-PASMCs, its possible implication in other cell types (including adventitial fibroblasts and inflammatory cells) also involved in the pathological remodeling of distal PAs remains to be addressed. For instance, deletion of FOXM1 in macrophages was documented to reduce their proliferation in injured lungs and to down-regulate the expression levels of multiple

inflammatory mediators such as IL-6 and CX3CL1[48]. Because IL-6 and CXCL3 are key drivers of PAH pathogenesis[49], it can be speculated that the beneficial effects of Thiostrepton in our animal models also result from attenuated perivascular inflammation. Further studies are required to clarify this issue. Moreover, despite the fact that Thiostrepton significantly improved established PAH in MCT- and Su/Hx-challenged rats by reducing hemodynamic parameters (RVSP and mPAP), RV hypertrophy was unchanged. The lack of significant cardiac improvement may be due to insufficient treatment duration, or alternatively, to adverse effects of FOXM1 inhibition in the heart. However, this prospect seems unlikely because postnatal ablation of *Foxm1* in cardiomyocytes does neither alter cardiac morphology or function in injured mice, nor exacerbate cardiac hypertrophy or fibrosis following chronic pressure overload[50].

In summary, our data support the view that overexpression of the transcription factor FOXM1 contributes to PASMC expansion in PAH patients. Notwithstanding the challenges of specifically targeting a transcription factor, FOXM1 inhibition may provide a new therapeutic approach to treat PAH by impacting numerous genes with pro-remodeling functions.

Acknowledgements

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (to O. Boucherat and S. Bonnet), by the ATS Foundation (to O. Boucherat) and by the Cardiovascular Medical Research and Education Fund (to S. Bonnet). A. Bourgeois is the recipient of the Mohammed Family PH Research Scholarship. We thank the Respiratory Health Network Tissue Bank as well as Drs. Pasquale Ferraro and Emmanuelle Brochiero from the Centre Hospitalier de l'Université de Montreal Research Centre for their help in obtaining PAH lung tissues.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

References

1. Lau EMT, Giannoulatou E, Celermajer DS, Humbert M (2017) Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 14: 603-614. DOI 10.1038/nrcardio.2017.84
2. Lajoie AC, Lauziere G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S (2016) Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *The Lancet Respiratory medicine* 4: 291-305. DOI 10.1016/s2213-2600(16)00027-8
3. Boucherat O, Vitry G, Trinh I, Paulin R, Provencher S, Bonnet S (2017) The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 7: 285-299. DOI 10.1177/2045893217701438
4. Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulin A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, et al. (2014) Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 129: 786-797. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167
5. Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EW (2014) FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta* 1839: 1316-1322. DOI 10.1016/j.bbagr.2014.09.016
6. Ustiyani V, Wang IC, Ren X, Zhang Y, Snyder J, Xu Y, Wert SE, Lessard JL, Kalin TV, Kalinichenko VV (2009) Forkhead box M1 transcriptional factor is required for smooth muscle cells during embryonic development of blood vessels and esophagus. *Developmental biology* 336: 266-279. DOI 10.1016/j.ydbio.2009.10.007
7. Gartel AL (2017) FOXM1 in Cancer: Interactions and Vulnerabilities. *Cancer Res* 77: 3135-3139. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-16-3566
8. Li L, Wu D, Yu Q, Li L, Wu P (2017) Prognostic value of FOXM1 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8: 32298-32308. DOI 10.18632/oncotarget.15764
9. Hegde NS, Sanders DA, Rodriguez R, Balasubramanian S (2011) The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton. *Nat Chem* 3: 725-731. DOI 10.1038/nchem.1114

10. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL (2009) Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* 4: e5592. DOI 10.1371/journal.pone.0005592
11. Kwok JM, Myatt SS, Marson CM, Coombes RC, Constantinidou D, Lam EW (2008) Thiostrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Molecular cancer therapeutics* 7: 2022-2032. DOI 10.1158/1535-7163.MCT-08-0188
12. Kwok JM, Peck B, Monteiro LJ, Schwenen HD, Millour J, Coombes RC, Myatt SS, Lam EW (2010) FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 8: 24-34. DOI 10.1158/1541-7786.MCR-09-0432
13. Buchner M, Park E, Geng H, Klemm L, Flach J, Passegué E, Schjerven H, Melnick A, Paietta E, Kopanja D, et al. (2015) Identification of FOXM1 as a therapeutic target in B-cell lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 6. DOI 10.1038/ncomms7471
14. Wang IC, Ustiyani V, Zhang Y, Cai Y, Kalin TV, Kalinichenko VV (2014) Foxm1 transcription factor is required for the initiation of lung tumorigenesis by oncogenic Kras(G12D). *Oncogene* 33: 5391-5396. DOI 10.1038/onc.2013.475
15. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, et al. (2015) 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *The European respiratory journal* 46: 903-975. DOI 10.1183/13993003.01032-2015
16. Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, Hassoun PM, Rabinovitch M, Nicolls MR, Humbert M (2017) Translating Research into Improved Patient Care in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 195: 583-595. DOI 10.1164/rccm.201607-1515PP
17. Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, Lampron MC, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, et al. (2017) HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep* 7: 4546. DOI 10.1038/s41598-017-04874-4

18. Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, et al. (2015) Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res* 117: 525-535. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.115.307004
19. Sun Y, Yu X, Bai Q (2015) miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 12775-12783
20. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, et al. (2011) Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* 208: 535-548. DOI 10.1084/jem.20101812
21. Halasi M, Gartel AL (2009) A novel mode of FoxM1 regulation: positive auto-regulatory loop. *Cell Cycle* 8: 1966-1967. DOI 10.4161/cc.8.12.8708
22. Khongkow P, Karunarathna U, Khongkow M, Gong C, Gomes AR, Yague E, Monteiro LJ, Kongsema M, Zona S, Man EP, et al. (2014) FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance. *Oncogene* 33: 4144-4155. DOI 10.1038/onc.2013.457
23. You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25: 5363-5379. DOI 10.1128/MCB.25.13.5363-5379.2005
24. Dupre A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee JH, Nicolette ML, Kopelovich L, Jasin M, Baer R, Paull TT, et al. (2008) A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nature chemical biology* 4: 119-125. DOI 10.1038/nchembio.63
25. Sanders DA, Gormally MV, Marsico G, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S (2015) FOXM1 binds directly to non-consensus sequences in the human genome. *Genome Biol* 16: 130. DOI 10.1186/s13059-015-0696-z
26. Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, Robaina MC, Khongkow P, Gomes AR, Zona S, Crocama S, Mencialha AL, Magalhaes LM, et al. (2015) FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell Signal* 27: 2496-2505. DOI 10.1016/j.cellsig.2015.09.013
27. Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, Tan Y, Ackerson T, Costa RH (2005) Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential

for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 25: 10875-10894. DOI 10.1128/mcb.25.24.10875-10894.2005

28. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED (2005) Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 115: 1479-1491. DOI 10.1172/JCI23203

29. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS (2016) Epigenetic mechanisms in pulmonary arterial hypertension: the need for global perspectives. *Eur Respir Rev* 25: 135-140. DOI 10.1183/16000617.0036-2016

30. Lam EW, Brosens JJ, Gomes AR, Koo CY (2013) Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer* 13: 482-495. DOI 10.1038/nrc3539

31. Sengupta A, Kalinichenko VV, Yutzey KE (2013) FoxO and FoxM1 Transcription Factors Have Antagonistic Functions in Neonatal Cardiomyocyte Cell Cycle Withdrawal and IGF1 Gene Regulation. *Circulation research* 112: 267-277. DOI 10.1161/CIRCRESAHA.112.277442

32. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, et al. (2014) Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 20: 1289-1300. DOI 10.1038/nm.3695

33. Xia L, Mo P, Huang W, Zhang L, Wang Y, Zhu H, Tian D, Liu J, Chen Z, Zhang Y, et al. (2012) The TNF-alpha/ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis. *Carcinogenesis* 33: 2250-2259. DOI 10.1093/carcin/bgs249

34. Raghavan A, Zhou G, Zhou Q, Ibe JC, Ramchandran R, Yang Q, Racherla H, Raychaudhuri P, Raj JU (2012) Hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation is controlled by forkhead box M1. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 46: 431-436. DOI 10.1165/rcmb.2011-0128OC

35. Paulin R, Courboulin A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, Cote J, Provencher S, Sussman MA, Bonnet S (2011) Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary

- arterial hypertension. *Circulation* 123: 1205-1215. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963314
36. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, et al. (2006) An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 113: 2630-2641. DOI 10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008
37. Naxerova K, Bult CJ, Peaston A, Fancher K, Knowles BB, Kasif S, Kohane IS (2008) Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological leitmotifs in human cancers. *Genome Biol* 9: R108. DOI 10.1186/gb-2008-9-7-r108
38. Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, Goncharova EA (2017) Translational Advances in the Field of Pulmonary Hypertension. From Cancer Biology to New Pulmonary Arterial Hypertension Therapeutics. Targeting Cell Growth and Proliferation Signaling Hubs. *Am J Respir Crit Care Med* 195: 425-437. DOI 10.1164/rccm.201606-1226PP
39. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010) H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids* 2010. DOI 10.4061/2010/920161
40. Wang Y, Yun Y, Wu B, Wen L, Wen M, Yang H, Zhao L, Liu W, Huang S, Wen N, et al. (2016) FOXM1 promotes reprogramming of glucose metabolism in epithelial ovarian cancer cells via activation of GLUT1 and HK2 transcription. *Oncotarget* 7: 47985-47997. DOI 10.18632/oncotarget.10103
41. Hu C, Liu D, Zhang Y, Lou G, Huang G, Chen B, Shen X, Gao M, Gong W, Zhou P, et al. (2014) LXRalpha-mediated downregulation of FOXM1 suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 33: 2888-2897. DOI 10.1038/onc.2013.250
42. Gong AH, Wei P, Zhang S, Yao J, Yuan Y, Zhou AD, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S (2015) FoxM1 Drives a Feed-Forward STAT3-Activation Signaling Loop That Promotes the Self-Renewal and Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Res* 75: 2337-2348. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-14-2800

43. Tudor RM, Davis LA, Graham BB (2012) Targeting energetic metabolism: a new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185: 260-266. DOI 10.1164/rccm.201108-1536PP
44. Zhao B, Barrera LA, Ersing I, Willox B, Schmidt SC, Greenfeld H, Zhou H, Mollo SB, Shi TT, Takasaki K, et al. (2014) The NF-kappaB genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep* 8: 1595-1606. DOI 10.1016/j.celrep.2014.07.037
45. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee HT, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y, et al. (2011) FoxM1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 20: 427-442. DOI 10.1016/j.ccr.2011.08.016
46. Takahashi J, Orcholski M, Yuan K, de Jesus Perez V (2016) PDGF-dependent beta-catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *FEBS letters* 590: 101-109. DOI 10.1002/1873-3468.12038
47. Hosokawa S, Haraguchi G, Sasaki A, Arai H, Muto S, Itai A, Doi S, Mizutani S, Isobe M (2013) Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-kB) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF-kB inhibitor IMD-0354. *Cardiovasc Res* 99: 35-43. DOI 10.1093/cvr/cvt105
48. Balli D, Ren X, Chou FS, Cross E, Zhang Y, Kalinichenko VV, Kalin TV (2012) Foxm1 transcription factor is required for macrophage migration during lung inflammation and tumor formation. *Oncogene* 31: 3875-3888. DOI 10.1038/onc.2011.549
49. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8: 443-455. DOI 10.1038/nrcardio.2011.87
50. Bolte C, Zhang Y, York A, Kalin TV, Schultz Jel J, Molkentin JD, Kalinichenko VV (2012) Postnatal ablation of Foxm1 from cardiomyocytes causes late onset cardiac hypertrophy and fibrosis without exacerbating pressure overload-induced cardiac remodeling. *PLoS One* 7: e48713. DOI 10.1371/journal.pone.0048713

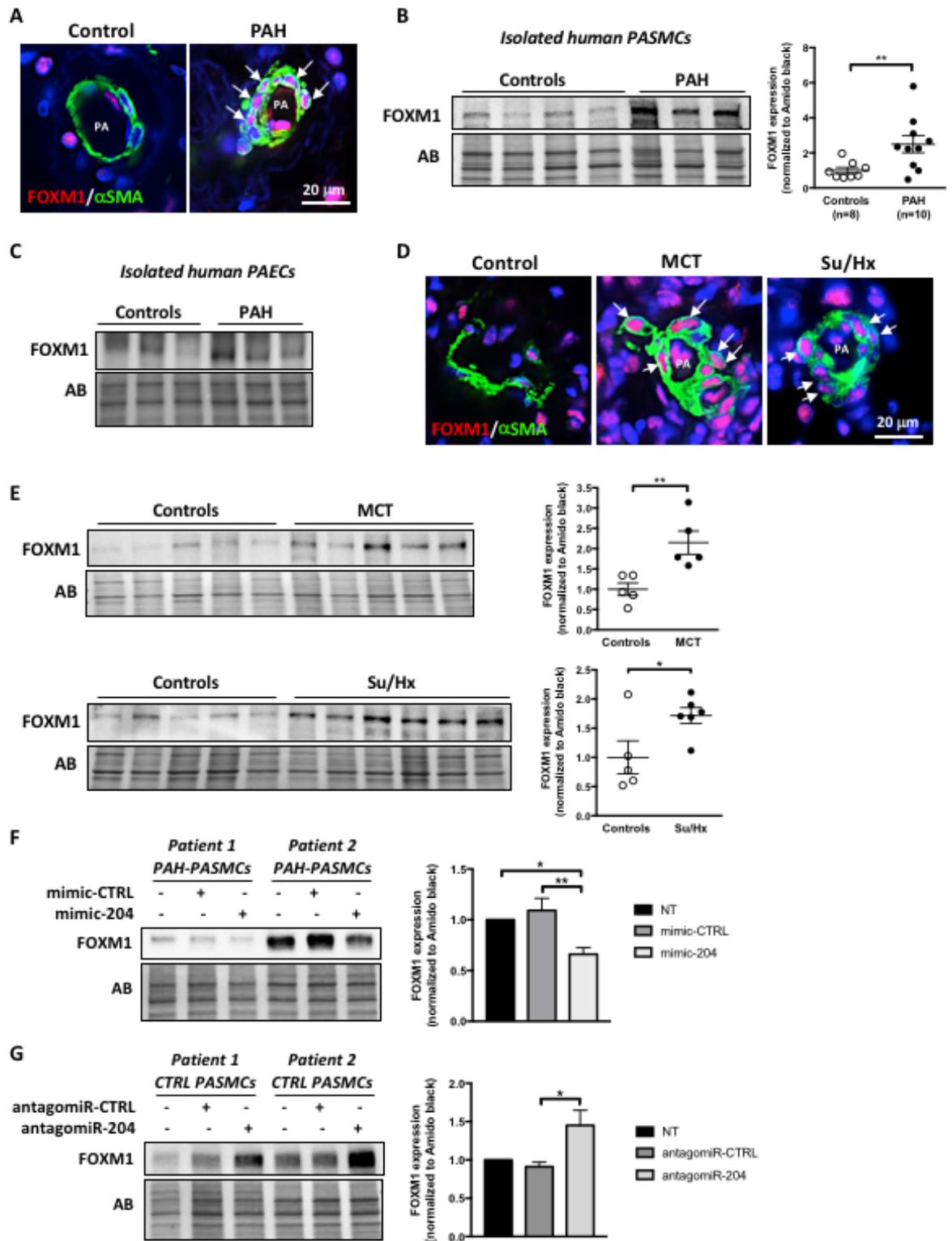


Figure 1. FOXM1 is overexpressed in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from PAH patients and animal models.

