

Roxane PAULIN

**IMPLICATION DE LA VOIE DE
SIGNALISATION Src/STAT3 DANS
L'ETIOLOGIE DE L'HYPERTENSION
ARTERIELLE PULMONAIRE.**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures et postdoctorales de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en Biologie cellulaire et moléculaire
pour l'obtention du grade de *Philosophiae Doctor* (PhD)

Département de Biologie moléculaire, biochimie médicale et pathologie
Faculté de Médecine
Université Laval
Québec

2011

RESUME

L'hypertension artérielle pulmonaire (PAH) est une vasculopathie obstructive caractérisée par une oblitération du lumen des artères pulmonaires distales et une augmentation des résistances vasculaires menant à une augmentation des pressions pulmonaires (PAP) et une hypertrophie ventriculaire droite (RVH) compensatrice. Aucun médicament n'est capable à ce jour de stopper le processus, et lorsque l'hypertrophie compensatrice devient insuffisante, le ventricule droit (RV) se dilate et défaille.

A l'origine de ce processus se trouve une hyper-prolifération, une résistance à l'apoptose et une augmentation de la motilité des cellules musculaires lisses vasculaires de l'artère pulmonaire (PASMCs), les rendant « pseudo-malignes ». Le laboratoire a précédemment démontré que le facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) est en partie impliqué dans ces désordres cellulaires en provoquant une augmentation des concentrations calciques intracellulaires et stimulant la prolifération ; et une hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$) inhibant ainsi l'apoptose dépendante des mitochondries.

Dans le chapitre 2 nous avons démontré pour la première fois dans le réseau vasculaire pulmonaire que le facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) est activé et impliqué de façon directe dans la régulation de l'expression de NFAT et de façon indirecte dans son activation via l'oncoprotéine serine/thréonine kinase Pim1 (Provirus integration site for Murine Moloney leukemia virus). L'inhibition de Pim1 *in vitro* et *in vivo* (modèle de rat injecté à la monocrotaline) est associée à une diminution de l'activité de NFATc2 et à un retour à un phénotype normal. De plus, les souris déficientes pour le gène Pim1 sont résistantes à une induction de la PAH par hypoxie ou monocrotaline. De plus nous avons démontré que l'expression de Pim1 corrèle avec la sévérité de la maladie dans le modèle expérimental et le modèle humain. Nous avons donc souligné l'intérêt de Pim1 comme cible thérapeutique et outil de diagnostic.

Dans le chapitre 3, nous avons mis en évidence l'implication de la plateforme signalétique c-Src (sarcoma Schmidt-Ruppin A-2 viral oncogene homolog)/FAK (Focal adhesion kinase) dans la régulation du phénotype « pseudo malin » en partie par activation

de STAT3. L'inhibition de FAK *in vitro* diminue la prolifération des cellules pathologiques, augmente leur sensibilité à l'apoptose et réduit leur motilité. *In vivo*, l'inhibition de FAK réduit les pressions pulmonaires et le remodelage vasculaire faisant de FAK une cible thérapeutique intéressante.

Dans le chapitre 4 nous proposons finalement une autre option thérapeutique par l'utilisation de la dehydroepiandrosterone. Cette hormone naturelle a précédemment été remarquée comme bénéfique dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire de par ses propriétés vasodilatatrices. Nous avons montré ici qu'en inhibant STAT3 la DHEA possède également des propriétés antiprolifératives et que son utilisation clinique est prometteuse.

Durant mes travaux de doctorat, j'ai pu donc mettre en évidence l'implication majeure de l'axe Src/FAK/STAT3/Pim1 dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle pulmonaire. J'ai pu proposer diverses solutions thérapeutiques qui pourraient apporter de nouvelles issues cliniques plus ou moins rapidement.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an obstructive vasculopathy characterized by distal pulmonary arteries lumen obliteration and increased vascular resistances, leading to a rise in pulmonary arterial pressure (PAP) and a compensatory right ventricular hypertrophy. Currently available therapies do not permit to reverse the established process and when the hypertrophy become insufficient, the right ventricle dilates and fails.

This phenomenon is due to enhanced proliferation, survival and motility of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs), which acquire a pseudo malignant phenotype. Our group previously described that the transcription factor NFAT (Nuclear factor of activated T-cells) is involved in these cellular disorders by increasing intracellular calcium level and enhancing proliferation; and by hyperpolarizing the mitochondrial membrane potential and decreasing mitochondrial-dependant apoptosis.

In the Chapter 2, we demonstrated for the first time in the pulmonary vasculature, that STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) regulates directly NFATc2 expression and indirectly NFATc2 activity via the oncoprotein serine/threonine kinase Pim1 (Provirus integration site for Murine Moloney leukemia virus). *In vitro* and *in vivo* Pim1 inhibition (in the monocrotaline rat model) is associated with decreased NFATc2 activity and reversion of the malignant phenotype. Moreover, Pim1 deficient mice are resistant to monocrotaline or hypoxia-induced PAH. Finally, we demonstrated that Pim1 expression correlates with disease progression both in animal and human model. Thus, we underlined Pim1 as a potent therapeutic target and an interesting diagnosis tool.

In the chapter 3, we showed that the signaling hub c-Src (sarcoma Schmidt-Ruppin A-2 viral oncogene homolog)/FAK (Focal adhesion kinase) is implicated in the regulation of the PASMCs pseudo malignant phenotype, in part by activating STAT3. FAK inhibition *in vitro* decreases PASMCs proliferation, survival and motility. *In vivo*, FAK inhibition is associated with decreased PAP and decreased vascular remodeling, making FAK as an interesting therapeutic target.

In the chapter 4, we suggest dehydroepiandrosterone (DHEA) as another therapeutic option. This natural hormone is known to be beneficial in PAH through their vasodilating properties. We showed here that by inhibiting STAT3 activation, DHEA also has anti-proliferating properties. Therefore, clinical use of DHEA for PAH can be promising.

During my PhD studies, I showed the critical implication of the Src/FAK/STAT3/Pim1 in PAH pathogenesis. I contributed to increase the knowledge on PAH pathogenesis and suggested some therapeutic solutions that can be useful to improve patient outcome.

AVANT PROPOS

Ce manuscrit comprend la majorité des travaux de Recherche que j'ai effectués durant mes 3 années d'études de Doctorat. Le chapitre 2 est un manuscrit publié dans le Journal *Circulation* :

Chapitre 2 :

Paulin R, Courboulin A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, Cote J, Provencher S, Sussman MA, Bonnet S.

Signal Transducers and Activators of Transcription-3/Pim1 Axis Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Human Pulmonary Arterial Hypertension.
Circulation. 2011 Mar 22;123(11):1205-15.

Dans cet article, je suis responsable de la génération de 95% des données, de l'élaboration des figures et j'ai participé à l'écriture du manuscrit. Audrey Courboulin, Jolyane Meloche et le Dr. Eric Dumas De La Roque m'ont accompagné dans l'obtention des données *in vivo*. Le Dr. Néhémé Saksouk et le Dr. Jacques Coté ont produit la figure supplémentaire 2-2B. Vincent Mainguy et le Dr. Steeve Provencher ont permis l'utilisation de tissus humains dans cette étude, avec l'obtention des données cliniques et des consentements des patients. Le Pr. Sussman a fourni les souris KO pour Pim1 ainsi que les adénovirus dominant positif et négatif de Pim1. Le Pr. Sébastien Bonnet a supervisé le projet et rédigé le manuscrit initial.

L'étude relatée dans le chapitre 3 est encore en cours au moment de l'écriture de la thèse et sera soumise sous peu.

Chapitre 3 :

Paulin R., Meloche J., Courboulin A., Lambert C., Haromy A., Michelakis E. and Bonnet S.

The signaling hub Focal Adhesion Kinase (FAK) is implicated in Human Pulmonary Hypertension and its inhibition is beneficial.

Je suis responsable de l'élaboration du projet, de la génération des résultats, de l'élaboration des figures et de l'écriture du manuscrit. Jolyane Meloche, Audrey Courboulin et Caroline Lambert ont participé à l'obtention de données *in vivo*. Le projet va être terminé dans le laboratoire du Dr. Evangelos Michelakis. Alois Haromy, de ce même laboratoire a participé à l'imagerie confocale. Le Pr. Sébastien Bonnet, en tant que directeur de recherche, a supervisé l'ensemble du travail.

En ce qui concerne le chapitre 4, l'étude est acceptée pour publication dans *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*:

Chapitre 4 :

Paulin R., Meloche J., Jacob M.H., Bissierier M., Courboulin A. and Bonnet S.

Dehydroepiandrosterone DHEA inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in Pulmonary Arterial Hypertension.

Je suis responsable de la génération de 50% des données, Jolyane Meloche et Malik Bissierier sont responsable de la génération des 50% restants. Audrey Courboulin et Maria Helena Jacob ont participé à l'obtention des données *in vivo*. J'ai élaboré les figures et écrit le manuscrit. Le Pr. Bonnet a supervisé le projet et participé à l'amélioration du manuscrit.

D'autres travaux, non inclus dans la thèse mais ayant généré des publications ont également été effectué durant la période consacrée aux études de Doctorat :

Article de Recherche :

Sébastien Bonnet; Roxane Paulin; Gopinath Sutendra; Peter Dromparis; Melanie Roy; Kristalee O Watson; Jayan Nagendran; Alois Haromy; Jason RB Dyck and Evangelos D Michelakis. **Dehydroepiandrosterone reverses vascular remodeling disease through the inhibition of a AKT/NFAT axis.** *Circulation. 2009 Sep 29;120(13):1231-40.*

Article de Recherche :

Audrey Courboulin, Roxane Paulin, Nelly J. Giguère, Nehmé Saksouk, Eric R. Paquet, Jacques Côté, Martin J. Simard and Sébastien Bonnet. **Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension.** *J Exp Med.* 2011 Mar 14;208(3):535-48. Epub 2011 Feb 14.

Editorial:

Roxane Paulin, Marjorie Barrier and Sebastien Bonnet. **New Therapeutics for pulmonary arterial hypertension: do gene therapies have translational values?** *Future Science. Clinical Investigation, March 2011; 1(3): 363-366.*

Chapitre de livre:

Roxane Paulin, Eric Dumas de la Roque and Sebastien Bonnet. DHEA in Human Health and Aging Edited by Ronald Ross Watson CRC Press, **Chapter 10 : DHEA and vascular health and functions.** Pages 123–140.

Article de Recherche :

Jolyane Meloche*; Roxane Paulin*; Audrey Courboulin; Caroline Lambert; Marjorie Barrier; Pierre Bonnet; Malik Bissierier; Melanie Roy; Mark A Sussman; Mohsen Agharazii and Sébastien Bonnet. **RAGE-dependent activation of the oncoprotein Pim1 plays a critical role in systemic vascular remodeling processes.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011 Sep;31(9):2114-24.

* les auteurs ont contribué équitablement à l'étude.

Revue:

Roxane Paulin*, Audrey Courboulin* Marjorie Barrier and Sébastien Bonnet. **From oncoproteins/tumor suppressors to miRNAs: newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension.** *J Mol Med (Berl).* Published online 2011 Jul 15.

* les auteurs ont contribué équitablement à l'étude.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon superviseur, le **Professeur Sébastien BONNET** pour m'avoir ouvert un horizon auquel je ne m'attendais pas. La thèse par défaut que j'ai commencé est devenue une évidence et puis a finalement ouvert d'autres perspectives de carrière. Merci d'avoir cru en moi. Merci pour tes conseils, tes remarques, tes secrets. Si une de tes paroles devait résumer cette thèse ce serait celle-ci :

« Je vois maintenant dans tes yeux des flammes, de celle qui en veut, de celle qui lâchera jamais ».

Effectivement, même si j'ai toujours fait preuve de détermination et d'assurance, je dois avouer que ces deux qualités sont décuplées aujourd'hui grâce à toi. Tu n'as pas été tendre avec moi mais réciproquement je t'en ai fait voir de toutes les couleurs, et je m'en excuse encore. Merci de m'avoir ouvert des portes, je vais faire en sorte qu'elles en ouvrent d'autres.

Un grand merci aux membres du jury:

Merci au **Professeur Jacques HUOT** d'avoir été présent pour mon évaluation de pré-doctorat et d'être de nouveau disponible dans l'évaluation de ce mémoire de thèse.

Merci au **Professeur Philippe PIBAROT** d'avoir accepté de faire partie des membres du jury et d'apporter une critique plus clinique à mon travail.

Merci au **Professeur Denis DEBLOIS**, jury externe, de bien vouloir faire le déplacement depuis Montréal.

Merci à tous les membres du laboratoire du Pr. BONNET :

Un merci tout particulier à **Audrey COURBOULIN** qui a partagé littéralement ma vie pendant 2 ans. Entre fous rires et désaccords, nous avons formé une super équipe, efficace et dynamique ! Un grand merci à **Jolyane MELOCHE**. Je suis très fière d'avoir été « ta chef » et de partager avec toi 2 papiers en co-auteurs! Merci à tous les membres du laboratoire qui ont contribué de près ou de loin à tout ce travail : **Caroline LAMBERT**,

Véronique LESVEQUES-TREMBLAY, Edith DUCHESNEAU, Dr. Eric DUMAS DE LA ROQUE, Marjorie BARRIER, Malik BISSERIER et tous ceux que je n'ai que croisé.

Merci aux membres des laboratoires voisins, chez qui je suis allée me dépanner en produits et consommables mais aussi en conseils et expertises. Un merci tout particulier à **Geneviève**, qui est une véritable merveille. Merci à **Claude et Danielle**, à qui j'ai au moins posé une question par jour, pour leur patience.

Merci aux **Docteurs Josée LAVOIE et Marcel LEBEL** que j'ai sollicité à plusieurs reprises pour des lettres de recommandation pour leur soutien et leur appui.

Merci au **Docteur Evangelos MICHELAKIS** de son accueil et de me faire confiance pour les années qui viennent.

Je tiens également à remercier divers membres de l'Hôpital Laval.

Merci au **Docteur Steeve PROVENCHER**, pour sa collaboration dans le projet Pim1 mais également pour m'avoir permis de voir de mes yeux un cathétérisme droit et de rencontrer des patients. Rien n'est plus motivant pour travailler dur que d'être confronté à la souffrance et au quotidien des patients. Ce fut un réel honneur, merci encore.

Merci à **Sabrina BIARDEL et Christine RACINE** de la banque de tissus de l'Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Québec, pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Merci à la Société Québécoise d'hypertension Artérielle, pour son soutien financier.

Un gros merci à ma famille qui su dire les mots qu'il fallait au bon moment.

Merci à mes parents de m'avoir soutenue et de m'avoir fait confiance dans mon parcours sinueux et m'éloignant toujours plus d'eux.

Merci à mes sœurs pour notre rendez vous hebdomadaire et d'avoir établi entre moi et mes nièces une vraie relation malgré la distance. Je suis la tatie de l'ordinateur, la tatie des caribous, et donc finalement je suis quelqu'un pour elles. Les premiers pas, les premiers mots, les bonnes notes (comme les mauvaises), les bonheurs (et les chagrins), les « tatie je t'aime » (et les bêtises) et je n'ai rien loupé, et je vous en serai éternellement reconnaissante.

Merci à mes amis d'être toujours là quand j'en ai besoin et de créer des tranches de vies inoubliables. Vous serez toujours les bienvenus chez moi, ou que cela soit dans le monde ! « Good friends are like Stars, you don't always see them, but you know they are always there. »

*La force des vrais détours n'est pas
d'éloigner mais d'atteindre au but
avec plus d'exactitude.*

Benjamin Pelletier, La mère des batailles, 2004.

A Jade, Léna et Aude.

TABLE DES MATIERES

IMPLICATION DE LA VOIE DE SIGNALISATION SRC/STAT3 DANS L'ETIOLOGIE DE L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE..... I

RESUME	ii
ABSTRACT.....	iv
AVANT PROPOS.....	vi
REMERCIEMENTS.....	ix
TABLE DES MATIERES	xiii
Liste des abreviations	xix
Liste des tableaux.....	xxii
Liste des equations	xxii
Liste des figures.....	xxiii

CHAPITRE 1: INTRODUCTION 1

1. INTRODUCTION.....	2
1.1. Physiologie cardio-pulmonaire.....	2
1.1.1. Le cœur.....	2
1.1.1.1. Structure.....	2
1.1.1.2. Révolution cardiaque.....	2
1.1.1.3. Trajet du sang dans le cœur.....	3
1.1.1.4. Débit cardiaque.....	4
1.1.1.5. Pré-charge/post-charge et Loi de Starling.....	5
1.1.1.6. La fraction d'éjection.....	6
1.1.2. La circulation.....	6
1.1.2.1. Système artériel.....	6
1.1.2.1.1. Compliance.....	6
1.1.2.1.2. Résistances vasculaires.....	7
1.1.2.1.3. Pression Artérielle.....	7
1.1.2.1.4. Anatomie de la paroi.....	9
1.1.2.2. Particularités de la circulation artérielle pulmonaire.....	11
1.1.2.2.1. Généralités.....	11
1.1.2.2.2. Relation Pression/Débit.....	11
1.1.2.2.3. Anatomie.....	12
1.1.2.3. Le système veineux.....	14
1.1.2.3.1. Remontée du sang veineux.....	14
1.1.2.3.2. Anatomie.....	15
1.1.3. Vasoconstriction/relaxation artérielle.....	15
1.1.3.1. Mécanismes contractiles des cellules musculaires lisses vasculaires.....	15
1.1.3.1.1. Mécanismes dépendants du calcium.....	15
1.1.3.1.2. Liens entre les voies de signalisations impliquant le Ca ²⁺ et les ROS/RNS.....	17
1.1.3.1.3. Contraction dépendante du calcium.....	17
1.1.3.2. Action de l'endothélium.....	19
1.1.3.2.1. Monoxyde d'azote NO.....	20
1.1.3.2.2. Endothéline -1.....	22
1.1.3.2.3. Prostaglandines.....	22
1.1.3.2.4. La sérotonine.....	24
1.1.3.3. Régulation par le système nerveux autonome.....	24
1.1.3.3.1. Contrôle adrénergique.....	24
1.1.3.3.2. Contrôle cholinergique.....	25