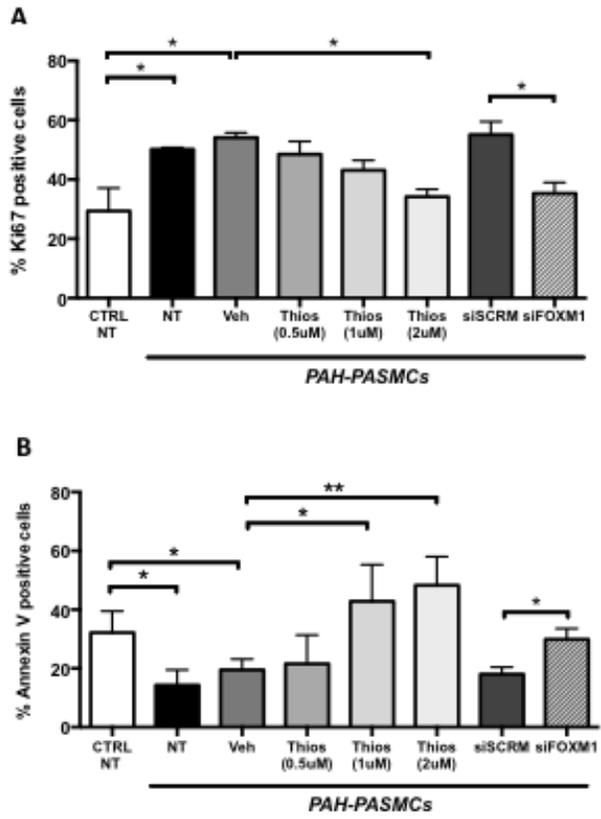


Figure 2. Pharmacological and molecular inhibition of FOXM1 reduces PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis.

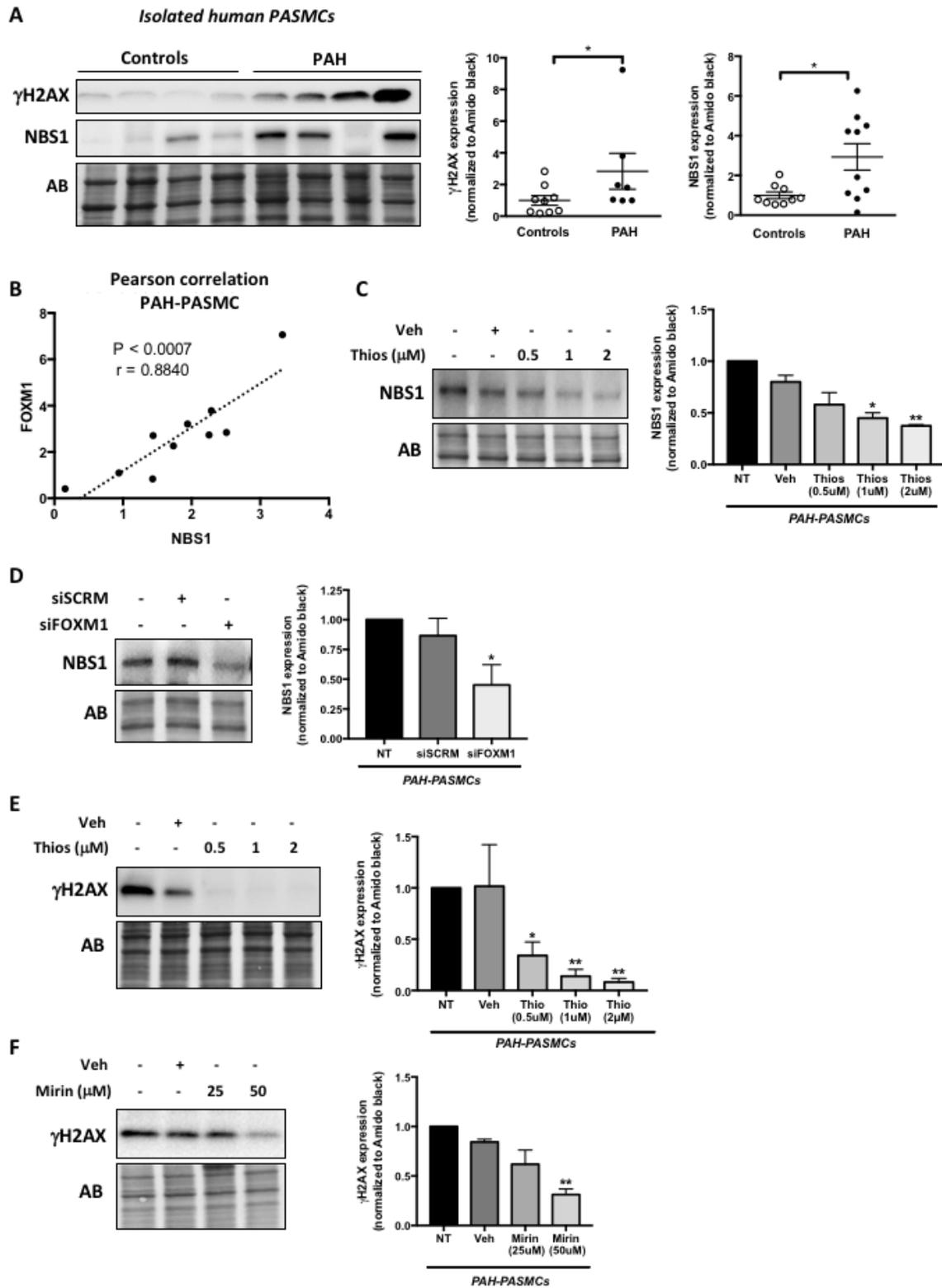


Figure 3. Inhibition of FOXM1 impairs DNA repair in PAH-PAMSCs.

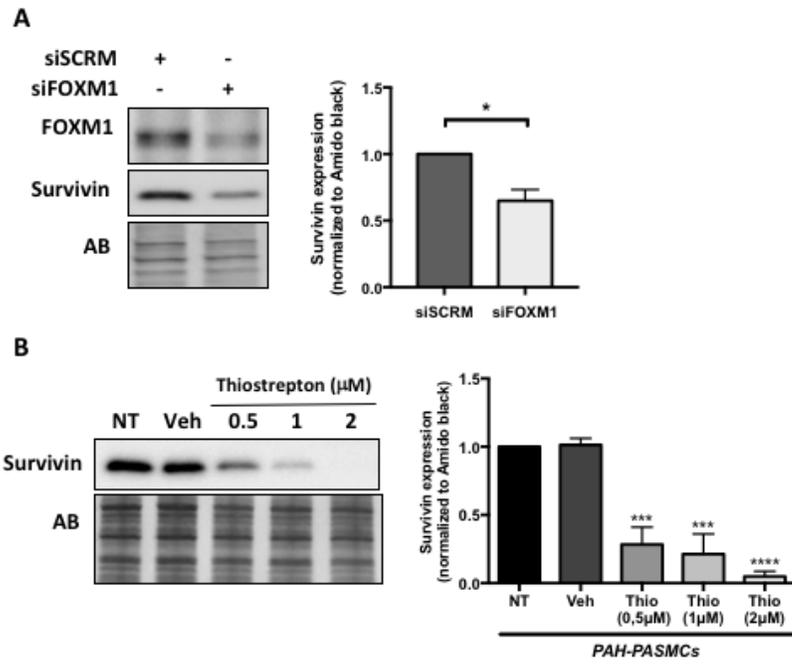


Figure 4. Inhibition of FOXM1 in PAH-PASMCs reduces Survivin expression.

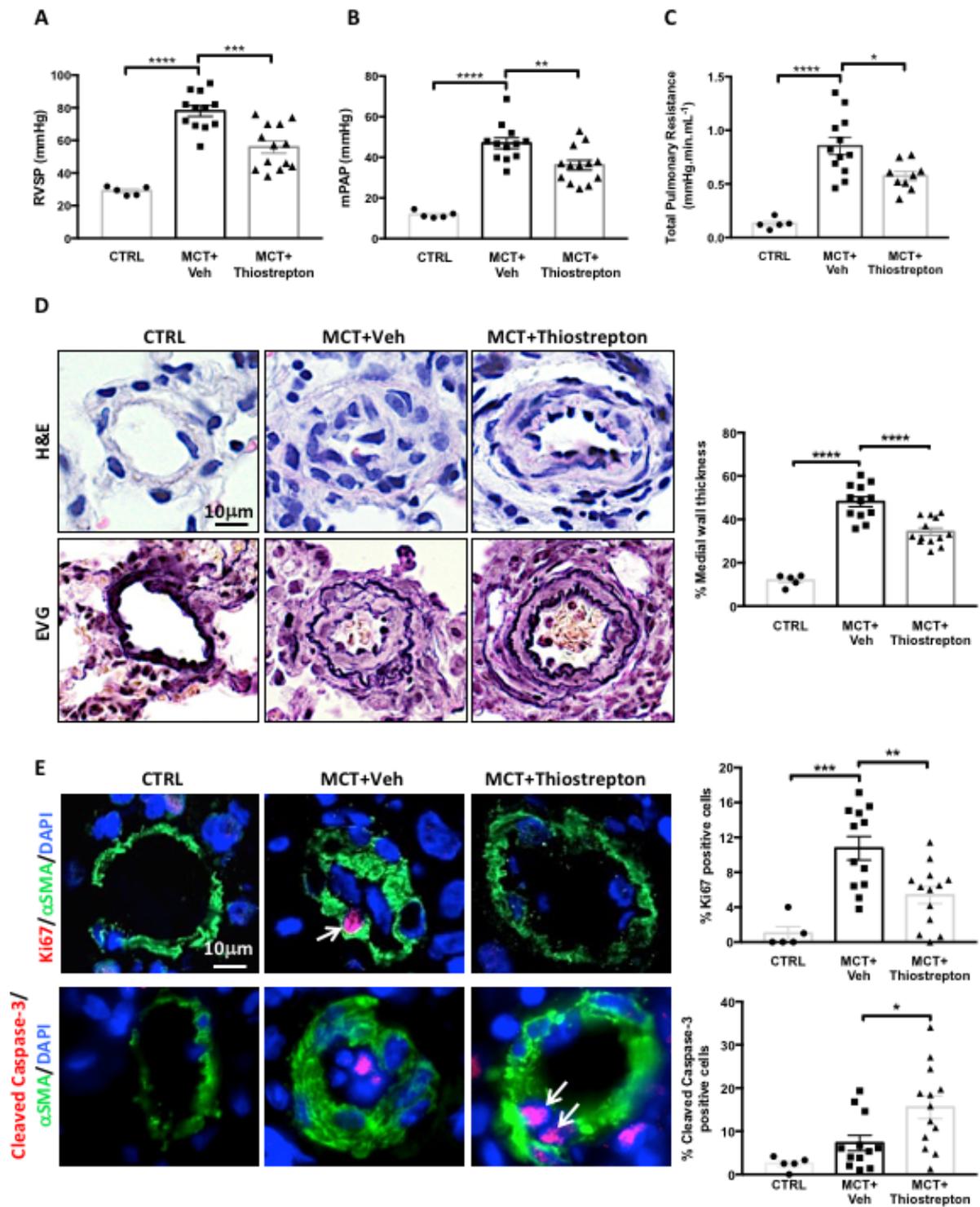


Figure 5. Thiostrepton improves established PAH in the monocrotaline (MCT) rat model.

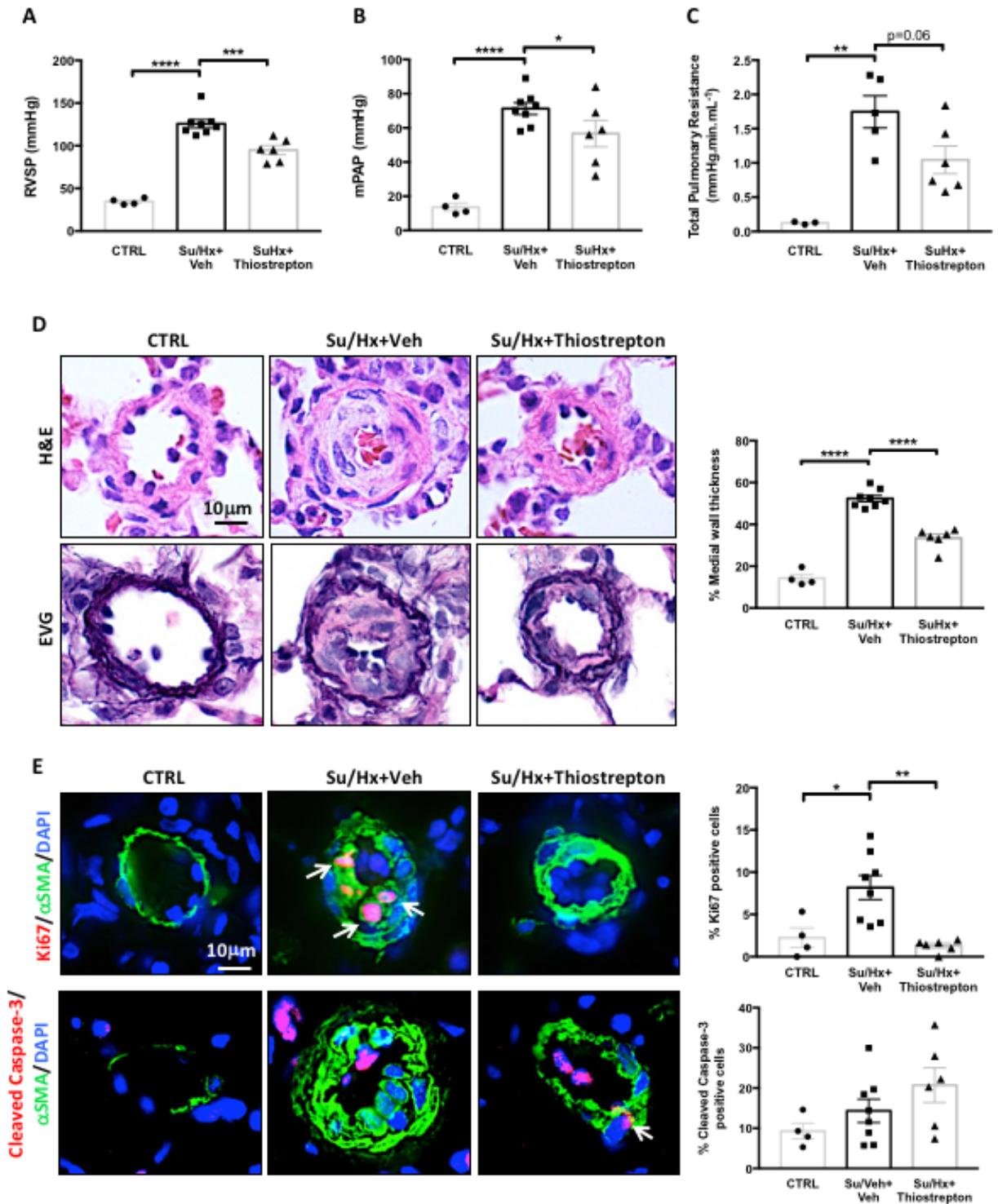


Figure 6. Thiostrepton improves established PAH in the Sugen/hypoxia (Su/Hx) rat model.

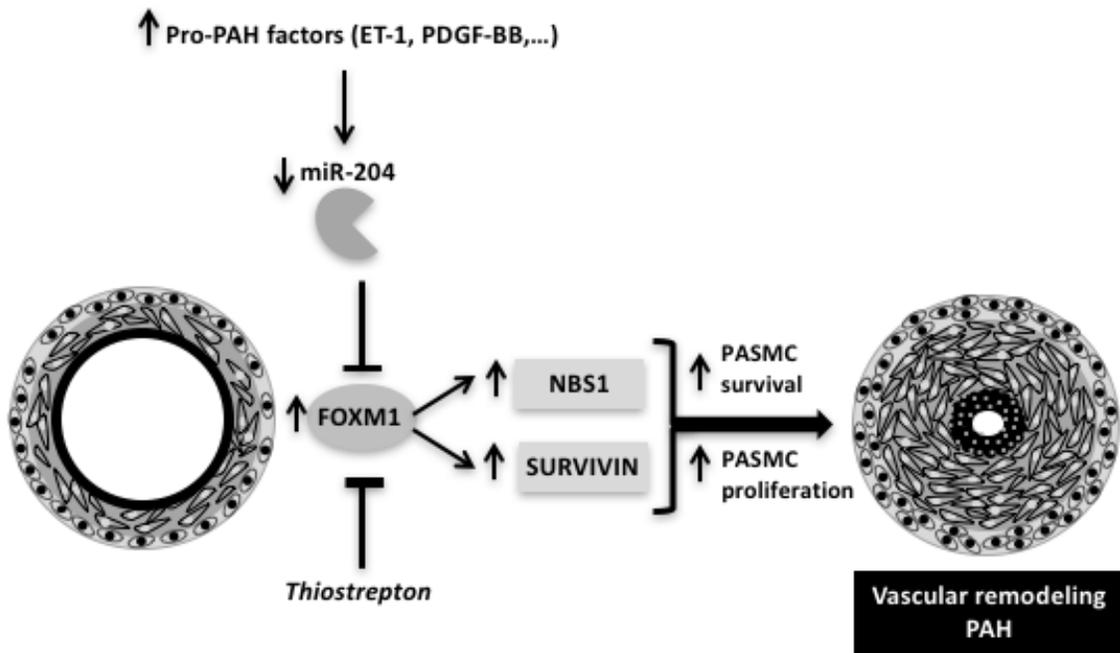


Figure 7. Proposed model depicting the molecular mechanisms by which FOXM1 promotes PASC expansion and vascular remodeling in PAH.

Figure legends

Figure 1. FOXM1 is overexpressed in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from PAH patients and animal models. (A) Double immunofluorescence staining for α SMA (green) and FOXM1 (red) in lungs from control donors (n=5) and PAH patients (n=5). Nuclear staining with DAPI is shown in blue. Increased expression of FOXM1 (nuclear staining, arrows) is detected in PASMCs from remodeled distal PAs. (B) Representative Western blot and corresponding densitometric analyses demonstrating up-regulation of FOXM1 in PAH-PASMCs (n=10) compared to control cells (n=8). (C) Western blot showing that FOXM1 protein levels are unchanged between control (n=3) and isolated PAH-PAECs (n=3). (D) Double immunofluorescence staining for α SMA (green) and FOXM1 (red) showing increased expression of FOXM1 in remodeled distal PAs after monocrotaline (MCT) injury or Sugen-hypoxia (Su/Hx) exposure compared to non-treated rats (n=5 per group). Nuclear staining with DAPI is shown in blue. (E) Western blots and corresponding densitometric analyses of FOXM1 expression in distal PAs of control rats (n = 5 for each model) and rats exposed to either MCT (n=5) or Su/Hx (n=6). (F) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating reduced expression of FOXM1 in PAH-PASMCs (n=4 different cell lines) transfected with miR-204 mimics for 48h. (G) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating increased FOXM1 expression in control PASMCs (n=4 different cell lines) transfected with an antagomiR directed against miR-204 for 48 hours. Protein expression was normalized by Amido black (AB). *P<0.05 and **P<0.01.

Figure 2. Pharmacological and molecular inhibition of FOXM1 reduces PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis. (A) Proliferation (Ki67) was measured in control and PAH-PASMCs grown in 10% FBS after treatment or not with Thiostrepton or vehicle (DMSO), as well as siFOXM1 or siSCRM (50nM) for 48h. (B) Apoptosis was similarly assessed in serum-starved control and PAH-PASMCs following FOXM1 inhibition. *P < 0.05 and **P < 0.01. Experiments were performed in triplicate in at least 3 control and 3 PAH-PASMC cell lines.

Figure 3. Inhibition of FOXM1 impairs DNA repair in PAH-PASMCs. (A) Representative Western blots and corresponding densitometric analysis showing activation of the DNA damage signaling (γ H2AX) as well as increased expression of NBS1 in isolated PAH-PASMCs (n=6-10) compared to control cells (n=9). (B) Analysis based on the Pearson's correlation coefficient indicates the positive correlation between FOXM1 and NBS1 protein expression in isolated PAH-PASMCs. (C) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating that Thiostrepton reduces NBS1 expression in PAH-PASMCs. (D) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating that knockdown of FOXM1 using siFOXM1 reduces NBS1 expression in PAH-PASMCs. (E) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing that Thiostrepton reduces activation of DNA repair signaling in PAH-PASMCs. (F) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing that pharmacological inhibition of the MRN complex using Mirin reduces activation of DNA repair signaling in PAH-PASMCs. Protein expression was normalized by Amido black (AB). *P < 0.05 and **P < 0.01. Experiments were performed in at least 4 different PAH-PASMC cell lines.

Figure 4. Inhibition of FOXM1 in PAH-PASMCs reduces Survivin expression. (A) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing decreased expression of Survivin in PAH-PASMCs (n=4 different cell lines) treated with siFOXM1 (50nM) for 48h. (B) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing reduced Survivin expression levels in PAH-PASMCs (n=4 different cell lines) exposed to Thiostrepton for 48 hours. Protein expression was normalized by Amido black (AB). *P<0.05, ***P<0.001 and ****P<0.0001 (compared to siSCRN or Veh).

Figure 5. Thiostrepton improves established PAH in the monocrotaline (MCT) rat model. (A-C) RVSP (A), mPAP (B), and TPR (C) were measured in control, MCT + Veh, and MCT + Thiostrepton (10mg/kg/d). Thiostrepton significantly reduces hemodynamic parameters. (D) Representative images of perfused, formalin-fixed lung tissues stained with Hematoxylin/eosin (H&E) or Elastica van Gieson (EVG). The morphometric analysis of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness using EVG

stain is shown. Thiostrepton significantly reduces vascular remodeling of distal PAs. (E) Representative images of distal pulmonary vessels labeled with Ki67 (top) and cleaved Caspase-3 (bottom) in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using α SMA (green). Graphs represent the percentage of cells positive for of Ki67 or cleaved Caspase-3 in distal pulmonary vessels; n=5 to 13 rats/group (mean of 20 vessels/rat). Arrows mark positive PSMCs. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Figure 6. Thiostrepton improves established PAH in the Sugeng/hypoxia (Su/Hx) rat model. (A-C) RVSP (A), mPAP (B), and TPR (C) were measured in control, Su/Hx + Veh, and Su/Hx + Thiostrepton (10mg/kg/d). Thiostrepton significantly reduces RVSP and mPAP. (D) Representative images of perfused, formalin-fixed lung tissues stained with Hematoxylin/eosin (H&E) or Elastica van Gieson (EVG). The morphometric analysis of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness using EVG stain is shown. Thiostrepton significantly reduces vascular remodeling of distal PAs. (E) Representative images of distal pulmonary vessels labeled with Ki67 (top) and cleaved Caspase-3 (bottom) in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using α SMA (green). Graphs represent the percentage of cells positive for of Ki67 or cleaved Caspase-3 in distal pulmonary vessels; n=4 to 8 rats/group (mean of 20 vessels/rat). Arrows mark positive PSMCs. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, ****P<0.0001.

Figure 7. Proposed model depicting the molecular mechanisms by which FOXM1 promotes PASM expansion and vascular remodeling in PAH. Pro-PAH factors reduces miR-204 expression in PAH-PASMCS leading to FOXM1 up-regulation. Increased FOXM1 expression in PSMCs stimulates the expression of several factors, including NBS1 and Survivin, enhancing cell proliferation and resistance to apoptosis and thus vascular remodeling in PAH. Inhibition of FOXM1 transcriptional activity using Thiostrepton improved established PAH. ET1, Endothelin 1; NBS1, Nijmegen breakage syndrome 1; PDGF-BB, Platelet derived growth factor-BB.

Electronic supplementary material

FOXM1 Promotes Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Expansion in Pulmonary Arterial Hypertension

Alice Bourgeois¹, Caroline Lambert¹, Karima Habbout¹, Benoit Ranchoux¹, Stéphanie Paquet-Marceau¹, Isabelle Trinh¹, Sandra Breuils-Bonnet¹, Renée Paradis¹, Valérie Nadeau¹, Roxane Paulin^{1,2}, Steeve Provencher^{1,2}, Sébastien Bonnet^{1,2}, Olivier Boucherat^{1,2}

¹Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Québec, QC, Canada.

²Department of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

Supplementary Methods

Quantitative RT-PCR

Total RNA extraction from cultured control and PAH-PASMCs was performed using TRIzol reagent (Invitrogen). cDNA was synthesized with the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) using 200ng of total RNA and random primers. Real time qPCR using primers specific for FOXM1 isoforms a, b, c[1] and d[2] was performed with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and run in triplicate on a CFX384 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). 18S was used as an internal control.

Immunofluorescence studies

Paraffin-embedded lungs were serially sectioned at 5 μ m. For immunofluorescence staining, the deparaffinized lung sections were immersed in 10mM sodium citrate buffer (pH 6.0) and heated in a microwave for 15min. Following antigen retrieval, the sections were blocked with normal goat serum (2%) in PBS for 2h at room temperature. Then, sections were incubated with primary antibodies at 4°C overnight. Mouse monoclonal anti-FOXM1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology, sc-376471), rabbit polyclonal anti-Ki67 (1:400, Millipore, ab9260), rabbit polyclonal anti-cleaved Caspase 3 (1:100, Cell Signaling, #9661), mouse monoclonal anti-alpha smooth muscle actin (α SMA, 1:200, Sigma, A2547), and rabbit polyclonal anti- α SMA (1:200, Abcam, ab5694) were used as primary antibodies. Proteins were detected using appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific). Nuclei were visualized by DAPI staining. Slides were analyzed under Zeiss AxioObserver Z1 inverted microscope equipped with an Apotome.

Protein expression

Proteins were extracted from cell pellets or dissected PAs using a 2% Chaps protein extraction buffer supplemented with a protease-inhibitor cocktail (Roche) and quantified as previously described[3]. Equal amount of proteins was resolved on SDS-polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. Membranes were subsequently blocked with either 5% non-fat dry milk or 10% goat serum in TBS-T buffer, and incubated with primary antibodies in 3% BSA overnight at 4°C. Rinsed 3 times with TBS-T buffer, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 1 hour at

RT in 5% non-fat milk or in 3% BSA. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin–Elmer) and labeled proteins were detected with the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to Amido black as previously described[3]. The following antibodies directed against FOXM1 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, sc-376471), NBS1 (1:1000, Novus Biological, NB100-143SS), Survivin (1:1000, Cell Signaling, #2808), p21 (1:1000, Abcam, ab18206), γ H2AX (1:1000, Abcam, ab26350) and cleaved Caspase-3 (1:1000, Cell Signaling, #9661) were used.

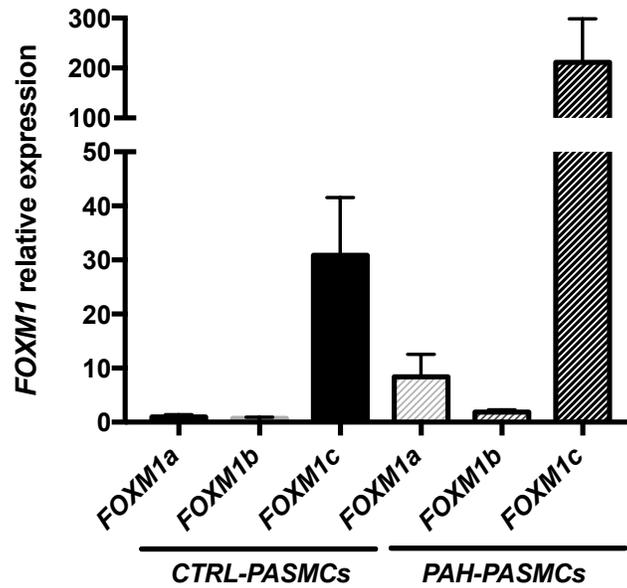
Supplementary Table

	Ctrl (n=9)	PAH (n=11)
Age (years)	40±14	43±16
Gender (male (%))	5 (55,6)	6 (54,5)
PAH group		
- Heritable PAH	-	2 (18,2)
- Idiopathic PAH	-	8 (72,7)
- SSc-PAH	-	1 (9,1)
Autopsy (n (%))	-	1 (9,1)
Transplantation (n (%))	-	10 (90,9)
Fonctionnal class (n (%))		
- I	-	0
- II	-	0
- III	-	3 (27,3)
- IV	-	7 (63,6)
- Unknown	-	1 (9,1)
Pulmonary hemodynamics		
- mPAP (mmHg)	-	63,6±16,36
- CO (L.min ⁻¹)	-	4,7±1,1
- PVR (dyne.sec ⁻¹ .cm ⁻⁵)	-	1013,25±353,24
Medication		
- Endothelin receptor antagonist	-	6
- PDE5 inhibitor	-	6
- Prostacyclin analog	-	3
- Unknown	-	3

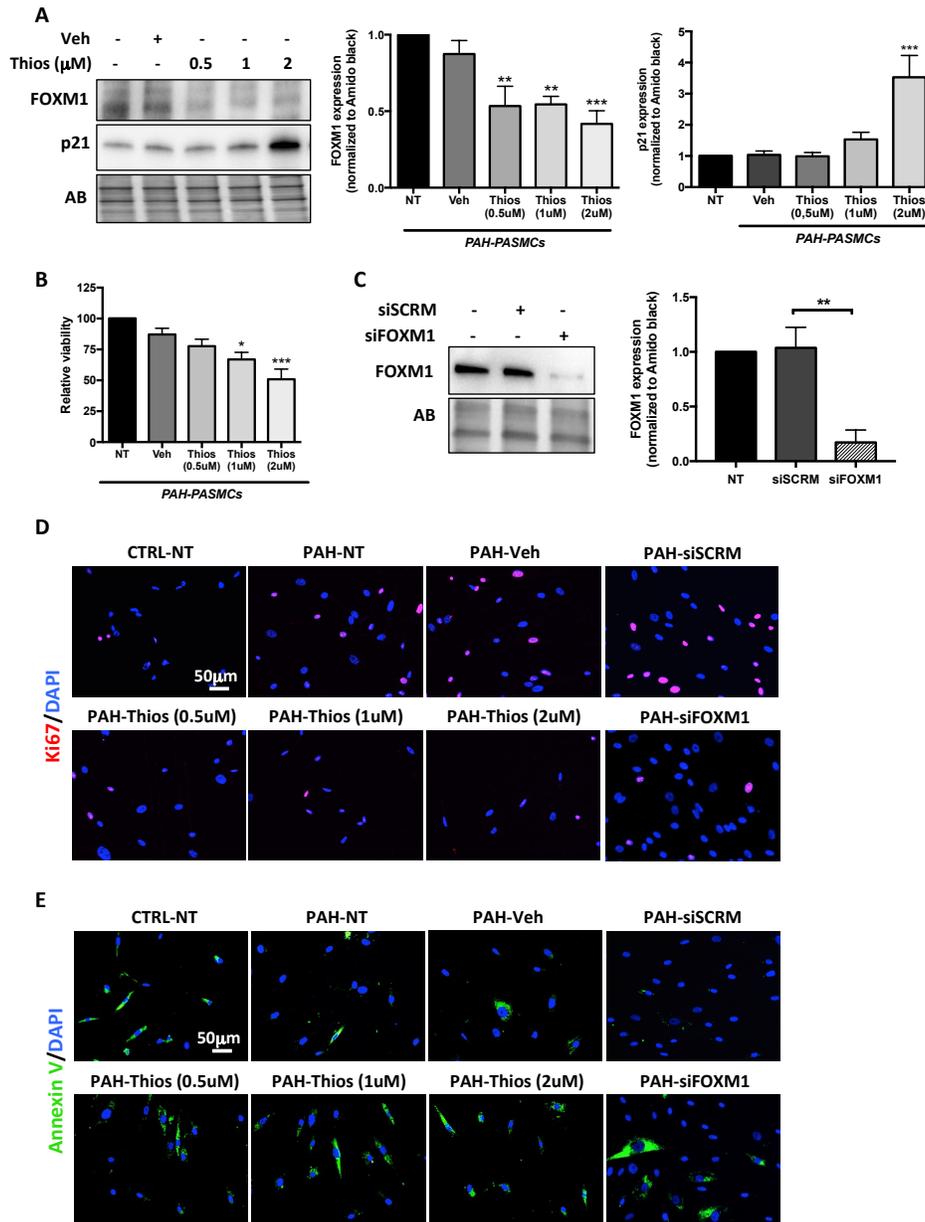
Supplemental Table I. Origin and characteristics of control and PAH-PASMCs.