1.1.3.3.3.	Contrôle non adrénérique, non cholinérique	25
1.2.	Hypertension pulmonaire	26
1.2.1.	Classification de l'Organisation mondiale sur la Santé	26
1.2.1.1.	Groupe I : Hypertensions artérielles pulmonaires	27
1.2.1.1.1.	PAH idiopathique ou familiale	27
1.2.1.1.2.	PAH associée à des cardiopathies congénitales	28
1.2.1.1.3.	PAH associée à des connectivites ¹	28
1.2.1.1.4.	PAH associée au virus d'immunodéficience humaine (HIV) ou à une hypertension portale	28
1.2.1.1.5.	PAH associée à la consommation de drogues et toxines	29
1.2.1.1.6.	PAH associée a des hémoglobinopathies	29
1.2.1.1.7.	PAH associée à d'autres étiologies	29
1.2.1.2.	Groupe II, Hypertensions veineuses pulmonaires	29
1.2.1.3.	Groupe III : PHT associées à l'hypoxie	30
1.2.1.3.1.	Broncho-pneumopathies chroniques obstructives	30
1.2.1.3.2.	Pneumopathies interstitielles	30
1.2.1.3.3.	Troubles respiratoires du sommeil	30
1.2.1.4.	Groupe IV : PHT post-embolie, thrombotique ou non	31
1.2.1.5.	Groupe V : PHT associées à des mécanismes divers	31
1.2.2.	Défaillance du cœur droit	31
1.2.2.1.	Hypertrophie	32
1.2.2.2.	Défauts contractiles	32
1.2.2.3.	Dilatation	32
1.2.2.4.	Défaillance	33
1.2.3.	Réversibilités des PHT	35
1.3.	Diagnostic clinique	35
1.3.1.	Présentation clinique	35
1.3.2.	Classification fonctionnelle de l'insuffisance cardiaque	36
1.3.3.	Mesures non invasives de diagnostic	36
1.3.3.1.	Test à l'effort	36
1.3.3.2.	Electrocardiogramme	37
1.3.3.3.	Radiographie thoracique	37
1.3.3.4.	Echocardiographie Doppler	37
1.3.3.5.	Imagerie à résonance magnétique	39
1.3.3.6.	Biomarqueurs	39
1.3.3.6.1.	Taux de vasodilatateurs/vasoconstricteurs	40
1.3.3.6.2.	Le BNP « Brain natriuretic peptide »	40
1.3.3.6.3.	Marqueur du métabolisme oxydatif	41
1.3.3.6.4.	Cytokines/Interleukines	41
1.3.4.	Mesure invasive: la cathétérisme droit	42
1.4.	Traitements	42
1.4.1.	Prise en charge des patients aujourd'hui	42
1.4.1.1.	Traitements de base	42
1.4.1.2.	Les autres traitements pouvant être proposés en plus du traitement de base	43
1.4.1.2.1.	Bloqueurs calciques	43
1.4.1.2.2.	Prostacyclines et analogues	43
1.4.1.2.3.	Inhibiteurs de la voie ET-1	44
1.4.1.2.4.	Inhibiteurs de la PDE-5	44
1.4.2.	Actuellement en phase clinique	44
1.4.2.1.	Activateurs de la Guanylate Cyclase	44
1.4.2.2.	Inhibiteurs des RTK	45
1.4.2.3.	Inhibiteurs de ROCK	45
1.4.2.4.	Première thérapie génique pour la PAH	45
1.5.	L'Hypertension Artérielle Pulmonaire (PAH)	46
1.5.1.	Histologie caractéristique	46
1.5.2.	Modèles animaux	48

1.5.2.1.	Le modèle hypoxique.....	48
1.5.2.2.	« Fawn-hooded rats ».....	49
1.5.2.3.	La monocrotaline.....	49
1.5.2.4.	SUGEN 5416 et hypoxie.....	50
1.5.3.	Dysfonction endothéliale.....	51
1.5.4.	Phénotype cancéreux.....	52
1.5.4.1.	Angiogénèse.....	53
1.5.4.1.1.	Lésions plexiformes.....	53
1.5.4.2.	Instabilité génique.....	54
1.5.4.2.1.	Mutation BMPR2.....	54
1.5.4.2.2.	Mutation dans le gène codant pour ALK1.....	55
1.5.4.2.3.	Polymorphismes.....	55
1.5.4.3.	Inflammation.....	55
1.5.4.4.	Dérégulation du métabolisme énergétique et résistance à la mort cellulaire dépendante des mitochondries.....	57
1.5.4.4.1.	Prévalence de la glycolyse.....	57
1.5.4.4.2.	Apoptose dépendante des mitochondries.....	58
1.5.4.4.3.	Activation pseudo hypoxique de Hif-1 α	61
1.5.4.5.	Signalisation pro-proliférative.....	61
1.5.4.5.1.	Mitogènes.....	61
1.5.4.5.2.	Protéines avec activités oncogéniques et suppresseurs de tumeurs.....	61
1.5.4.5.3.	miRNA avec activité oncogénique et suppresseur de tumeur.....	65
1.5.4.6.	Migration /invasion.....	69
1.5.4.6.1.	Le cycle migratoire.....	69
1.5.4.6.2.	Migration vs invasion.....	70
1.5.4.6.3.	Migration pathologique.....	72
1.5.4.6.4.	Migration dans la PAH.....	72
	HYPOTHESE GENERALE.....	73

CHAPITRE 2: L'AXE DE SIGNALISATION STAT3/PIM1 JOUE UN ROLE CRUTIAL DANS LA PATHOGENESE DE LA PAH..... 74

L'INHIBITION DE PIM1, EN AVAL DE STAT3, ABROGE LA PAH. 74 HYPOTHESE DE TRAVAIL..... 75

2. The STAT3/Pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension.....	77
RESUME.....	78
ABSTRACT.....	79
2.1. Introduction.....	80
2.2. Materials and methods.....	81
2.2.1. Human tissue samples (Tab.1):.....	81
2.2.2. Cell culture:.....	81
2.2.3. Cell treatments:.....	81
2.2.4. $\Delta\Psi_m$ and $[Ca^{2+}]_i$	83
2.2.5. Proliferation and apoptosis measurements.....	83
2.2.6. Nuclear translocation assay.....	83
2.2.7. NFAT luciferase assay.....	84
2.2.8. Quantitative RT-PCR and immunoblots.....	84
2.2.9. In vivo experiments:.....	84
2.2.10. Hemodynamic measurements.....	85
2.2.11. Histology measurements:.....	85
2.2.12. ChIP-PCR.....	85
2.2.13. siRNAs and adenoviruses efficiencies.....	86

2.2.14. Statistics:	86
2.3. Results	86
2.3.1. STAT3 activation is increased in human PAH-PASMC.	86
2.3.2. Pim1 expression is increased in human PAH-PASMC and correlates with PAH severity.	88
2.3.3. STAT3 activation in human PAH-PASMC triggers Pim1 expression.	89
2.3.4. Pim1 promotes proliferation and resistance to mitochondria-dependent apoptosis in PAH-PASMCs.	90
2.3.5. STAT3 regulates Pim1 and NFATc2 expressions, while Pim1 regulates NFATc2 activation in PAH-PASMC.	93
2.3.6. STAT3/ Pim1/NFATc2 axis is increased in rat experimental PAH.	96
2.3.7. Pim1 inhibition reverses MCT-PAH.	98
2.3.8. Pim1 knockout mice is resistant to PAH.	99
2.4. Discussion:	103
2.5. Conclusion:	107
2.6. Acknowledgments:	107
2.7. Funding sources/Disclosure:	107
2.8. Supplemental Figures	108

CHAPITRE 3:..... 124

L'INHIBITION EN AMONT DE STAT3: 124

LA PLATEFORME SIGNALÉTIQUE FAK (FOCAL ADHESION KINASE) EST IMPLIQUÉE DANS LA PAH ET SON INHIBITION EST BÉNÉFIQUE..... 124

HYPOTHESE DE TRAVAIL..... 125

3. The signaling hub Focal Adhesion Kinase (FAK) is implicated in Human Pulmonary Hypertension and its inhibition is beneficial. 126

RESUME 127

ABSTRACT..... 128

3.1. INTRODUCTION..... 129

3.2. MATERIALS AND METHODS 130

3.2.1. Cell culture: 130

3.2.2. Cell treatments:..... 131

3.2.3. Measurement of the $\Delta\Psi_m$ 131

3.2.4. Proliferation and apoptosis measurements:..... 131

3.2.5. Nuclear translocation assay: 131

3.2.6. Cell migration assays 132

3.2.7. Wound healing assay by scratch test: 132

3.2.8. Immunoblots 132

3.2.9. In vivo experiments: 132

3.2.10. Hemodynamic measurements: 133

3.2.11. Histology measurements:..... 133

3.2.12. Statistics:..... 133

3.3. RESULTS..... 134

3.3.1. FAK is activated in PAH-PASMCs 134

3.3.2. FAK activation is dependant on Src kinase activity. 134

3.3.3. FAK inhibition decreases PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis. 135

3.3.4. FAK inhibition decreases PAH-PASMCs motility..... 138

3.3.5. Src/FAK and STAT3 inhibitions decrease Wound Healing response in PAH-PASMCs. ... 138

3.3.6. PY576-FAK is localized in focal adhesion points and in the nucleus, and is associated with actin reorganization..... 142

3.3.7. FAK inhibition in vivo reverses monocrotaline-induced PAH. 142

3.3.8. FAK inhibition decreases in vivo Src/STAT3 activation.....	145
3.4. DISCUSSION.....	147
3.5. CONCLUSION	149
3.6. ACKNOWLEDGMENT:	149
3.7. FUNDING SOURCES/DISCLOSURES:	149