Values are means ± SD. SSc-PAH : Systemic-Sclerosis-associated PAH ; mPAP: mean pulmonary arterial pressure; CO: cardiac output; PVR: pulmonary vascular resistance; PDE5: phosphodiesterase-5. Please note than some patients take more than one type of medication.

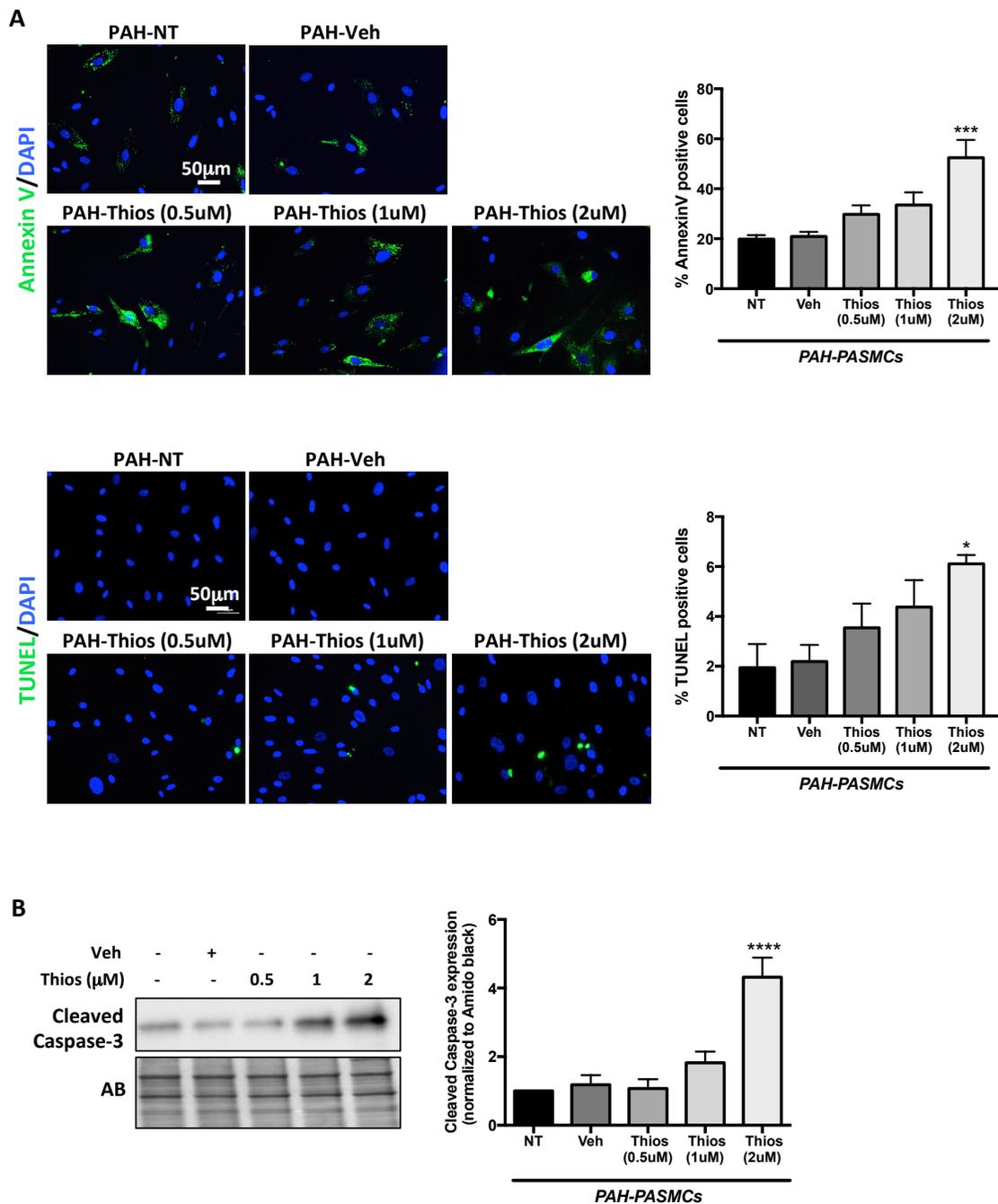
Supplementary Figures



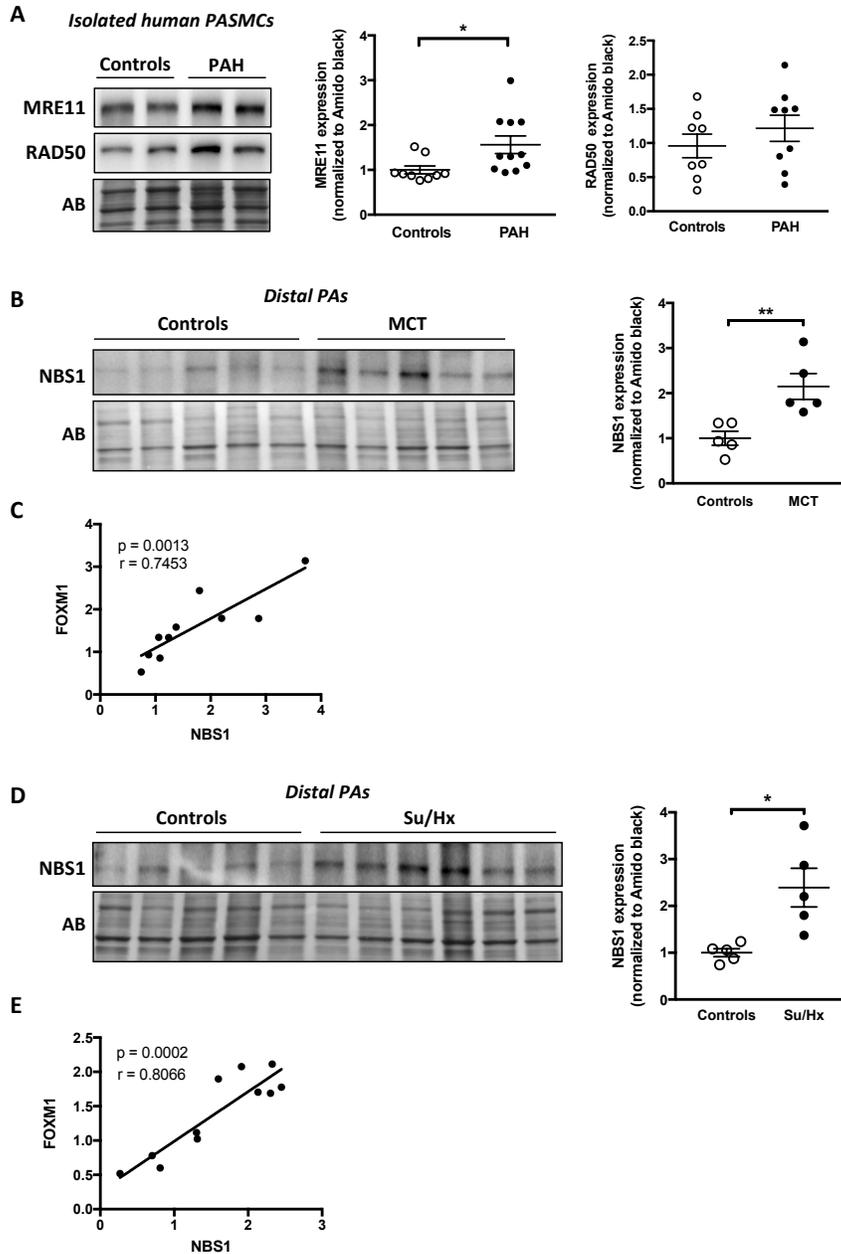
Supplemental Figure 1. Relative expression of *FOXM1a*, *FOXM1b*, *FOXM1c* and *FOXM1d* transcripts isoforms in control and PAH-PASMCs, as determined using qPCR with isoform-specific primers. Only the *FOXM1a*, *b* and *c* were detectable by real-time qPCR. FOXM1a, b and c isoforms are upregulated in PAH-PASMCs (n=6 different cell lines) compared to control cells (n=5 different cell lines). FOXM1c is the major isoform expressed in human PASMCs.



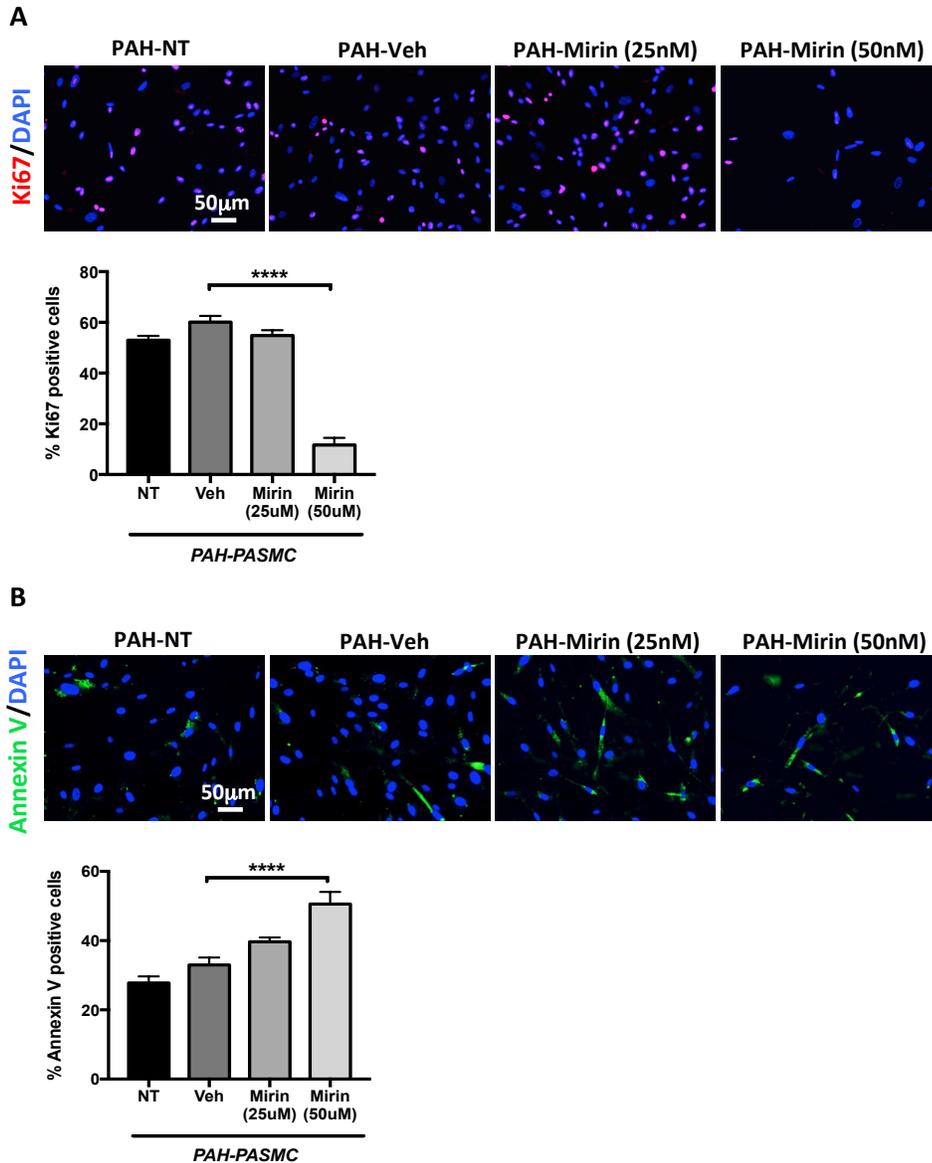
Supplemental Figure 2. Pharmacological and molecular inhibition of FOXM1 reduces PAH-PASMC viability, proliferation and resistance to apoptosis. (A) Representative Western blots and corresponding densitometric analyses demonstrating diminution of FOXM1 expression and upregulation of p21 following ThioStrepton exposure for 48h. (B) PAH-PASMC viability was examined by MTT assay. (C) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing decreased FOXM1 expression in PAH-PASMCs after treatment with siFOXM1 (50nM) for 48 hours. (D) Representative images of control and PAH-PASMCs labeled with Ki67 (proliferation, top panel) and Annexin-V (apoptosis, bottom panel) after treatments with ThioStrepton, siFOXM1 or their respective controls for 48h. Protein expression was normalized by Amido black (AB). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$. Experiments were performed in triplicate in at least 3 control and 3 PAH-PASMC cell lines.



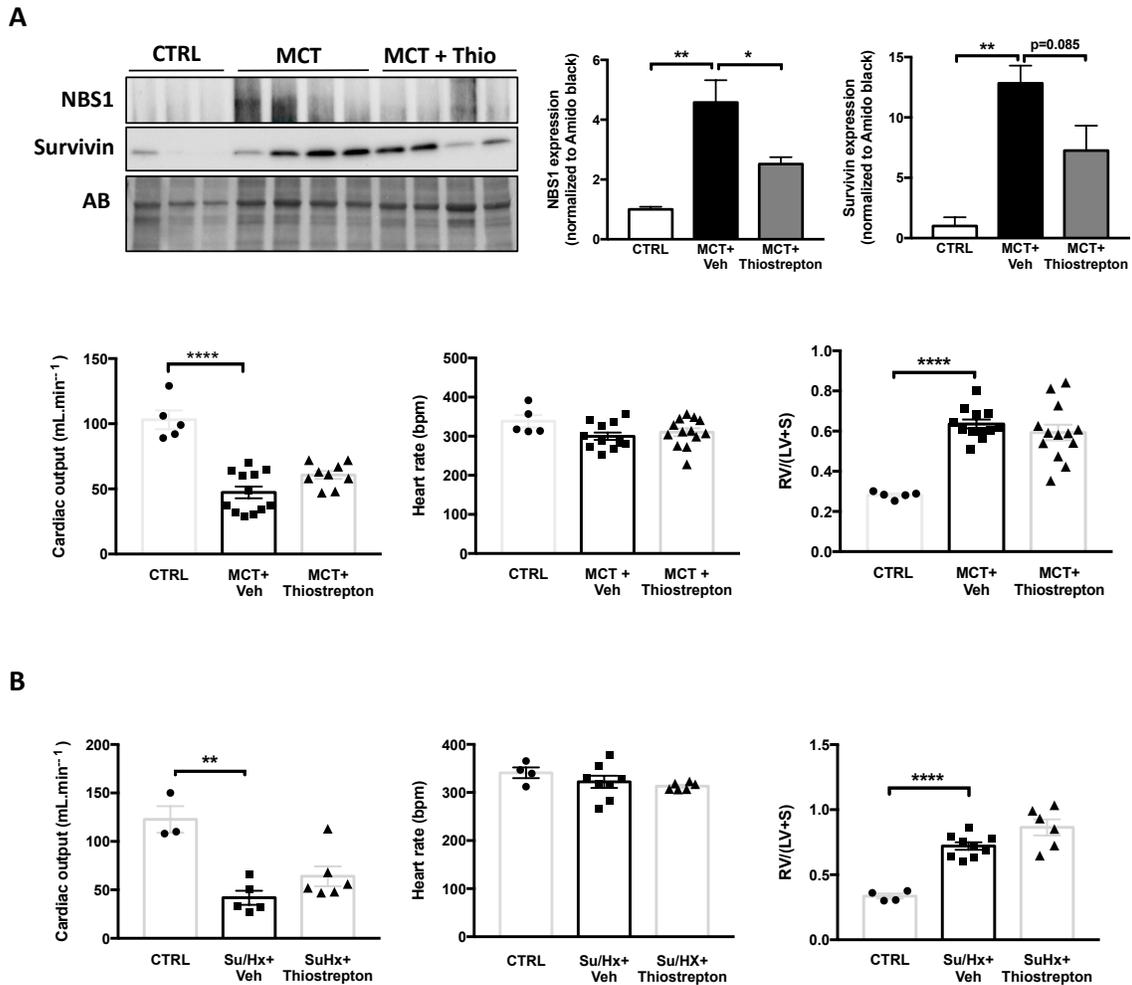
Supplemental Figure 3. Thiostrepton induces PAH-PASMC apoptosis. (A) Apoptosis was measured by Annexin V labeling (A) or TUNEL assay (B) in serum-stimulated (10% FBS) control and PAH-PASMCs treated or not with Thiostrepton or its vehicle (DMSO) for 48 hours. (B) Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing increased expression of cleaved Caspase-3 in PAH-PASMCs treated with Thiostrepton for 48h. Protein expression was normalized by Amido black (AB). ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ and **** $P < 0.0001$. Experiments were performed in 4 different PAH-PASMC cell lines.



Supplemental Figure 4. Expression of NBS1 in animal models of PAH. (A) Representative Western blots and corresponding densitometric analysis showing increased expression of MRE11 in isolated PAH-PASMCs (n=9-11) compared to control cells (n=8-9). No change was observed for RAD50. (B) Western blot and corresponding densitometric analysis showing increased expression of NBS1 in distal PAs from MCT-challenged rats. (B) Analysis based on the Pearson's correlation coefficient indicates the positive correlation between FOXM1 and NBS1 protein expression in distal PAs from control and MCT rats. (C) Western blot and corresponding densitometric analysis showing increased expression of NBS1 in distal PAs from Su/Hx-challenged rats. (D) Analysis based on the Pearson's correlation coefficient indicates the positive correlation between FOXM1 and NBS1 protein expression in distal PAs from control and Su/Hx rats. Protein expression was normalized by Amido black (AB). *P<0.05 and **P<0.01.



Supplemental Figure 5. Pharmacological inhibition of the MRN complex using Mirin reduces PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis. (A) Proliferation (Ki67) was measured in PAH-PASMCs treated or not with Mirin (25 and 50 μ M) or its vehicle (DMSO) for 48h. Representative images and corresponding analysis are shown. Inhibition of the MRN complex reduces PAH-PASMC proliferation. (B) Apoptosis (Annexin V labeling) was measured in serum-starved PAH-PASMCs treated or not with Mirin (25 and 50 μ M) or its vehicle (DMSO) for 48h. Inhibition of the MRN complex decreases PAH-PASMC resistance to apoptosis. ****P<0.0001. Experiments were performed in triplicate in 3 different PAH-PASMC cell lines.



Supplemental Figure 6. *In vivo* effects of Thiostrepton. (A) Effects of Thiostrepton on expression of FOXM1 target genes, cardiac output, heart rate and right ventricular hypertrophy in the MCT rat model. (B) Effects of Thiostrepton on cardiac output, heart rate and right ventricular hypertrophy in the Su/Hx rat model. Protein expression was normalized by Amido black (AB). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and **** $P < 0.0001$.

References

1. Kong X, Li L, Li Z, Le X, Huang C, Jia Z, Cui J, Huang S, Wang L, Xie K (2013) Dysregulated expression of FOXM1 isoforms drives progression of pancreatic cancer. *Cancer Res* 73: 3987-3996. DOI 10.1158/0008-5472.CAN-12-3859
2. Zhang X, Zhang L, Du Y, Zheng H, Zhang P, Sun Y, Wang Y, Chen J, Ding P, Wang N, et al. (2017) A novel FOXM1 isoform, FOXM1D, promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis through ROCKs activation in colorectal cancer. *Oncogene* 36: 807-819. DOI 10.1038/onc.2016.249
3. Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, Lampron MC, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, et al. (2017) HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep* 7: 4546. DOI 10.1038/s41598-017-04874-4

Discussion et conclusion

Discussion

Mes travaux de maîtrise ont permis de montrer que FOXM1 est fortement exprimé dans les PSMCs isolées de patients HTAP comparativement aux individus sains. Cette surexpression est également observée dans les PSMCs de deux modèles précliniques, soit le modèle MCT et Su/Hx. L'inhibition de FOXM1 par le produit naturel thiostrepton ou par inhibition moléculaire à l'aide d'un ARN interférant diminue la prolifération et la résistance à l'apoptose des PSMCs *in vitro*. *In vivo*, l'administration quotidienne de la thiostrepton permet d'améliorer la pathologie dans les modèles MCT et Su/Hx. Nous avons montré que l'amélioration du phénotype est en partie due à la diminution de l'expression de NBS1, membre du complexe MRN impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN, et de l'oncogène Survivin. De ce fait, mes travaux supportent l'importance des mécanismes de réparation des dommages à l'ADN dans l'étiologie de l'HTAP.

FOXM1 a grandement été étudié dans le cas du cancer, une pathologie à prolifération rapide qui partage plusieurs similitudes avec l'HTAP. Il est intéressant de noter que FOXM1 est considéré comme étant l'un des gènes les plus fréquemment surexprimés dans les différents cancers.²⁴⁴ Par contre, ce n'est que plus récemment que FOXM1 a suscité l'intérêt des chercheurs dans le domaine de l'HTAP. Kalinichenko et collaborateur ont d'abord démontré le rôle essentiel de FOXM1 dans la régénération du poumon suivant l'induction de lésions pulmonaires.²⁴⁵ La surexpression d'un transgène de FOXM1 permet d'induire la prolifération de différents types cellulaires dans les poumons dont les CE et les PSMCs. Ces données suggèrent qu'une expression aberrante de FOXM1 favorise la prolifération cellulaire. Peu après la publication de cette étude, Zhao et collaborateurs ont montré que le LPS induit l'expression de FOXM1 dans les poumons et que la déplétion de FOXM1 au niveau des cellules endothéliales vasculaires empêche la régénération de la barrière endothéliale due à une incapacité des CE à proliférer.²²⁸ Bien que l'HTAP comporte une composante inflammatoire importante affectant les cellules endothéliales, nous n'avons pas observé une augmentation de l'expression de FOXM1 dans ce type cellulaire. Ceci pourrait être dû au petit échantillonnage qui était à notre disposition. Suite à notre étude, Dai et collaborateurs ont confirmé dans une étude subséquente que FOXM1 est surexprimé dans les PSMCs des

patients HTAP idiopathique.²⁴⁶ De plus, ils montrent que la délétion inductible de FOXM1 spécifique aux cellules musculaires lisses protège les souris d'une HTAP induite par exposition au Su/Hx. Cependant, une délétion de FOXM1 dans les CE n'a aucun effet, suggérant que l'expression de FOXM1 dans ce type cellulaire ne serait pas directement associée au développement de l'HTAP. Ils ont par-contre montré qu'une variété de facteurs sécrétés par les cellules endothéliales (tels que ET-1, PDGF, CXCL12) favorise la prolifération des PASMCs médiée par FOXM1. Bien que son rôle dans les PASMCs semble bien établi, il pourrait cependant être intéressant de regarder l'expression et le rôle de FOXM1 dans d'autres types cellulaires tels que les fibroblastes ou encore dans les cellules inflammatoires en HTAP. Effectivement, FOXM1 joue un rôle essentiel dans l'activation des fibroblastes pulmonaires en favorisant la différenciation des myofibroblastes, un processus connu pour contribuer au remodelage vasculaire.²⁴⁷ FOXM1 est également essentiel à la migration et au recrutement des macrophages pulmonaires dans le cas du cancer du poumon.²²⁶ Comme les macrophages favorisent l'établissement d'un micro environnement pro-inflammatoire en HTAP, on ne peut exclure la possibilité que l'expression de FOXM1 dans ces cellules contribue également à soutenir l'état d'inflammation chronique.⁷²

Nos études précliniques ont permis de valider que l'inhibition de FOXM1 dans les modèles de rats MCT et Su/Hx améliore la RVSP, la PAPm ainsi que la RVP. Dans les deux modèles, l'amélioration des pressions est associée à une diminution importante du remodelage vasculaire. Il est cependant important de noter qu'on n'observe aucune amélioration significative du débit cardiaque ni de l'hypertrophie du VD (index fulton) (Figure supplémentaire 6). L'absence d'effets sur le VD pourrait être expliqué par une durée de traitement insuffisante. On peut aussi penser que l'absence d'amélioration pourrait être causée par des effets cardio toxiques de la thioestrepton. Cependant, aucune étude n'a rapporté à ce jour un effet potentiellement néfaste de la thioestrepton ni même de l'inhibition de FOXM1 par toute autre méthode. Comme l'expression de FOXM1 est généralement éteinte dans les cellules différenciées telles que les cardiomyocytes, il serait étonnant que ce type cellulaire soit affecté par la thioestrepton dans nos modèles animaux. De plus, bien que FOXM1 soit essentiel au développement cardiaque, son ablation post-natale n'a aucun effet sur l'hypertrophie cardiaque induite par une surcharge de pression suivant une constriction

de l'aorte.^{248,249} Par-contre, il ne faut pas oublier que la thioestrepton est également connue pour inhiber le protéasome.²⁵⁰ Plusieurs études ont rapporté des effets cardio toxiques des inhibiteurs spécifiques au protéasome, suggérant qu'il faut demeurer prudent dans l'interprétation des résultats.^{251–253} Dans une étude subséquente à la nôtre, Dai et collaborateurs se sont intéressés au potentiel thérapeutique de la thioestrepton dans les modèles MCT et Su/Hx.²⁴⁶ Les résultats qu'ils ont obtenus sont très similaires aux nôtres en ce qui concerne l'amélioration de la RVSP, de la PAPm et du remodelage vasculaire. Cependant, ils obtiennent contrairement à nous une amélioration significative du débit cardiaque et une diminution de l'hypertrophie du VD, laissant suggérer que la thioestrepton n'induit pas d'effets néfastes sur le cœur. Cette discordance avec nos résultats pourrait être expliquée par le fait qu'ils ont utilisé une dose plus importante de thioestrepton (20 mg/kg par jour comparativement à celle que nous avons administrée de 10 mg/kg par jour). De plus, leur modèle MCT différait du nôtre. Pour induire la pathologie, ils ont injecté 32 mg/kg de monocrotaline tandis que nous avons utilisé le modèle « classique » avec une injection de 60 mg/kg de monocrotaline. Il a été décrit que l'administration d'une dose plus faible de monocrotaline résulte en une HTAP moins sévère.¹⁹⁴ Celle-ci pourrait être plus facilement réversible ce qui expliquerait les résultats obtenus.

Tel que décrit dans le cancer, nous avons montré que l'augmentation de l'expression de FOXM1 est en partie attribuable à une diminution de l'expression de miR-204, un régulateur impliqué dans le phénotype pro-prolifératif et anti apoptotique des PSMCs HTAP.^{254,167} À l'inverse, rétablir l'expression de miR-204 *in vitro* de même que dans les modèles animaux permet d'améliorer la maladie en ciblant de multiples protéines ayant déjà été impliquées en HTAP telle que BRD4.¹⁶⁷ L'inhibition de BRD4 avec l'Apabetalone fait actuellement l'objet d'une étude clinique pour le traitement de l'HTAP (NCT03655704). Bien que miR-204 semble être une cible thérapeutique intéressante, des études plus approfondies seraient nécessaires avant de pouvoir le cibler comme thérapie pour l'HTAP. Les miRs régulent une multitude de protéines, ce qui complique une intervention ciblée puisque les risques d'affecter diverses voies de signalisation sont très importants. Malgré tout, la première thérapie par micro ARN a récemment été approuvée par la FDA américaine pour le traitement du cancer.²⁵⁵ Les nouvelles thérapies ayant pour cible les microARN seront à surveiller dans

les prochaines années. Puisque FOXM1 est une cible directe de ce micro-ARN, nous avons décidé d'investiguer l'impact d'une diminution de miR-204 sur l'expression de FOXM1.²⁵⁴ L'approche bidirectionnelle à l'aide d'un antagomiR nous a permis de démontrer qu'une diminution de l'expression de miR-204 dans les PASMCs isolées de patients sains augmente l'expression de FOXM1. Inversement, l'utilisation d'un mimic pour miR204 nous a permis de rétablir l'expression de miR-204 dans les PASMCs HTAP, ce qui entraîne une diminution de l'expression de FOXM1. Cette approche bi-directionnelle confirme l'hypothèse que miR204 régule l'expression de FOXM1 en dans les PASMCs HTAP. Avec ces expériences, nous n'avons cependant pas déterminé l'impact de la diminution de miR-204 sur la prolifération et l'apoptose des PASMC CTL, ce qui pourrait être pertinent d'évaluer dans le cadre de futures études. De plus, il serait intéressant de démontrer si les effets sur la prolifération et l'apoptose sont uniquement médiés par FOXM1, sachant que miR-204 cible plusieurs autres protéines connues pour intervenir dans ces processus. Afin de le démontrer, il serait possible d'utiliser un antagomiR pour miR-204 combiné à un ARN interférant pour FOXM1, ce qui nous permettrait de déterminer l'impact direct de la voie miR-204/FOXM1 sur la prolifération et l'apoptose des PASMCs. Dai et collaborateurs ont montré suivant la publication de notre étude que FOXM1 est surexprimé dans les poumons de souris HTAP induites par l'hypoxie, suggérant une implication des facteurs HIFs dans la régulation de l'expression de FOXM1.²⁵⁶ Ce résultat concorde avec une autre étude dans laquelle les auteurs montraient que l'expression de FOXM1 dans les PASMCs est directement induite par HIF-1 et qu'elle est essentielle à la prolifération des PASMCs induite par l'hypoxie.²⁴² Il est également rapporté dans la littérature que FOXO1 et FOXO3 agissent en tant que régulateurs négatifs de FOXM1. FOXO3 favorise plusieurs processus cellulaires tels que l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en plus d'empêcher la transcription de FOXM1.¹³³ FOXO3 est normalement réprimé suite à l'activation de la voie de signalisation PI3K-AKT, connue pour être activées en HTAP.^{257,258} Différents signaux de survie et pro-inflammatoires tels que le PDGF, l'IL-6 et le TNF α favorisent l'exclusion nucléaire et la dégradation de FOXO1 en HTAP, ce qui pourrait contribuer à la surexpression de FOXM1.^{131,133,259}