CHAPITRE 4:..... 150

L'INHIBITION DIRECTE DE STAT3 PAR LA DHEA. 150

HYPOTHESE DE TRAVAIL..... 151

4. Dehydroepiandrosterone inhibits Src/STAT3 constitutive activation in Pulmonary Arterial Hypertension.	152
RESUME	153
ABSTRACT.....	154
4.1. INTRODUCTION.....	155
4.2. MATERIALS AND METHODS	156
4.2.1. Cell culture:	156
4.2.2. Cell treatments:.....	157
4.2.3. Measurement of the $\Delta\Psi_m$ and $[Ca^{2+}]_i$	157
4.2.4. Proliferation and apoptosis measurements:.....	157
4.2.5. Nuclear translocation assay:	158
4.2.6. Quantitative RT-PCR and immunoblots.....	158
4.2.7. In vivo experiments:	159
4.2.8. Hemodynamic measurements:.....	159
4.2.9. Histology measurements:.....	159
4.2.10. Statistics:.....	159
4.3. RESULTS.....	160
4.3.1. DHEA decreases Src/STAT3 activation in PAH-PASMCs.....	160
4.3.2. DHEA and STAT3 inhibition reverses miR-204 downregulation in human PAH-PASMCs. 160	
4.3.3. DHEA-dependent inhibition of the Src/STAT3 decreases the oncogenic Pim-1/NFATc2/Survivin axis and promotes BMPR2 expression.	165
4.3.4. DHEA and STAT3 inhibition decreases proliferation and resistance to mitochondria-dependent apoptosis in PAH-PASMCs.....	166
4.3.5. DHEA decreases IL6-dependent Src/STAT3 activation, downstream target expression, reduces proliferation and increases apoptosis in control PASMCs stimulated by IL-6.	167
4.3.6. DHEA and STAT3 inhibition reverses MCT-PAH	169
4.4. DISCUSSION.....	175
4.5. CONCLUSION/PERSPECTIVES	178
4.6. ACKNOWLEDGMENT:	178
4.7. FUNDING SOURCES:/DISCLOSURES	178

CHAPITRE 5 : DISCUSSION 179

5. Discussion.....	180
5.1. Quels avantages peut-on trouver à cibler dans la voie un des acteurs plutôt qu'un autre ?	181
5.1.1. Avantages à cibler la plateforme signalétique SRC/FAK.	181
5.1.1.1. Activation très tôt dans la maladie.	181
5.1.1.2. Plateforme signalétique.....	181
5.1.1.3. Inhibiteurs disponibles en grands nombres	181
5.1.2. Avantages de cibler STAT3.....	184
5.1.2.1. Diagnostic	184
5.1.2.2. Un facteur de transcription en puissance.....	184

5.1.2.3.	Un facteur de transcription ? Pas seulement !	185
5.1.3.	Avantage de cibler Pim1	186
5.1.3.1.	Pim1 utilisé comme biomarqueur.	186
5.1.3.1.1.	C'est le cas dans le cancer	186
5.1.3.1.2.	L'expression de Pim1 dans la PAH corrèle avec les PAPs.	187
5.1.3.1.3.	Auto-anticorps de Pim1	187
5.1.3.2.	Boucles de rétrocontrôle positif de Pim1 sur l'axe Src/FAK/STAT3 ?	188
5.2.	Potentielle implication de cofacteurs clés	189
5.2.1.	SOCS and PIAS	189
5.2.2.	MDM2/p53	190
5.2.3.	CBP/p300	191
5.3.	Enfin, quelle différence il y a t'il entre une cellule cancéreuse et une PAH-PASMC ?	191
5.3.1.	Les contraintes mécaniques :	191
5.3.2.	Contraction et homéostasie calcique	192
5.4.	Quel rôle joue cette voie dans l'hypertrophie cardiaque	192
5.4.1.	Le rôle de Src/FAK dans l'hypertrophie cardiaque.	193
5.4.2.	Rôle de STAT3	194
5.4.3.	Rôle de Pim1	194
5.5.	Quel rôle joue cette voie dans l'endothélium ?	195
5.6.	Interventions thérapeutiques, quel est le futur ?	195
5.6.1.	Cibler le poumon.	195
5.6.1.1.	Le poumon particulièrement perméable aux macromolécules	195
5.6.1.2.	La thérapie génique	196
5.6.2.	Cellules souches	197
5.6.3.	Les patients traités par des thérapies inhibant les kinases peuvent-ils développer des résistances comme les patients traités pour le cancer?	197

CHAPITRE 6..... 199

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 199

6.	Conclusion/perspectives.....	200
6.1.	Conclusion.....	200
6.2.	Perspectives	200
6.2.1.	Essais précliniques	200
6.2.1.1.	Inhibiteurs de FAK.....	200
6.2.1.2.	Inhibiteurs de Pim1	201
6.2.2.	Etude a grande échelle de Pim1 comme biomarqueur dans la PHT	201
	NDEX	202

REFERENCES..... 204

LISTE DES ABBREVIATIONS

10

$\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential, potentiel de membrane mitochondriale.....	58
5-HT : 5-hydroxytryptamine, serotonin, sérotonine	24
5-HTP : 5-hydroxytryptophane	24
5-HTR : serotonin receptor, récepteur a la serotonine.....	24
5-HTT : serotonin transporter, transporteur a la sérotonine	24
6MWT : 6 minutes walk test.....	36
AA :Arachidonic Acid, Acide arachidonique	22
Abl : Abelson virus protein	182
AIF :Apoptosis inducible factor	58
ALK1 : Activin-like kinase 1	54
ANT : Adenine Nucleotide Translocase.....	58
BCR : Breakpoint cluster region	182
BK_{Ca} :Large conductance K _{Ca} , K _{Ca} a large conductance	16
BMPR2 :Bone Morphogenic protein receptor type 2.....	27
BNP : Brain natriuretic peptide	40
CaM :Calmodulin, Calmoduline	15
CDK : cyclin-dependent kinases	62
cGMP :cyclic guanosine monophosphate, guanosine monophosphate cyclique.....	20
CGRP : Calcitonin gene-related peptide	25
CML : Chronic myéloïde leukemia, Leucémie Myéloïde Chronique	182
COPD : Chronic obstructive pulmonary diseases, Broncho-pneumopathies chroniques obstructives	30
COX : Cyclooxygenase, Cyclooxygénase.....	23
c-Src : sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog	54
cTnT : Cardiac troponin T, Troponine T cardiaque	41
DAG :Diacylglycerol.....	15
DAP :Diastolic Arterial pressure, Pression artérielle diastolique	8
ECG : Electrocardiogram, Electrocardiogramme	37
ECM : Extracellular matix, Matrice extracellulaire	32
EDV :End-diastolic volume, Volume d'éjection diastolique	6
EF : Ejection fraction, Fraction d'éjection.....	6
EGF : Epidermal growth factor.....	61
Em :Membrane potential, Potentiel de membrane	16
eNOS :endothelial NO Synthase, NO synthase endotheliale.....	20
ESV :End-systolic volume, Volume d'éjection systolique.....	4
ET-1 :Endothelin-1, Endothéline 1.....	22
ETC : Electron transporter chain, Chaîne de transporteurs d'électrons	57
FAK : Focal adhesion kinase	70
GDF-15 : Growth differentiation factor-15	41
GPCR :G-protein coupled receptor, récepteurs couple au protéines G C	15
GRIM-19 : Gene associated with retinoid interferon-induced mortality	185
GTP :Guanosine triphosphate	20
H₂O₂ : Hydrogen peroxyde, Peroxyde d'hydrogène.....	61
HIF-1α : Hypoxia inducible factor-1 α	61
HPAEC : Human pulmonary artery endothelial cell, Cellule endothéliale d'artère pulmonaire humaine.....	67
HR :Heart rate, fréquence cardiaque	5
IFN-γ Interferon- γ	76
IL :-Interleukin-, Interleukine.....	22
IP3 :Inositol-1,4,5-triphosphate.....	15
IPF : Idiopathic pulmonary fibrosis, Fibrose pulmonaire idiopathique	30
K_{Ca} :Ca ²⁺ -activated K ⁺ channels, Canaux K ⁺ actives par le Ca ²⁺	16
Kv :Voltage-dependant potassium channels, Canaux potassiques dépendants du voltage	16

LDH: Lactate déshydrogénase	58
LV: Left ventricle, Ventricule gauche	3
MAPK: Mitogen-activated protein kinase	54
MCP-1: Monocyte chemoattractant protein	76
MDM2: p53 binding protein homolog	190
MHC: Myosine Heavy Chain, Chaîne lourde de Myosine	32
MHC-α: MHC de forme α	32
MHC-β: MHC de forme β	32
miRNA: micro-RNA, micro-ARN	65
MLC: Myosin Light Chain, Chaîne légère de myosine	15
MLC: Myosine light chain, Chaîne légère de myosine	17
MLCK: MLC kinase	15
MLCP: MLC phosphatase	17
MMP: Matrix metalloproteinase, Métalloprotéinases de la matrice	70
mPTP: Mitochondrial permeability transition pore	58
MRI: Magnetic résonance imaging, Imagerie à résonance magnétique	39
mRNA: messenger RNA, ARN messenger	65
MTOC: Microtubule organizing center	70
NFAT: Nuclear factor of activated T-cells	62
NFκB: Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells	185
NO: Nitric Oxyde, Monoxyde d'azote	11
NPY: Neuropeptide Y	25
NT-proBNP: N-terminal prohormone BNP	40
NYHA: New York Heart Association	36
PA: Pulmonary artery, Artère pulmonaire	3
PAAT: Pulmonary Artery Acceleration Time, Temps d'accélération du flux pulmonaire	39
PAH: Pulmonary arterial hypertension, Hypertension artérielle pulmonaire	27
PAP: Pulmonary artery pressure, pression artérielle pulmonaire	26
PDE: Phosphodiesterase, Phosphodiesterase	20
PDGF: Platelet-derived growth factor	61
PDH: pyruvate deshydrogenase	57
PG: Prostaglandin, Prostaglandine	23
PGI: Prostacyclin, Prostacycline	23
PGI-S: Prostacyclin synthase, Prostacycline synthase	23
PHD: Prolyl-hydroxylase domain	63
PHT: Pulmonary hypertension, Hypertension pulmonaire	26
Pim1: Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus	75
PKC: Protein Kinase C	17
PLA₂: Phospholypase A ₂	23
PLC: Phospholypase C	15
PMCA: Plasma membrane Ca ²⁺ ATPases, ATPases calciques de la membrane plasmique	19
PTK: Protein tyrosin kinase	125
PVR : Pulmonary vesicular resistances, Résistances vasculaires pulmonaires	31
Pyk2: proline-rich tyrosine kinase 2	183
Q: Débit cardiaque	4
RAGE: Receptor for Advanced-glycation end-products	72
RNS: Reactive nitrogen species, Espèces réactives d'azote	17
ROC: Receptor-operative Ca ²⁺ channels, Canaux dépendants de la stimulation de récepteurs	16
ROCK: Protein Rho Kinase	17
ROS: Reactive oxygen species, Espèces réactives d'oxygène	17
RV: Right ventricle, Ventricule droit	3
SAP: Systolic Arterial Pressure, Pression artérielle systolique	8
SERCA: Sarcoplasmic reticulum Ca ²⁺ ATPases, ATPases présentes sur le SR	19
SMAD: mothers against decapentaplegic homolog	54
SNP: Single-nucléotide polymorphisms	55
SOC: Store-operated Ca ²⁺ channels, Canaux dépendants des réserves internes calciques	16