Le rôle de FOXM1 dans la prolifération cellulaire est connu depuis longtemps. De récentes études ont soulevé son implication potentielle dans la régulation de la réparation des

dommages à l'ADN, un processus récemment impliqué dans l'étiologie de l'HTAP. Nous avons montré une plus grande expression de γ H2AX dans les PSMCs HTAP comparativement aux contrôles, ce qui suggère une plus importante activation des voies de réparation de l'ADN en HTAP. Ces résultats confirment ceux de l'étude menée par Meloche et collaborateurs.¹⁷¹ Nous avons également démontré que FOXM1 régule l'expression de NBS1 dans les PSMCs HTAP. L'inhibition de FOXM1 diminue drastiquement l'expression de NBS1, ce qui est associé également à une diminution de l'expression de γ H2AX. Lorsque l'expression de l'un des trois membres du complexe MRN est réduite, la stabilité du complexe entier est compromise, l'empêchant ainsi de reconnaître les dommages dans une cellule. Une signalisation compromise empêche la cellule de réparer l'ADN lésé, ce qui résulte en une accumulation de dommage, un arrêt de la prolifération et l'entrée en apoptose. On observe les mêmes effets lorsqu'on traite les cellules avec la mirin, un inhibiteur spécifique au complexe MRN, confirmant ainsi les résultats obtenus préalablement. L'inhibition de FOXM1 par la thioestrepton ou à l'aide d'un ARN interférant diminue également l'expression de Survivin *in vitro* et *in vivo*, mettant en évidence un second mécanisme par lequel l'inhibition de FOXM1 favoriserait l'apoptose des PSMCs. La diminution de la prolifération observée suivant l'inhibition de FOXM1 pourrait aussi être due à l'incapacité de FOXM1 de réguler l'expression de nombreux gènes nécessaires à la progression du cycle cellulaire tels que PLK1, CyclinB1, CyclinD1 et plusieurs autres. Il a été montré par Wilson et collaborateurs que l'inhibition de FOXM1 diminue l'expression de ces gènes, réduisant ainsi la prolifération cellulaire.²⁶⁰

Limites de l'étude

L'une des limites de l'étude provient des tissus utilisés lors de nos expérimentations. La plupart des tissus dits « contrôles » proviennent de patients ayant subi une opération de résection tumorale. Bien que ces tissus « sains » soient prélevés en périphérie de la tumeur, on ne peut exclure la possibilité qu'ils soient affectés par la présence de celle-ci. Par-contre, ces patients ne sont pas atteints d'HTAP donc il est juste de dire qu'ils peuvent servir de contrôles pour cette pathologie.

Suite aux expérimentations *in vivo*, nous n'avons pas observé d'amélioration de l'hypertrophie et de la fonction cardiaque malgré la baisse des pressions de l'AP et du VD et de la diminution du remodelage vasculaire. Tel que discuté précédemment, cela pourrait être dû à une durée trop courte des traitements ou encore à l'utilisation d'une dose trop faible de la thiostrepton pour pouvoir observer un effet bénéfique sur le VD. Dai et collaborateurs ont confirmé suite à notre étude que l'utilisation d'une dose plus forte de thiostrepton améliore les fonctions cardiaques, confirmant le potentiel thérapeutique de l'inhibition de FOXM1. Nous n'avons pas non plus investigué l'effet de l'inhibition de FOXM1 dans d'autres types cellulaires ni d'autres organes. FOXM1 est crucial pour l'activation et la différenciation des fibroblastes pulmonaires, processus contribuant au remodelage vasculaire.²⁴⁷ Cette composante n'a pas du tout été investiguée dans notre étude. De plus, l'inhibition de FOXM1 peut affecter les cellules inflammatoires. Les macrophages déficients en FOXM1 ont une capacité de migration diminuée, de même qu'une diminution de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que IL-1 β et IL-6.²²⁶ L'amélioration de l'HTAP pourrait donc être favorisée par une diminution de l'inflammation péri vasculaire, mais cet élément n'a pas été investigué et nécessiterait des études supplémentaires.

Un autre facteur limitant l'initiation d'études cliniques avec les inhibiteurs de FOXM1 est qu'aucun d'entre eux n'a actuellement été approuvé ni testé chez l'humain, et ce toutes disciplines confondues. En HTAP, puisque le phénotype des PASMCs est similaire à celui des cellules cancéreuses, il est possible que l'utilisation de drogues déjà testées ou approuvées dans le cancer pourrait également s'avérer bénéfique pour cette pathologie. L'utilisation de traitements déjà approuvés pour d'autres pathologies procure un énorme avantage dans l'initiation d'études cliniques puisque beaucoup de leur effet et propriétés sont déjà connus. Concernant les inhibiteurs de FOXM1, beaucoup de travail reste à faire dans les prochaines années concernant le développement ou l'identification de nouveaux inhibiteurs spécifiques pouvant être utilisés chez l'humain. Le RVX-208, actuellement en phase clinique 1 pour l'HTAP, diminue *in vitro* et *in vivo* l'expression de FOXM.¹⁵⁷ Même si aucun traitement n'existe actuellement pour le cibler, cibler ces régulateurs en amont de la voie de signalisation pourrait s'avérer être une stratégie thérapeutique efficace.

Conclusion et perspectives

En conclusion, nous avons démontré par cette étude l'importance cruciale de FOXM1 dans l'acquisition et le maintien du phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des PSMCs HTAP. FOXM1 est connu pour réguler plusieurs processus cellulaires impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP tels que la progression du cycle cellulaire, l'inflammation et l'effet Warburg. Ce n'est que récemment que son rôle dans la régulation des dommages à l'ADN a été mis en évidence. Nous avons confirmé dans la présente étude que la régulation de ce processus est d'une importance cruciale dans l'étiologie de l'HTAP et que l'activation des mécanismes de réparation à l'ADN favorise la survie des PSMCs HTAP. De plus, les résultats que nous avons obtenus dans les modèles animaux ont été reproduits par d'autres équipes, validant nos résultats et confirmant le potentiel thérapeutique de FOXM1 en HTAP.^{246,256} Notre étude a ainsi permis de montrer que l'inhibition de FOXM1 présente un réel intérêt en tant que nouvelle cible thérapeutique en HTAP.

En perspective, il serait pertinent d'étudier le rôle de FOXM1 dans d'autres types cellulaires, notamment au niveau des cellules inflammatoires et des fibroblastes pulmonaires puisque ces types cellulaires ont également été impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP. De plus, puisqu'il est connu que l'expression de FOXM1 est induite dans cellules qui prolifèrent de façon active, il serait important d'évaluer les impacts d'une inhibition systémique de FOXM1 sur ces types cellulaires et dans les autres organes.

Nous avons également montré que FOXM1 est surexprimé chez les individus HTAP, mais il existe une importante variabilité d'expression entre les individus, certains ayant même des niveaux d'expression similaires aux patients contrôles. Ceci laisse suggérer que certains individus pourraient être de meilleurs répondeurs aux traitements ciblant FOXM1. Ceci ouvre la porte à développer une médecine personnalisée qui permettrait de discriminer les individus répondeurs des non répondeurs. D'autres études seraient cependant nécessaires afin de valider cette hypothèse.

Bibliographie

1. Stenmark, K. R. *et al.* The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 23–47 (2013).
2. Hoeper, M. M. *et al.* Definitions and Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D42–D50 (2013).
3. Kovacs, G., Berghold, A., Scheidl, S. & Olschewski, H. Pulmonary arterial pressure during rest and exercise in healthy subjects: a systematic review. *Eur. Respir. J.* **34**, 888–894 (2009).
4. Wijeratne, D. T. *et al.* Increasing Incidence and Prevalence of World Health Organization Groups 1 to 4 Pulmonary Hypertension: A Population-Based Cohort Study in Ontario, Canada. *Circ. Cardiovasc. Qual. Outcomes* **11**, (2018).
5. Simonneau, G. *et al.* Clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, S5–S12 (2004).
6. Simonneau, G. *et al.* Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **53**, 1801913 (2019).
7. Valerio, C. J., Schreiber, B. E., Handler, C. E., Denton, C. P. & Coghlan, J. G. Borderline mean pulmonary artery pressure in patients with systemic sclerosis: transpulmonary gradient predicts risk of developing pulmonary hypertension. *Arthritis Rheum.* **65**, 1074–1084 (2013).
8. Hoeper, M. M. & Humbert, M. The new haemodynamic definition of pulmonary hypertension: evidence prevails, finally! *Eur. Respir. J.* **53**, 1900038 (2019).
9. Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S. & Humbert, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* **14**, 603–614 (2017).
10. Benza, R. L. *et al.* An Evaluation of Long-term Survival From Time of Diagnosis in Pulmonary Arterial Hypertension From the REVEAL Registry. *Chest* **142**, 448–456 (2012).
11. Badesch, D. B. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: baseline characteristics from the REVEAL Registry. *Chest* **137**, 376–387 (2010).
12. Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J. & Archer, S. L. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* **j5492** (2018) doi:10.1136/bmj.j5492.
13. Galiè, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **46**, 903 (2015).
14. Authors/Task Force Members *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* **30**, 2493–2537 (2009).
15. Howard, L. S. *et al.* Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: standard operating procedure. *Eur. Respir. Rev.* **21**, 239–248 (2012).

16. Parasuraman, S. *et al.* Assessment of pulmonary artery pressure by echocardiography—A comprehensive review. *IJC Heart Vasc.* **12**, 45–51 (2016).
17. Augustine, D. X. *et al.* Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res. Pract.* **5**, G11–G24 (2018).
18. Leopold, J. A. & Faxon, D. P. Diagnostic Cardiac Catheterization and Coronary Angiography. in *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e* (eds. Jameson, J. L. *et al.*) (McGraw-Hill Education, 2018).
19. Grignola, J. C. Hemodynamic assessment of pulmonary hypertension. *World J. Cardiol.* **3**, 10 (2011).
20. Chemla, D., Lau, E. M. T., Papelier, Y., Attal, P. & Hervé, P. Pulmonary vascular resistance and compliance relationship in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **46**, 1178–1189 (2015).
21. Demir, R. & Kucukoglu, M. S. Six-minute walk test in pulmonary arterial hypertension. *Anadolu Kardiyol. Derg. Anatol. J. Cardiol.* **15**, 249–254 (2015).
22. Miyamoto, S. *et al.* Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **161**, 487–492 (2000).
23. Klinger, J. R. *et al.* Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension in Adults. *Chest* **155**, 565–586 (2019).
24. Carvajal, J. A., Germain, A. M., Huidobro-Toro, J. P. & Weiner, C. P. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J. Cell. Physiol.* **184**, 409–420 (2000).
25. Roberts, J. D. *et al.* Inhaled Nitric Oxide and Persistent Pulmonary Hypertension of the Newborn. *N. Engl. J. Med.* **336**, 605–610 (1997).
26. Rubin, L. J. PULMONARY HYPERTENSION. in *Hurst's The Heart, 14e* (eds. Fuster, V., Harrington, R. A., Narula, J. & Eapen, Z. J.) (McGraw-Hill Education, 2017).
27. Chester, A. H., Yacoub, M. H. & Moncada, S. Nitric oxide and pulmonary arterial hypertension. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2017**, (2017).
28. Rybalkin, S. D., Yan, C., Bornfeldt, K. E. & Beavo, J. A. Cyclic GMP Phosphodiesterases and Regulation of Smooth Muscle Function. *Circ. Res.* **93**, 280–291 (2003).
29. Duarte, J. D., Hanson, R. L. & Machado, R. F. Pharmacologic treatments for pulmonary hypertension: exploring pharmacogenomics. *Future Cardiol.* **9**, 335–349 (2013).
30. Grimminger, F. *et al.* First acute haemodynamic study of soluble guanylate cyclase stimulator riociguat in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **33**, 785–792 (2009).
31. Ghofrani, H.-A. *et al.* Riociguat for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 330–340 (2013).
32. Gombert-Maitland, M. & Olschewski, H. Prostacyclin therapies for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **31**, 891–901 (2008).

33. Mitchell, J. A., Ali, F., Bailey, L., Moreno, L. & Harrington, L. S. Role of nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones released by the endothelium: Nitric oxide and prostacyclin as vasoactive hormones. *Exp. Physiol.* **93**, 141–147 (2008).
34. Christman, B. W. *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **327**, 70–75 (1992).
35. *Drugs for Pulmonary Arterial Hypertension — Project Protocol.* (Canadian Agency for Drugs and Technologies in Health, 2014).
36. Sitbon, O. *et al.* Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2522–2533 (2015).
37. Chester, A. H. & Yacoub, M. H. The role of endothelin-1 in pulmonary arterial hypertension. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2014**, 29 (2014).
38. Giaid, A. *et al.* Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1732–1739 (1993).
39. Galie, N. The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc. Res.* **61**, 227–237 (2004).
40. Verhaar, M. C. *et al.* Endothelin-A receptor antagonist-mediated vasodilatation is attenuated by inhibition of nitric oxide synthesis and by endothelin-B receptor blockade. *Circulation* **97**, 752–756 (1998).
41. Rubin, L. J. *et al.* Bosentan Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **346**, 896–903 (2002).
42. Waxman, A. B. & Loscalzo, J. Pulmonary Hypertension. in *Harrison's Principles of Internal Medicine, 20e* (eds. Jameson, J. L. *et al.*) (McGraw-Hill Education, 2018).
43. Hoeper, M. M. *et al.* Targeted therapy of pulmonary arterial hypertension: Updated recommendations from the Cologne Consensus Conference 2018. *Int. J. Cardiol.* **272**, 37–45 (2018).
44. Mehta, S. *et al.* Macitentan Improves Health-Related Quality of Life for Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **151**, 106–118 (2017).
45. Sitbon, O. *et al.* Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **111**, 3105–3111 (2005).
46. McLaughlin, V. V. *et al.* ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **53**, 1573–1619 (2009).
47. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **109**, 159–165 (2004).
48. Soubrier, F. *et al.* Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D13–D21 (2013).
49. Machado, R. D. *et al.* Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, S32–S42 (2009).
50. Newman, J. H. *et al.* Mutation in the gene for bone morphogenetic protein receptor II as a cause of primary pulmonary hypertension in a large kindred. *N. Engl. J. Med.* **345**, 319–324 (2001).