SOD-2: Superoxide dismutase-2	61
SP: Substance P	25
SR: Sarcoplasmic reticulum, Réticulum sarcoplasmique	15
STAT3: Signal Transducer and activator of transcription3	67
SUMO: Small ubiquitin-like modifier	189
TF: Transcription factors, Facteurs de transcription	55
TGF-β: Transforming growth factor β	22
TKR: Tyrosine kinase receptors	61
TNF-α: Tumor necrosis factor- α	76
TPR: Thromboxane prostanoid receptor, Récepteur des thromboxanes et prostanoides	22
TXA₂: Thromboxane A ₂	23
TX-S: Thromboxane synthase	23
U- NFκB: Unphosphorylated NF κ B	185
U-STAT3: Unphosphorylated STAT3	185
VDAC: voltage-dependant anionic channel, canal anionique voltage dépendant	58
VEGF Vascular Endothelial Growth Factor	76
VIP: Vasoactive intestinal peptide	25
VOC: Voltage-operated Ca ²⁺ channels, Canaux calciques dependants du voltage	16
VSMC: Vascular Smooth Muscle Cell, Cellules musculaires lisses vasculaires	15
WHO: World Health Organisation, Organisation mondiale de la Santé	26

LISTE DES TABLEAUX

Table 1- 1: Classification clinique des PHT selon l'Organisation mondiale de la Santé.	26
Table 2- 1: Patients providing blood (buffy coat) and lung tissue:	82

LISTE DES EQUATIONS

Equation 1- 1: Calcul de Débit cardiaque Q (L/min)	5
Equation 1- 2: Détermination des résistances R en fonction de la loi de Poiseuille (Dynes).....	7
Equation 1- 3: Calcul de la pression artérielle AP (mmHg)	8
Equation 1- 4: Calcul de la pression artérielle en tenant compte de la loi de Poiseuille.	8

LISTE DES FIGURES

CHAPITRE 1 :

Figure 1- 1: Anatomie du cœur humain.	4
Figure 1- 2: Anatomie comparée d'une artère et d'une veine de moyen calibre.	10
Figure 1- 3: Distribution du débit sanguin pulmonaire et pressions transmuraux des vaisseaux pulmonaires.	13
Figure 1- 4: Vue simplifiée de la contraction des VSMCs.	18
Figure 1- 5: Vue simplifiée de la relaxation des VSMCs	19
Figure 1- 6: Régulation de la constriction/relaxation des cellules musculaires lisses par les composés endothéliaux. Inspirée de Humbert et al, New England Journal of Medicine 2004 ³⁶	21
Figure 1- 7: Schéma de la progression théorique de la maladie vasculaire et du subséquent effet sur la fonction du ventricule droit RV. Champion et al. Circulation 2009 ¹⁴³	34
Figure 1- 8 : Atteinte évolutive de la paroi des artères pulmonaires. Humbert.....	47
Figure 1- 9: « Sceau » du cancer décrit par Hanahan and Weinberg en 2011 ²³⁹	53
Figure 1- 10: Métabolisme mitochondrial et apoptose dépendante des mitochondries.	60
Figure 1- 11: Biosynthèse des microARNs et mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.....	66
Figure 1- 12: Le cycle migratoire.	71

CHAPITRE 2:

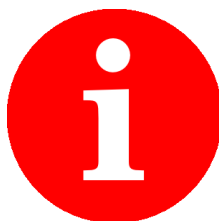
Figure 2- 1: The STAT3/Pim1 axis is activated in Human PAH.....	88
Figure 2- 2: Pim1 is implicated in the regulation of both PASM proliferation and apoptosis.	91
Figure 2- 3: The STAT3/Pim1 axis accounts for NFATc2 expression and activation in PAH-PASMs.	94
Figure 2- 4: Pim1 expression is increased in the monocrotaline-injected rat PAH model.....	98
Figure 2- 5: Pim1 inhibition reverses MCT-PAH.....	99
Figure 2- 6: Pim1 knock out mice are resistant to MCTP and CH-PAH.	101
Figure 2- 7: Proposed mechanism on the role of the STAT3/Pim1 axis in PAH.....	105
Supplemental Figure 2- 1: Pim1 expression correlates with PAH severity in humans PAs and buffy coat. ...	109
Supplemental Figure 2- 2: STAT3 binds to the 3' region of Pim1 gene.....	109
Supplemental Figure 2- 3: Role of the STAT and Akt pathways in human PAH.....	110
Supplemental Figure 2- 4: Role of STAT3/Pim1 in PASM proliferation and apoptosis.	112
Supplemental Figure 2- 5: Pim1 inhibition decreases NFATc2 activation in PAH-PASMs.....	112
Supplemental Figure 2- 6: Pim1 expression is increase in MCT-induced PAH in rat and is confined to the PASMs.....	114
Supplemental Figure 2- 7: Pim1 expression in rat Buffy coat and tissues.....	116
Supplemental Figure 2- 8: Pim1 inhibition affects only the pulmonary arteries reversing PAH.....	118
Supplemental Figure 2- 9: Pim1 K.O mice are resistant to PAH.....	120
Supplemental Figure 2- 10: STAT3 and NFATc2 activation in Pim1 K.O.	121
Supplemental Figure 2- 11: Efficiency of Pim1 siRNA, adenoviruses, STAT3 siRNA and antibody immunofluorescence specificity.....	123

CHAPITRE 3

Figure 3- 1: FAK is activated in PAH-PASMs.	136
Figure 3- 2: FAK inhibition decreases proliferation and enhances apoptosis.	138
Figure 3- 3: FAK inhibition decreases PAH-PASMs motility.	141
Figure 3- 4: Nebulized silencer RNA directed against FAK reverses MCT-PAH.....	145
Figure 3- 5: Efficient FAK inhibition is associated with Src/STAT3 inhibition.	147

CHAPITRE 4

Figure 4- 1: DHEA decreases Src/STAT3 activation in PAH-PASMCs.	161
Figure 4- 2: DHEA effects on STAT3 downstream targets and proliferation/apoptosis rates.	163
Figure 4- 3: DHEA inhibits IL-6-dependent STAT3 activation.	167
Figure 4- 4: DHEA and silencer RNA directed against STAT3 reverses MCT-PAH	170
Figure 4- 5: DHEA decreases Src/STAT3 activation in lung and distal PA in vivo.	172
Figure 4- 6: DHEA restores expression/activity of STAT3 downstream targets aberrantly expressed/activated in experimental PAH.	173
Figure 4- 7: DHEA decreases proliferation and increases apoptosis in MCT-PAH distal PAs.	174



Un index est à votre disposition en fin de manuscrit. Les mots définis dans le lexique apparaissent dans le texte avec ce symbole: ⁱ

LE SAVIEZ-VOUS.

Ces capsules vous renseigneront en cours de lecture sur des faits historiques ou des anecdotes en liens avec le sujet abordé.

CHAPITRE 1: INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

1.1. Physiologie cardio-pulmonaire.

1.1.1. Le cœur.

Le corps humain est parcouru par un système cardio-circulatoire distribuant le sang dans l'organisme et dont la finalité est d'alimenter les organes en nutriments et oxygène et de collecter les déchets métaboliques comme le dioxyde de carbone et l'urée libérés par les cellules. Ce sang est véhiculé par une pompe, le cœur, qui doit maintenir un débit continu au sein de l'appareil circulatoire.

1.1.1.1. Structure.

Le cœur est un organe creux dont la paroi comprend trois couches, de l'extérieur vers l'intérieur : le péricarde, véritable enveloppe protectrice, le myocarde, couche musculaire qui permet la contraction cardiaque, et enfin l'endocarde, qui assure un rôle mécanique en facilitant l'écoulement du sang. Il mesure de 14 à 16 cm et son diamètre est de 12 à 14 cm. Un peu moins gros chez la femme que chez l'homme, le cœur d'un adulte pèse de 300 à 350 grammes. Il consiste en deux parties le cœur droit et le cœur gauche, séparées par le septum et chacune d'elles est composée d'une oreillette et d'un ventricule. Des valves entre les oreillettes et les ventricules assurent le passage unidirectionnel en évitant les reflux. Les parois des ventricules sont plus épaisses que celles des oreillettes et la force de contraction est plus importante car leur fonction est nécessaire pour l'éjection le sang vers le corps ou vers les poumons. Selon que le sang va vers le corps ou vers les poumons, la circulation sanguine est divisée en deux circuits bien distincts : la grande circulation, dite systémique, qui dépend du cœur gauche, et la petite circulation, dite pulmonaire, qui est liée au cœur droit.

1.1.1.2. Révolution cardiaque.

Le fonctionnement de cette pompe consiste en une alternance de contraction et de relâchements et l'ensemble des phénomènes dont le cœur est le siège du début d'une contraction jusqu'à la suivante s'appelle une révolution cardiaque.

Une révolution cardiaque comprend trois temps :

- La systole auriculaire : il y a contraction des fibres auriculaires éjectant le sang dans les ventricules, ce qui assure leur remplissage actif.
- La systole ventriculaire : il y a cette fois contraction ventriculaire, entraînant une élévation de la pression intraventriculaire et la fermeture subséquente des valves auriculo-ventriculaires, évitant le reflux du sang vers les oreillettes. Il y a d'autre part ouverture des valves sigmoïdes aortiques et pulmonaires, permettant la distribution du sang vers les circulations systémiques et pulmonaires, respectivement. C'est la valeur de la pression intraventriculaire qui régule cette étape. En effet, lorsqu'elle dépasse la pression artérielle, les valvules sigmoïdes s'ouvrent, et inversement, lorsque le ventricule se relâche, la pression intraventriculaire baisse et les valves sigmoïdes se referment.
- La diastole générale: temps de relâchement du cœur pendant lequel oreillettes et ventricules se remplissent de sang passivement. Plus de 80% du remplissage est effectué usuellement pendant la diastole.

1.1.1.3. Trajet du sang dans le cœur.

Le sang appauvri en oxygène après son passage dans l'organisme entre dans l'oreillette droite par trois veines : la veine cave supérieure, la veine cave inférieure et le sinus coronaire. Le sang passe ensuite dans le ventricule droit (RV) et est amené aux poumons par l'artère pulmonaire (PA) au cours de la systole. Il y est déchargé du dioxyde de carbone et oxygéné, puis il va rejoindre l'oreillette gauche par la veine pulmonaire au cours de la diastole suivante. Le sang entre dans le ventricule gauche (LV), la chambre pompante principale, ayant pour rôle d'envoyer le sang par l'aorte pour l'alimentation des organes (sauf les poumons). Le LV est bien plus massif que le RV car il doit exercer une force considérable pour forcer le sang à traverser tout le corps tandis que le RV ne dessert que les poumons.

Le cœur lui même a besoin d'être irrigué, nourri. Ce sont les artères coronaires, dérivant de l'aorte et dont la circulation est dite diastolique, qui amènent au cœur une importante quantité de sang.

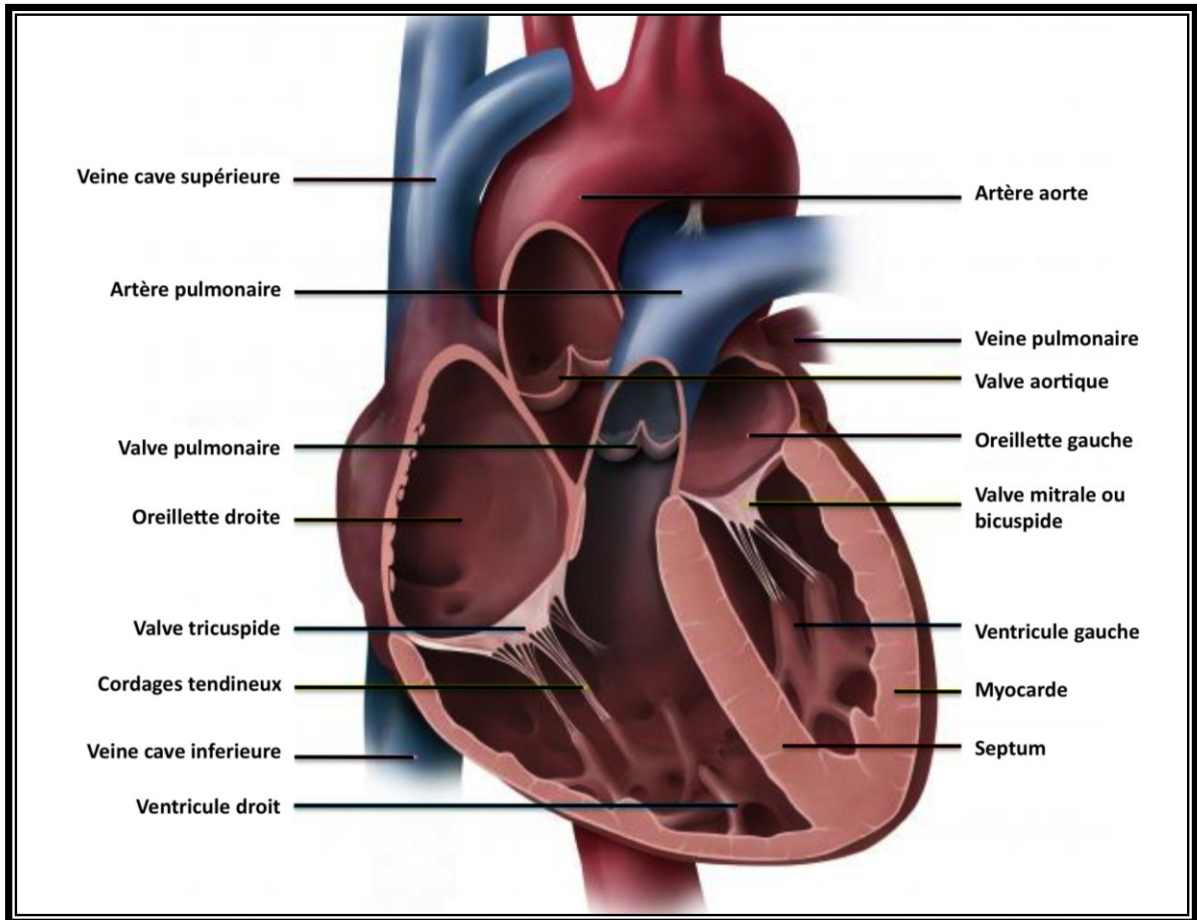


Figure 1- 1: Anatomie du cœur humain.

Le sang appauvri en oxygène entre dans l'oreillette droite par la veine cave supérieure, la veine cave inférieure et le sinus coronaire. Le sang passe ensuite dans le ventricule droit et éjecté dans l'artère pulmonaire au cours de la systole. Dans les poumons, il est déchargé du dioxyde de carbone et oxygéné, puis il va rejoindre l'oreillette gauche par la veine pulmonaire au cours de la diastole suivante. Le sang entre dans le ventricule gauche, puis est expulsé dans l'aorte pour l'alimentation des organes.

1.1.1.4. Débit cardiaque

Le débit cardiaque (Q), comme tout autre débit, correspond à un volume éjecté par unité de temps. Le volume de sang éjecté ou d'éjection systolique (ESV) est la plupart du temps exprimé en millilitres (ml) et correspond à la différence entre le volume de sang en fin de diastole (c'est-à-dire juste avant éjection appelé volume télédiastolique, environ 160mL dans le LV) et le volume de sang en fin de systole (c'est-à-dire juste après éjection du sang et avant le remplissage suivant, environ 60mL dans le LV). Il dépend d'une multitude de facteurs, notamment de la taille du cœur, de son remplissage, de la force et de la durée de la contraction et de la résistance à l'éjection du sang dans la circulation. Chez

l'homme il est proche de 100mL pour le LV (varie entre environ 70ml au repos et 150ml chez le sportif en plein effort). Un entraînement à long terme augmente le ESV.

La composante unité de temps est apportée par le nombre de battements cardiaque par minutes, soit la fréquence cardiaque (HR). Chez l'adulte en bonne santé, au repos, le pouls se situe entre 50 (sportif pratiquant l'endurance) et 80 pulsations par minute. Pendant un effort, la fréquence cardiaque maximale théorique est de 220 moins l'âge (exemple : 180 à 40 ans).

$$Q = \text{ESV} \times \text{HR}$$

Equation 1- 1: Calcul de Débit cardiaque Q (L/min)

ESV est le volume d'éjection systolique et HR la fréquence cardiaque

Le débit cardiaque normal pour un adulte de surface corporelle moyenne est d'environ 5,25 L/min, soit environ le volume sanguin total. La quantité de sang expulsée par chacun des ventricules par minute et par mètre carré de surface corporelle est également appelée index cardiaque.

1.1.1.5. Pré-charge/post-charge et Loi de Starling

La pré-charge caractérise les conditions de remplissage des ventricules. Cette pré-charge est quantifiée par la mesure de la pression en fin de diastole du circuit sanguin (volume télédiastolique). La loi de Starling décrit le fonctionnement du ventricule cardiaque et statue que le cœur s'adapte à la pré-charge en changeant sa force de contraction. Le cœur peut se contracter d'autant plus énergiquement qu'il reçoit une quantité plus grande de sang.

La post-charge, c'est le frein à l'éjection, donc la force que doit vaincre le myocarde pour éjecter le sang et elle peut être appréciée indirectement par la résistance à l'éjection (la pression artérielle est une appréciation approximative de la post-charge). Si la post-charge est augmentée, le volume d'éjection systolique baisse et donc le volume résiduel augmente, le volume de remplissage augmente et donc la pression développée par le ventricule augmente de façon instantanée.