51. Evans, J. D. W. *et al.* BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 129–137 (2016).
52. Hautefort, A. *et al.* *Bmpr2* Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **139**, 932–948 (2019).
53. Tian, W. *et al.* Phenotypically Silent Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 Mutations Predispose Rats to Inflammation-Induced Pulmonary Arterial Hypertension by Enhancing the Risk for Neointimal Transformation. *Circulation* **140**, 1409–1425 (2019).
54. Frump, A., Prewitt, A. & de Caestecker, M. P. BMPR2 mutations and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension (2017 Grover Conference Series). *Pulm. Circ.* **8**, 204589401876584 (2018).
55. Hopper, R. K. *et al.* In Pulmonary Arterial Hypertension, Reduced BMPR2 Promotes Endothelial-to-Mesenchymal Transition via HMGA1 and Its Target Slug. *Circulation* **133**, 1783–1794 (2016).
56. Girerd, B. *et al.* Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 851–861 (2010).
57. Garcia-Rivas, G., Jerjes-Sánchez, C., Rodriguez, D., Garcia-Pelaez, J. & Trevino, V. A systematic review of genetic mutations in pulmonary arterial hypertension. *BMC Med. Genet.* **18**, 82 (2017).
58. Antigny, F. *et al.* Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **133**, 1371 (2016).
59. Sakao, S. *et al.* Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* **19**, 1178–1180 (2005).
60. Klinger, J. R., Abman, S. H. & Gladwin, M. T. Nitric oxide deficiency and endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **188**, 639–646 (2013).
61. Taraseviciene-Stewart, L. *et al.* Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **15**, 427–438 (2001).
62. Michelakis, E. D. Spatio-Temporal Diversity of Apoptosis Within the Vascular Wall in Pulmonary Arterial Hypertension: Heterogeneous BMP Signaling May Have Therapeutic Implications. *Circ. Res.* **98**, 172–175 (2006).
63. Pietra, G. G. *et al.* Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* **80**, 1198–1206 (1989).

64. Yeager, M. E., Halley, G. R., Golpon, H. A., Voelkel, N. F. & Tuder, R. M. Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **88**, E2–E11 (2001).
65. Jonigk, D. *et al.* Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Pathol.* **179**, 167–179 (2011).
66. Cool, C. D. *et al.* Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am. J. Pathol.* **155**, 411–419 (1999).
67. Fishman, A. P. Changing concepts of the pulmonary plexiform lesion. *Physiol. Res.* **49**, 485–492 (2000).
68. Arciniegas, E., Frid, M. G., Douglas, I. S. & Stenmark, K. R. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, L1–L8 (2007).
69. Frid, M. G., Kale, V. A. & Stenmark, K. R. Mature Vascular Endothelium Can Give Rise to Smooth Muscle Cells via Endothelial-Mesenchymal Transdifferentiation: In Vitro Analysis. *Circ. Res.* **90**, 1189–1196 (2002).
70. Ranchoux, B. *et al.* Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **131**, 1006–1018 (2015).
71. Reynolds, A. M., Holmes, M. D., Danilov, S. M. & Reynolds, P. N. Targeted gene delivery of BMPR2 attenuates pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **39**, 329–343 (2012).
72. Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M. & Nicolls, M. R. Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* **115**, 165–175 (2014).
73. Price, L. C. *et al.* Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **141**, 210–221 (2012).
74. Perros, F. *et al.* Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **29**, 462–468 (2007).
75. Savai, R. *et al.* Immune and Inflammatory Cell Involvement in the Pathology of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 897–908 (2012).
76. Tamby, M. C. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* **60**, 765–772 (2005).
77. Soon, E. *et al.* Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **122**, 920–927 (2010).
78. Good, R. B. *et al.* Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Pathol.* **185**, 1850–1858 (2015).

79. Sánchez-Duffhues, G. *et al.* Inflammation induces endothelial-to-mesenchymal transition and promotes vascular calcification through downregulation of BMPR2: Endothelial cells and vascular calcification. *J. Pathol.* **247**, 333–346 (2019).
80. Steiner, M. K. *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **104**, 236–244, 28p following 244 (2009).
81. Tamura, Y. *et al.* Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **128**, 1956–1970 (2018).
82. Pullamsetti, S. S., Seeger, W. & Savai, R. Classical IL-6 signaling: a promising therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **128**, 1720–1723 (2018).
83. Hernández-Sánchez, J. *et al.* Clinical trial protocol for TRANSFORM-UK: A therapeutic open-label study of tocilizumab in the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **8**, 2045893217735820 (2018).
84. Perros, F. *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 81–88 (2008).
85. Yu, Y. *et al.* PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **284**, C316-330 (2003).
86. Xiao, Y. *et al.* PDGF Promotes the Warburg Effect in Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells via Activation of the PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 α Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **42**, 1603–1613 (2017).
87. Schermuly, R. T. *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* **115**, 2811–2821 (2005).
88. Ghofrani, H. A., Seeger, W. & Grimminger, F. Imatinib for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **353**, 1412–1413 (2005).
89. Ghofrani, H. A. *et al.* Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 1171–1177 (2010).
90. Hoepfer, M. M. *et al.* Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* **127**, 1128–1138 (2013).
91. Frost, A. E. *et al.* Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J. Heart Lung Transplant. Off. Publ. Int. Soc. Heart Transplant.* **34**, 1366–1375 (2015).
92. Voelkel, N. F. & Gomez-Arroyo, J. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Arterial Hypertension. The Angiogenesis Paradox. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **51**, 474–484 (2014).
93. Voelkel, N. F., Vandivier, R. W. & Tuder, R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, L209-221 (2006).
94. Weiss, A. & Attisano, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **2**, 47–63 (2013).

95. Rol, N., Kurakula, K. B., Happé, C., Bogaard, H. J. & Goumans, M.-J. TGF- β and BMPR2 Signaling in PAH: Two Black Sheep in One Family. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
96. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science* **123**, 309–314 (1956).
97. Chan, S. Y. & Rubin, L. J. Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: from basic science to clinical practice. *Eur. Respir. Rev.* **26**, 170094 (2017).
98. Xu, W. *et al.* Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 1342–1347 (2007).
99. *Molecular biology of the cell.* (Garland Science, 2002).
100. Vander Heiden, M. G., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**, 1029–1033 (2009).
101. Tuder, R. M., Davis, L. A. & Graham, B. B. Targeting Energetic Metabolism: A New Frontier in the Pathogenesis and Treatment of Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 260–266 (2012).
102. Cottrill, K. A. & Chan, S. Y. Metabolic dysfunction in pulmonary hypertension: the expanding relevance of the Warburg effect. *Eur. J. Clin. Invest.* **43**, 855–865 (2013).
103. McMurtry, M. S. *et al.* Dichloroacetate Prevents and Reverses Pulmonary Hypertension by Inducing Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Apoptosis. *Circ. Res.* **95**, 830–840 (2004).
104. Michelakis, E. D. *et al.* Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients. *Sci. Transl. Med.* **9**, eaa04583 (2017).
105. Bonnet, S. *et al.* An Abnormal Mitochondrial–Hypoxia Inducible Factor-1 α –Kv Channel Pathway Disrupts Oxygen Sensing and Triggers Pulmonary Arterial Hypertension in Fawn Hooded Rats: Similarities to Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **113**, 2630–2641 (2006).
106. Rafikov, R. *et al.* Complex I dysfunction underlies the glycolytic switch in pulmonary hypertensive smooth muscle cells. *Redox Biol.* **6**, 278–286 (2015).
107. Paulin, R. & Michelakis, E. D. The Metabolic Theory of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* **115**, 148–164 (2014).
108. Marshall, J. D., Bazan, I., Zhang, Y., Fares, W. H. & Lee, P. J. Mitochondrial dysfunction and pulmonary hypertension: cause, effect, or both. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **314**, L782–L796 (2018).
109. Randle, P. J. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes. Metab. Rev.* **14**, 263–283 (1998).
110. Sutendra, G. *et al.* Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci. Transl. Med.* **2**, 44ra58 (2010).
111. Sitbon, O. *et al.* Clinical trial design and new therapies for pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **53**, (2019).
112. Levy, D. E. & Lee, C. What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* **109**, 1143–1148 (2002).
113. Darnell, J. E. STATs and gene regulation. *Science* **277**, 1630–1635 (1997).

114. Paulin, R. *et al.* Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **123**, 1205–1215 (2011).
115. Paulin, R., Meloche, J. & Bonnet, S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAK-STAT* **1**, 223–233 (2012).
116. Paulin, R. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H1798-1809 (2011).
117. Bonnet, S. *et al.* The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11418–11423 (2007).
118. Spiekerkoetter, E. *et al.* Randomised placebo-controlled safety and tolerability trial of FK506 (tacrolimus) for pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **50**, (2017).
119. Veith, C., Schermuly, R. T., Brandes, R. P. & Weissmann, N. Molecular mechanisms of hypoxia-inducible factor-induced pulmonary arterial smooth muscle cell alterations in pulmonary hypertension. *J. Physiol.* **594**, 1167–1177 (2016).
120. Shimoda, L. A., Yun, X. & Sikka, G. Revisiting the role of hypoxia-inducible factors in pulmonary hypertension. *Curr. Opin. Physiol.* **7**, 33–40 (2019).
121. Fijalkowska, I. *et al.* Hypoxia inducible-factor1alpha regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *Am. J. Pathol.* **176**, 1130–1138 (2010).
122. Barnes, E. A., Chen, C.-H., Sedan, O. & Cornfield, D. N. Loss of smooth muscle cell hypoxia inducible factor-1 α underlies increased vascular contractility in pulmonary hypertension. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 650–662 (2017).
123. Schultz, K., Fanburg, B. L. & Beasley, D. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1alpha promote growth factor-induced proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **290**, H2528-2534 (2006).
124. Pisarcik, S. *et al.* Activation of hypoxia-inducible factor-1 in pulmonary arterial smooth muscle cells by endothelin-1. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **304**, L549–L561 (2013).
125. Yu, A. Y. *et al.* Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1alpha. *J. Clin. Invest.* **103**, 691–696 (1999).
126. Ball, M. K. *et al.* Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 α . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 314–324 (2014).
127. Abud, E. M. *et al.* Digoxin inhibits development of hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1239–1244 (2012).
128. Hu, C.-J. *et al.* Suppression of HIF2 signalling attenuates the initiation of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* 1900378 (2019)
doi:10.1183/13993003.00378-2019.

129. Skuli, N. *et al.* Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* **114**, 469–477 (2009).
130. Stenmark, K. R., Hu, C.-J. & Pullamsetti, S. S. How Many FOXs Are There on The Road to Pulmonary Hypertension? *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 704–707 (2018).
131. Savai, R. *et al.* Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* **20**, 1289–1300 (2014).
132. Feng, W. *et al.* Paclitaxel alleviates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension via inhibition of FoxO1-mediated autophagy. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **392**, 605–613 (2019).
133. Lam, E. W.-F., Brosens, J. J., Gomes, A. R. & Koo, C.-Y. Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 482–495 (2013).
134. McMurtry, M. S. *et al.* Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **115**, 1479–1491 (2005).
135. Li, G. *et al.* The expression of survivin in irreversible pulmonary arterial hypertension rats and its value in evaluating the reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *Pulm. Circ.* **9**, 2045894019859480 (2019).
136. Li, X. *et al.* Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* **15**, 1289–1297 (2009).
137. Jin, S. *et al.* Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor-beta expression in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **102**, 1483–1491 (2008).
138. Morris, H. E., Neves, K. B., Montezano, A. C., MacLean, M. R. & Touyz, R. M. Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Clin. Sci. Lond. Engl. 1979* **133**, 2481–2498 (2019).
139. Vanderpool, R. R., Tang, H., Rischard, F. & Yuan, J. X.-J. Is p38 MAPK a Dark Force in Right Ventricular Hypertrophy and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension? *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **57**, 506–508 (2017).
140. Wilson, J. L., Yu, J., Taylor, L. & Polgar, P. Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLoS One* **10**, e0123662 (2015).
141. Church, A. C. *et al.* The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **309**, L333-347 (2015).
142. Kojonazarov, B. *et al.* p38 MAPK Inhibition Improves Heart Function in Pressure-Loaded Right Ventricular Hypertrophy. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **57**, 603–614 (2017).
143. Montani, D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* **125**, 2128–2137 (2012).

144. Yi, E. S. *et al.* Distribution of obstructive intimal lesions and their cellular phenotypes in chronic pulmonary hypertension. A morphometric and immunohistochemical study. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**, 1577–1586 (2000).
145. Stenmark, K. R., Gerasimovskaya, E., Nemenoff, R. A. & Das, M. Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* **122**, 326S-334S (2002).
146. Short, M., Nemenoff, R. A., Zawada, W. M., Stenmark, K. R. & Das, M. Hypoxia induces differentiation of pulmonary artery adventitial fibroblasts into myofibroblasts. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* **286**, C416–C425 (2004).
147. Stenmark, K. R. *et al.* Targeting the Adventitial Microenvironment in Pulmonary Hypertension: A Potential Approach to Therapy that Considers Epigenetic Change. *Pulm. Circ.* **2**, 3–14 (2012).
148. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. & Jones, P. A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* **429**, 457–463 (2004).
149. Gamen, E., Seeger, W. & Pullamsetti, S. S. The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **48**, 903–917 (2016).
150. Luna, R. C. P. *et al.* Insights on the epigenetic mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Medicas E Biol.* **51**, e7437 (2018).
151. Moore, L. D., Le, T. & Fan, G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* **38**, 23–38 (2013).
152. Archer, S. L. *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* **121**, 2661–2671 (2010).
153. Liu, D. *et al.* Hypermethylation of BMPR2 Promoter Occurs in Patients with Heritable Pulmonary Arterial Hypertension and Inhibits BMPR2 Expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **196**, 925–928 (2017).
154. Potus, F. *et al.* Novel Mutations and Decreased Expression of the Epigenetic Regulator *TET2* in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **141**, 1986–2000 (2020).
155. Fujisawa, T. & Filippakopoulos, P. Functions of bromodomain-containing proteins and their roles in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 246–262 (2017).
156. Meloche, J. *et al.* Bromodomain-Containing Protein 4 - The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ. Res.* **117**, 525 (2015).
157. Van der Feen, D. E. *et al.* Multicenter Preclinical Validation of BET Inhibition for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, 910–920 (2019).
158. Zhao, L. *et al.* Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation* **126**, 455–467 (2012).

159. Li, M. *et al.* Emergence of Fibroblasts with a Proinflammatory Epigenetically Altered Phenotype in Severe Hypoxic Pulmonary Hypertension. *J. Immunol.* **187**, 2711–2722 (2011).
160. Chen, F. *et al.* Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 167–178 (2016).
161. Bogaard, H. J. *et al.* Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **183**, 1402–1410 (2011).
162. De Raaf, M. A. *et al.* Histone deacetylase inhibition with trichostatin A does not reverse severe angioproliferative pulmonary hypertension in rats (2013 Grover Conference series). *Pulm. Circ.* **4**, 237–243 (2014).
163. Boucherat, O. *et al.* HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci. Rep.* **7**, 4546 (2017).
164. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **87**, 3–14 (2015).
165. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. & Sonenberg, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* **9**, 102–114 (2008).
166. Boucherat, O., Potus, F. & Bonnet, S. microRNA and Pulmonary Hypertension. *Adv. Exp. Med. Biol.* **888**, 237–252 (2015).
167. Courboulin, A. *et al.* Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* **208**, 535–548 (2011).
168. Potus, F., Graydon, C., Provencher, S. & Bonnet, S. Vascular Remodeling Process in Pulmonary Arterial Hypertension, with Focus on miR-204 and miR-126 (2013 Grover Conference Series). *Pulm. Circ.* **4**, 175–184 (2014).
169. Ruffenach, G. *et al.* Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **194**, 1273–1285 (2016).
170. Meloche, J. *et al.* miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **309**, C363–372 (2015).
171. Meloche, J. *et al.* Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **129**, 786 (2014).
172. Bienertova-Vasku, J., Novak, J. & Vasku, A. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension: pathogenesis, diagnosis and treatment. *J. Am. Soc. Hypertens. JASH* **9**, 221–234 (2015).
173. Wang, Y. *et al.* Epigenetic Regulation and Its Therapeutic Potential in Pulmonary Hypertension. *Front. Pharmacol.* **9**, 241 (2018).
174. White, K., Loscalzo, J. & Chan, S. Y. Holding our breath: The emerging and anticipated roles of microRNA in pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **2**, 278–290 (2012).

175. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
176. Jin, Q. *et al.* Long noncoding RNAs: emerging roles in pulmonary hypertension. *Heart Fail. Rev.* (2019) doi:10.1007/s10741-019-09866-2.
177. Wang, D. *et al.* Long non-coding RNA MALAT1 sponges miR-124-3p.1/KLF5 to promote pulmonary vascular remodeling and cell cycle progression of pulmonary artery hypertension. *Int. J. Mol. Med.* **44**, 871–884 (2019).
178. Courboulin, A. *et al.* Krüppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* **12**, 128 (2011).
179. Xiang, Y., Zhang, Y., Tang, Y. & Li, Q. MALAT1 Modulates TGF- β 1-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition through Downregulation of miR-145. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **42**, 357–372 (2017).
180. Omura, J. *et al.* Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* CIRCULATIONAHA.120.047626 (2020) doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.120.047626.
181. Sancar, A., Lindsey-Boltz, L. A., Ünsal-Kaçmaz, K. & Linn, S. Molecular Mechanisms of Mammalian DNA Repair and the DNA Damage Checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* **73**, 39–85 (2004).
182. Deriano, L. & Roth, D. B. Modernizing the nonhomologous end-joining repertoire: alternative and classical NHEJ share the stage. *Annu. Rev. Genet.* **47**, 433–455 (2013).
183. Lieber, M. R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 181–211 (2010).
184. Simsek, D. & Jasin, M. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 410–416 (2010).
185. Dueva, R. & Iliakis, G. Alternative pathways of non-homologous end joining (NHEJ) in genomic instability and cancer. *Transl. Cancer Res. Vol 2 No 3 June 2013 Transl. Cancer Res. DNA Damage Repair* (2013).
186. Lee, J.-H. & Paull, T. T. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex. *Science* **304**, 93–96 (2004).
187. Lamarche, B. J., Orazio, N. I. & Weitzman, M. D. The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance. *FEBS Lett.* **584**, 3682–3695 (2010).
188. Li, M. *et al.* Loss of bone morphogenetic protein receptor 2 is associated with abnormal DNA repair in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 1118–1128 (2014).
189. Wu, J., Lu, L.-Y. & Yu, X. The role of BRCA1 in DNA damage response. *Protein Cell* **1**, 117–123 (2010).

190. de Jesus Perez, V. A. *et al.* Whole-exome sequencing reveals TopBP1 as a novel gene in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1260–1272 (2014).
191. Ryan, J., Bloch, K. & Archer, S. L. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation’s categorisation of human PH: Experimental models of pulmonary hypertension. *Int. J. Clin. Pract.* **65**, 15–34 (2011).
192. Sztuka, K. & Jasińska-Stroschein, M. Animal models of pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of data from 6126 animals. *Pharmacol. Res.* **125**, 201–214 (2017).
193. Gomez-Arroyo, J. *et al.* A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L977-991 (2012).
194. Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R. & Henriques-Coelho, T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **35**, 8–16 (2015).
195. Kay, J. M., Harris, P. & Heath, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **22**, 176–179 (1967).
196. Rosenberg, H. C. & Rabinovitch, M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.* **255**, H1484-1491 (1988).
197. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, L1013–L1032 (2009).
198. Bhargava, A., Kumar, A., Yuan, N., Gewitz, M. H. & Mathew, R. Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs. *Heart Dis. Hagerstown Md* **1**, 126–132 (1999).
199. Gomez-Arroyo, J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L363–L369 (2012).
200. Okada, K. *et al.* Pulmonary hemodynamics modify the rat pulmonary artery response to injury. A neointimal model of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* **151**, 1019–1025 (1997).
201. van Albada, M. E. *et al.* The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **26**, 487–493 (2005).
202. Abe, K. *et al.* Formation of Plexiform Lesions in Experimental Severe Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **121**, 2747–2754 (2010).
203. Stenmark, K. R., Fagan, K. A. & Frid, M. G. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ. Res.* **99**, 675–691 (2006).
204. Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F. & Sliwa, K. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulm. Circ.* **3**, 739–756 (2013).

205. Voelkel, N. F. & Tuder, R. M. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: a model for what human disease? *J. Clin. Invest.* **106**, 733–738 (2000).
206. Sato, K. *et al.* Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am. Rev. Respir. Dis.* **145**, 793–797 (1992).
207. Nagaoka, T. *et al.* Mild hypoxia causes severe pulmonary hypertension in fawn-hooded but not in Tester Moriyama rats. *Respir. Physiol.* **127**, 53–60 (2001).
208. Mattson, D. L., Kunert, M. P., Roman, R. J., Jacob, H. J. & Cowley, A. W. Substitution of chromosome 1 ameliorates L-NAME hypertension and renal disease in the fawn-hooded hypertensive rat. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **288**, F1015-1022 (2005).
209. Bogaard, H. J. *et al.* Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* **120**, 1951–1960 (2009).
210. Faber, M. J. *et al.* Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **291**, H1580-1586 (2006).
211. Provencher, S. *et al.* Standards and Methodological Rigor in Pulmonary Arterial Hypertension Preclinical and Translational Research. *Circ. Res.* **122**, 1021–1032 (2018).
212. Bonnet, S. *et al.* Translating Research into Improved Patient Care in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **195**, 583–595 (2017).
213. Ye, H. *et al.* Hepatocyte nuclear factor 3/fork head homolog 11 is expressed in proliferating epithelial and mesenchymal cells of embryonic and adult tissues. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1626–1641 (1997).
214. Zhang, X. *et al.* A novel FOXM1 isoform, FOXM1D, promotes epithelial–mesenchymal transition and metastasis through ROCKs activation in colorectal cancer. *Oncogene* **36**, 807–819 (2017).
215. Littler, D. R. *et al.* Structure of the FoxM1 DNA-recognition domain bound to a promoter sequence. *Nucleic Acids Res.* **38**, 4527–4538 (2010).
216. Korver, W., Roose, J. & Clevers, H. The winged-helix transcription factor Trident is expressed in cycling cells. *Nucleic Acids Res.* **25**, 1715–1719 (1997).
217. Laoukili, J. *et al.* Activation of FoxM1 during G2 requires cyclin A/Cdk-dependent relief of autorepression by the FoxM1 N-terminal domain. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 3076–3087 (2008).
218. Chen, Y.-J. *et al.* A Conserved Phosphorylation Site within the Forkhead Domain of FoxM1B Is Required for Its Activation by Cyclin-CDK1. *J. Biol. Chem.* **284**, 30695–30707 (2009).
219. Fu, Z. *et al.* Plk1-dependent phosphorylation of FoxM1 regulates a transcriptional programme required for mitotic progression. *Nat. Cell Biol.* **10**, 1076–1082 (2008).
220. Chakraborty, S., Jaiswal, N. & Nag, A. Biology of FOXM1 and its emerging role in cancer therapy. *J. Proteins Proteomics* **5**, (2014).
221. Laoukili, J. *et al.* FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. *Nat. Cell Biol.* **7**, 126–136 (2005).

222. Wonsey, D. R. & Follettie, M. T. Loss of the forkhead transcription factor FoxM1 causes centrosome amplification and mitotic catastrophe. *Cancer Res.* **65**, 5181–5189 (2005).
223. Kalin, T. V., Ustiyan, V. & Kalinichenko, V. V. Multiple faces of FoxM1 transcription factor: Lessons from transgenic mouse models. *Cell Cycle* **10**, 396–405 (2011).
224. Kim, I.-M. *et al.* The Forkhead Box M1 Transcription Factor Is Essential for Embryonic Development of Pulmonary Vasculature. *J. Biol. Chem.* **280**, 22278–22286 (2005).
225. Ustiyan, V. *et al.* Forkhead box M1 transcriptional factor is required for smooth muscle cells during embryonic development of blood vessels and esophagus. *Dev. Biol.* **336**, 266–279 (2009).
226. Balli, D. *et al.* Foxm1 transcription factor is required for macrophage migration during lung inflammation and tumor formation. *Oncogene* **31**, 3875–3888 (2012).
227. Zhao, Y. D. *et al.* Endothelial FoxM1 Mediates Bone Marrow Progenitor Cell-Induced Vascular Repair and Resolution of Inflammation following Inflammatory Lung Injury: Endothelial FoxM1 in BMPC-Induced Vascular Repair. *STEM CELLS* **32**, 1855–1864 (2014).
228. Zhao, Y.-Y. *et al.* Endothelial cell-restricted disruption of FoxM1 impairs endothelial repair following LPS-induced vascular injury. *J. Clin. Invest.* **116**, 2333–2343 (2006).
229. Xia, H. *et al.* Foxm1 Regulates Resolution of Hyperoxic Lung Injury in Newborns. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **52**, 611–621 (2015).
230. Li, Y. *et al.* The multifaceted roles of FOXM1 in pulmonary disease. *Cell Commun. Signal.* **17**, 35 (2019).
231. Tan, Y., Raychaudhuri, P. & Costa, R. H. Chk2 Mediates Stabilization of the FoxM1 Transcription Factor To Stimulate Expression of DNA Repair Genes. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 1007–1016 (2007).
232. Zhou, J. *et al.* FOXM1 Modulates Cisplatin Sensitivity by Regulating EXO1 in Ovarian Cancer. *PLoS ONE* **9**, e96989 (2014).
233. Zhang, N. *et al.* FoxM1 inhibition sensitizes resistant glioblastoma cells to temozolomide by downregulating the expression of DNA-repair gene Rad51. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18**, 5961–5971 (2012).
234. Khongkow, P. *et al.* FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance. *Oncogene* **33**, 4144–4155 (2014).
235. Zona, S., Bella, L., Burton, M. J., Nestal de Moraes, G. & Lam, E. W.-F. FOXM1: An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* **1839**, 1316–1322 (2014).
236. Wang, Y. *et al.* FOXM1 promotes reprogramming of glucose metabolism in epithelial ovarian cancer cells via activation of GLUT1 and HK2 transcription. *Oncotarget* **7**, 47985–47997 (2016).

237. Cui, J. *et al.* FOXM1 Promotes the Warburg Effect and Pancreatic Cancer Progression via Transactivation of LDHA Expression. *Clin. Cancer Res.* **20**, 2595–2606 (2014).
238. Hegde, N. S., Sanders, D. A., Rodriguez, R. & Balasubramanian, S. The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiostrepton. *Nat. Chem.* **3**, 725–731 (2011).
239. Bhat, U. G., Halasi, M. & Gartel, A. L. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PloS One* **4**, e5592 (2009).
240. Radhakrishnan, S. K. *et al.* Identification of a chemical inhibitor of the oncogenic transcription factor forkhead box M1. *Cancer Res.* **66**, 9731–9735 (2006).
241. Halasi, M. & Gartel, A. L. A novel mode of FoxM1 regulation: Positive autoregulatory loop. *Cell Cycle* **8**, 1966–1967 (2009).
242. Raghavan, A. *et al.* Hypoxia-Induced Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Proliferation Is Controlled by Forkhead Box M1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **46**, 431–436 (2012).
243. Xia, L.-M. *et al.* Transcriptional up-regulation of FoxM1 in response to hypoxia is mediated by HIF-1. *J. Cell. Biochem.* **106**, 247–256 (2009).
244. Barger, C. J., Branick, C., Chee, L. & Karpf, A. R. Pan-Cancer Analyses Reveal Genomic Features of FOXM1 Overexpression in Cancer. *Cancers* **11**, (2019).
245. Kalinichenko, V. V. *et al.* Ubiquitous Expression of the Forkhead Box M1B Transgene Accelerates Proliferation of Distinct Pulmonary Cell Types following Lung Injury. *J. Biol. Chem.* **278**, 37888–37894 (2003).
246. Dai, Z. *et al.* Endothelial and Smooth Muscle Cell Interaction via FoxM1 Signaling Mediates Vascular Remodeling and Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 788–802 (2018).
247. Penke, L. R. *et al.* FOXM1 is a critical driver of lung fibroblast activation and fibrogenesis. *J. Clin. Invest.* **128**, 2389–2405 (2018).
248. Bolte, C. *et al.* Expression of Foxm1 transcription factor in cardiomyocytes is required for myocardial development. *PloS One* **6**, e22217 (2011).
249. Bolte, C. *et al.* Postnatal Ablation of Foxm1 from Cardiomyocytes Causes Late Onset Cardiac Hypertrophy and Fibrosis without Exacerbating Pressure Overload-Induced Cardiac Remodeling. *PLoS ONE* **7**, e48713 (2012).
250. Gartel, A. L. Thiazole Antibiotics Siomycin a and Thiostrepton Inhibit the Transcriptional Activity of FOXM1. *Front. Oncol.* **3**, (2013).
251. Grandin, E. W., Ky, B., Cornell, R. F., Carver, J. & Lenihan, D. J. Patterns of cardiac toxicity associated with irreversible proteasome inhibition in the treatment of multiple myeloma. *J. Card. Fail.* **21**, 138–144 (2015).
252. Koulaouzidis, G. & Lyon, A. R. Proteasome Inhibitors as a Potential Cause of Heart Failure. *Heart Fail. Clin.* **13**, 289–295 (2017).
253. Cole, D. C. & Frishman, W. H. Cardiovascular Complications of Proteasome Inhibitors Used in Multiple Myeloma. *Cardiol. Rev.* **26**, 122–129 (2018).

254. Sun, Y., Yu, X. & Bai, Q. miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 12775–12783 (2015).
255. Hanna, J., Hossain, G. S. & Kocerha, J. The Potential for microRNA Therapeutics and Clinical Research. *Front. Genet.* **10**, 478 (2019).
256. Dai, J. *et al.* Smooth muscle cell-specific FoxM1 controls hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cell. Signal.* **51**, 119–129 (2018).
257. Yao, S., Fan, L. Y.-N. & Lam, E. W.-F. The FOXO3-FOXM1 axis: A key cancer drug target and a modulator of cancer drug resistance. *Semin. Cancer Biol.* **50**, 77–89 (2018).
258. Garat, C. V., Crossno, J. T., Sullivan, T. M., Reusch, J. E. B. & Klemm, D. J. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling attenuates hypoxia-induced pulmonary artery remodeling and suppresses CREB depletion in arterial smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **62**, 539–548 (2013).
259. Sengupta, A., Kalinichenko, V. V. & Yutzey, K. E. FoxO1 and FoxM1 transcription factors have antagonistic functions in neonatal cardiomyocyte cell-cycle withdrawal and IGF1 gene regulation. *Circ. Res.* **112**, 267–277 (2013).
260. Wilson, J. L., Wang, L., Zhang, Z., Hill, N. S. & Polgar, P. Participation of PLK1 and FOXM1 in the hyperplastic proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *PLOS ONE* **14**, e0221728 (2019).

Annexe

Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets

Alice Bourgeois, Junichi Omura, Karima Habbout, Sébastien Bonnet, Olivier Boucherat

Revue publiée

Int J Biochem Cell Biol. 2018 Nov;104:9-13. doi: 10.1016/j.biocel.2018.08.015.