Lorsque la post-charge augmente de façon importante et prolongée, cela peut entraîner une insuffisance cardiaque. Elle est typiquement augmentée au cours de l'hypertension artérielle, du rétrécissement de la valve aortique ainsi que lors de certaines cardiomyopathies (cardiomyopathies obstructives).

1.1.1.6. La fraction d'éjection.

La capacité du cœur à se contracter efficacement se mesure par la fraction d'éjection (EF), soit le ratio entre le ESV et le volume d'éjection diastolique (EDV). Elle est de l'ordre de 60 % chez l'individu normal et est diminuée en cas d'anomalie de la contractilité, pouvant descendre jusqu'à 20 % en cas de dysfonction majeure comme une insuffisance cardiaque. Lorsque la fraction d'éjection est diminuée, l'organisme peut maintenir le débit cardiaque Q de deux manières : en augmentant la fréquence cardiaque HR et en maintenant un ESV constant en augmentant le EDV. L'augmentation du EDV a pour conséquence visible une augmentation de la taille du cœur. Lorsque ces mécanismes de compensation sont dépassés, le débit cardiaque Q diminue et devient insuffisant pour les besoins de l'organisme.

1.1.2. La circulation.

Veines et artères remplissent des rôles différents. Par définition, une veine est un vaisseau contenant le sang allant des tissus vers le cœur alors qu'une artère est un vaisseau contenant le sang allant du cœur aux tissus. Dans la circulation systémique, les artères apportent du sang oxygéné, alors que dans la circulation pulmonaire, les artères transportent du sang pauvre en oxygène. Au fur et à mesure que l'on s'éloigne du cœur, le calibre des veines et artères diminue et elles se subdivisent pour donner l'arbre artériel ou veineux. Elles deviennent progressivement des artérioles ou veinules, puis des capillaires au niveau desquels se font les échanges gazeux.

1.1.2.1. Système artériel

1.1.2.1.1. Compliance

Le volume de sang éjecté durant la systole ventriculaire dans les artères crée un débit sanguin pulsatile à la sortie du cœur. La progression de l'onde de sang le long de l'arbre artériel s'accompagne d'un amortissement de cette onde de débit et la transformation progressive du débit pulsatile en un débit continu au niveau tissulaire. Ce

phénomène, appelé Effet Windkessel et décrit par Otto Frank en 1899 est directement lié aux propriétés élastiques intrinsèques que présentent les artères, qui se déforment pour accueillir l'onde de débit, la propager et amortir ses pulsations : élasticité et compliance artérielle.

1.1.2.1.2. Résistances vasculaires.

Le sang propulsé dans la circulation doit faire face à la résistance imposée par le système circulatoire, la post-charge. Le principal facteur influençant cette résistance est la tonicité artériolaire, au niveau de la transition artério-capillaire (le diamètre passe de 450µm à moins de 100µm). Cette zone du lit artériel est le siège de phénomène de contraction et dilatation vasculaires modulées par le système nerveux autonome et diverses hormones circulantes. Ces variations du diamètre des artérioles modulent les résistances vasculaires de façon subséquente et donc le débit sanguin local, permettant ainsi une adaptation du débit aux besoins de chaque organe.

Les résistances dépendent également du sang en lui-même. Le sang est un fluide non Newtonien dont la viscosité augmente dans les petits vaisseaux du fait de l'agglomération réversible des érythrocytes. La loi de Poiseuille (également appelée loi de Hagen-Poiseuille) décrit l'écoulement laminaire d'un liquide visqueux dans une conduite cylindrique. Cette loi a démontré que la résistance tenant compte de cette viscosité pouvait être calculée par l'équation :

$$R = \frac{8\eta L}{\pi r^4}$$

Equation 1- 2: Détermination des résistances R en fonction de la loi de Poiseuille (Dynes).

L est la longueur de la portion cylindrique, r est son rayon et η est la viscosité du liquide, une mesure de sa résistance à l'écoulement.

1.1.2.1.3. Pression Artérielle.

La pression régnant sur la paroi interne des vaisseaux pendant la circulation sanguine, est variable selon que l'on est systole ou diastole d'une part, et selon que l'on est dans le système artériel ou veineux d'autre part.

Elle est physiologiquement définie par la formule :

$$AP = RQ$$

Equation 1- 3: Calcul de la pression artérielle AP (mmHg)

Q est le débit cardiaque et R les résistances périphériques, essentiellement artériolaires.

En tenant compte de la Loi de Poiseuille, cette équation devient :

$$AP = \frac{8\eta L}{\pi r^4} Q$$

Equation 1- 4: Calcul de la pression artérielle en tenant compte de la loi de Poiseuille.

L est la longueur de la portion cylindrique, r est son rayon et η est la viscosité du liquide, une mesure de sa résistance à l'écoulement, et Q est le débit.

C'est une variable entre deux extrêmes : la pression artérielle systolique (SAP) et la pression artérielle diastolique (DAP). La SAP résulte de l'activité du cœur pendant l'éjection sanguine systolique contre les résistances périphériques, on l'appelle encore en langage courant " maxima ". La DAP dépend seulement des résistances périphériques et de la volémie ; c'est en langage courant la " minima ". Entre ces deux valeurs de SAP et de DAP, on a la pression différentielle ou pression pulsée, c'est elle qui donne la sensation du pouls. La pression différentielle augmente lorsque la compliance artérielle diminue.

LE SAVIEZ-VOUS

C'est Imhotep en 2980 avant JC, qui aurait pour la première fois fait l'observation anatomique de la présence d'une pulsation artérielle. Ceci est décrit dans le Papyrus Edwin Smith, découvert par Edwin Smith à Thèbes en 1862 et désormais conservé à New York. Imhotep était un homme aux multiples talents. Considéré comme le fondateur de la Médecine égyptienne il est également reconnu architecturalement pour l'invention de la pyramide à degrés comme tombeau et demeure d'éternité du Roi.

1.1.2.1.4. Anatomie de la paroi

Comme de tout autre vaisseau, la paroi artérielle est répartie en intima, media et adventice, mais la composition de chaque couche est spécifique du fait des hautes pressions qui parcourent les artères (Figure 1-2).

L'adventice est située en périphérie, elle est composée de tissu conjonctif, de fibres de collagène et d'élastine ainsi que de cellules adipeuses (adipocytes). L'adventice reçoit les éléments fonctionnels de l'artère : les terminaisons nerveuses à l'origine de la vasomotricité et les petits vaisseaux ou vasa vasorum qui irriguent la paroi. Elle jouerait un rôle mécanique de soutien architectural de la paroi dans le cas d'une media affaiblie ou absente.

La media, centrale, est composée de (Figure1-3):

- fibres musculaires lisses particulièrement riches dans les petites artères et les artérioles, vaisseaux résistifs précapillaires ; elles y assurent la vasomotricité.
- fibres de collagène qui s'opposent à des augmentations importantes de volume.
- fibres d'élastine qui donnent à l'artère sa propriété de compliance. Dans le cas des artères, il existe une limitante élastique interne circulaire et externe longitudinale.

Plus le rapport élastine/collagène est élevé, plus l'artère est étirable.

L'intima, en contact direct avec le sang, est constituée d'un endothélium et d'une couche sous endothéliale de tissu conjonctif lâche, séparés par une lame basale. Les cellules

endothéliales sont disposées en mosaïque, orientées selon le sens de l'écoulement sanguin et en fonction des contraintes de cisaillement. L'intima possède trois fonctions principales :

- son intégrité et étanchéité empêche le développement de réactions d'hémostase entre le sang circulant et les constituants pariétaux sous-jacents; il représente une surface thromborésistante;
- filtration et transport actif des constituants sanguins qui nourrissent la media ;
- production de substances contribuant à la vasomotricité.

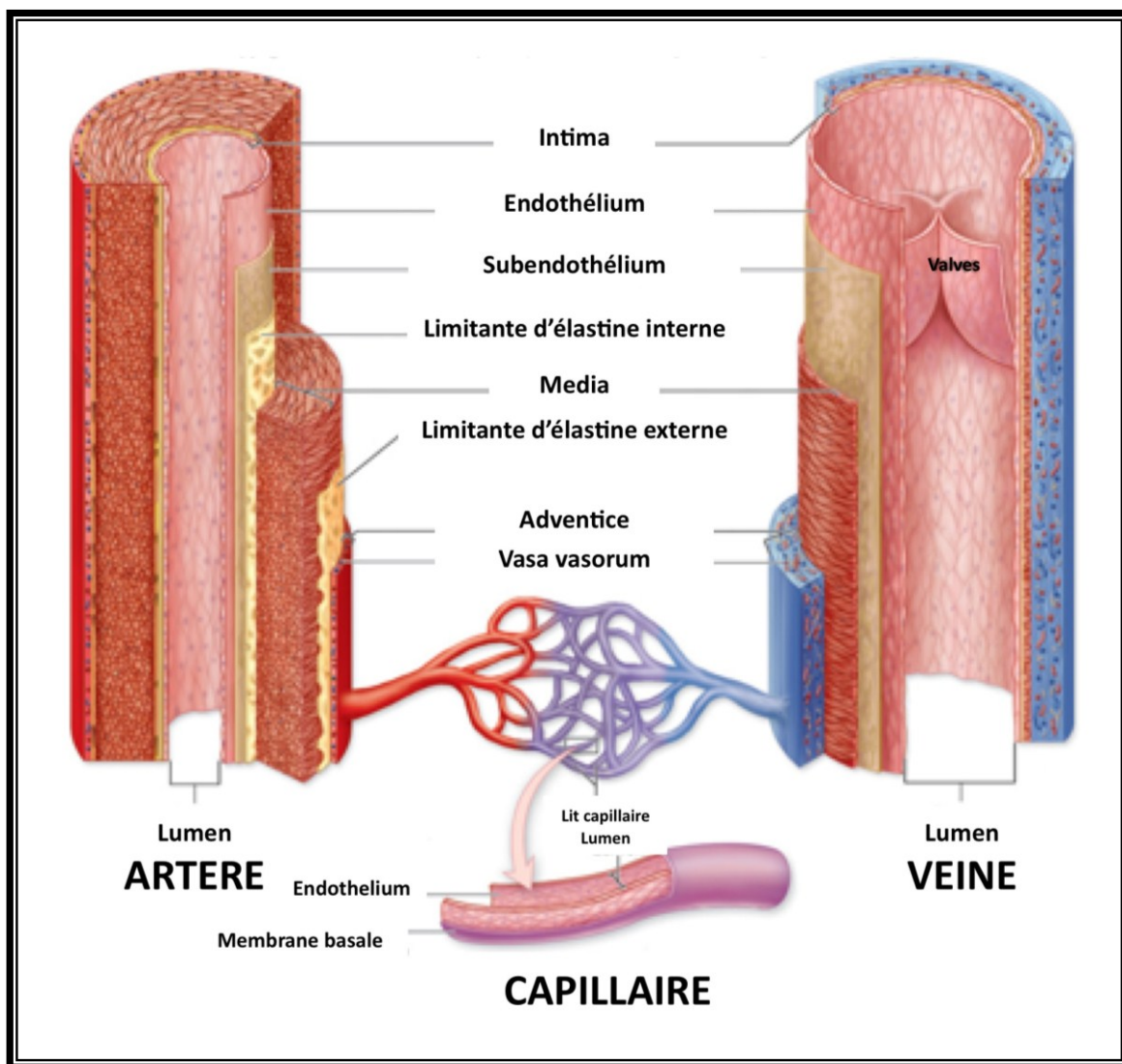


Figure 1- 2: Anatomie comparée d'une artère et d'une veine de moyen calibre.

L'endothélium, constitué d'une monocouche de cellules, a longtemps été considéré comme une surface inerte ayant un rôle limité à la perméabilité. L'endothélium présente en plus un rôle protecteur contre la vasoconstriction, la thrombose et la prolifération des cellules musculaires lisses de la paroi artérielle. Le rôle de l'endothélium dans la vasomotricité fait intervenir plusieurs substances, synthétisées par l'endothélium lui-même ou résultant de la transformation de molécules circulantes. Parmi ces substances, il existe : la prostacycline, le monoxyde d'azote (NO), l'endothéline-1, l'angiotensine-1, la bradykinine.

1.1.2.2. Particularités de la circulation artérielle pulmonaire.

1.1.2.2.1. Généralités

En ce qui concerne le circuit pulmonaire, le sang quitte le cœur par le tronc pulmonaire qui se divise immédiatement en artère pulmonaire gauche et droite. Chacune de ces deux artères se dirige alors vers les poumons pour se ramifier en autant de branches que la bronche qu'elle accompagne, appelées artérioles lobaires. Ces artérioles se ramifient en de nombreux lits capillaires au niveau des alvéoles pulmonaires. En continuité, les capillaires se regroupent en veinules lesquelles se déverseront dans des veines plus grosses qui se regroupent pour former les quatre veines pulmonaires qui ramènent le sang vers le cœur. Ce réseau fonctionnel est complété par un réseau d'irrigation nutritionnel des bronches et du tissu bronchique (circulation bronchique) dont la partie artérielle est reliée à l'aorte et la partie veineuse aux veines pulmonaires.

Ce circuit n'est pas bien long; c'est pourquoi on en parle comme de la petite circulation mais son rôle est primordial puisque c'est au niveau des poumons que le sang se charge d'oxygène et se débarrasse du gaz carbonique prit au niveau des cellules lors des combustions cellulaires.

1.1.2.2.2. Relation Pression/Débit

Le circuit systémique allant du ventricule gauche en systole jusqu'aux artérioles est un système à haute pression, forte résistance et faible compliance dit résistif. La circulation pulmonaire assure elle le passage de la totalité du débit cardiaque avec une pression artérielle 5 à 7 fois plus basse que la pression artérielle systémique. Elle représente donc un système à basse pression, faibles résistances et compliance élevée dit capacitif (tout

comme le système veineux, le cœur droit et le cœur gauche en diastole). Cette diminution de la résistance dans les vaisseaux pulmonaires n'est ni un réflexe autonome, ni une réponse hormonale mais plutôt une réponse passive face à l'augmentation des pressions. Deux phénomènes peuvent être impliqués : le recrutement de nouveaux vaisseaux et la distension de vaisseaux déjà ouverts. Le recrutement passif des vaisseaux pulmonaires est possible car la circulation pulmonaire est sujette, en position debout, à l'action de la gravité¹ et aux effets de la pression barométrique. La pression produite par le cœur droit n'est pas supérieure à la pression barométrique et la taille du poumon fait qu'il existe un gradient hydrostatique important entre le sommet et la base, à l'intérieur des vaisseaux. De plus, les capillaires sont très compliants et leurs parois sont exposées à la pression alvéolaire, qui elle, est uniforme du sommet à la base des poumons. C'est donc la différence entre la pression sanguine et alvéolaire qui va déterminer leur ouverture, et donc le débit pulmonaire (Figure 1-3).

1.1.2.2.3. Anatomie

En accord avec les faibles pressions s'exerçant dans le circuit pulmonaire, les parois des artères pulmonaires et de ses branches, sont plus minces et contiennent relativement peu de muscles lisses contrairement au système aortique.

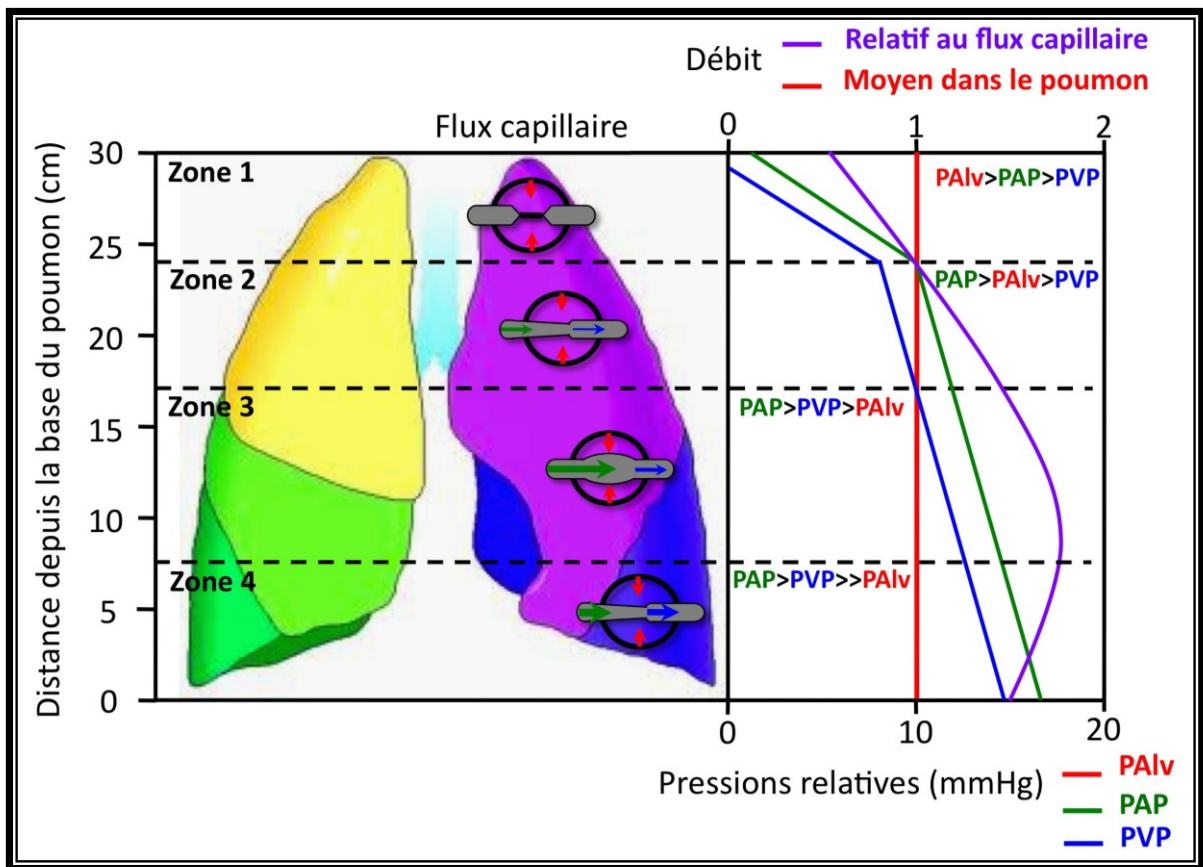


Figure 1- 3: Distribution du débit sanguin pulmonaire et pressions transmursales des vaisseaux pulmonaires.

Chez un individu en position debout, la pression alvéolaire qui s'applique sur les parois des capillaires (externes) est équivalente à la pression barométrique, et identique de haut en bas des poumons. Les pressions sanguines pulmonaires, artérielles (PAP) et veineuses (PVP), sont elles sujettes à la gravité et diminuent de bas en haut. Au sommet (zone 1), la $PAIv$ (environ 10mmHg) est supérieure à la PAP, les vaisseaux sont donc collapsés et le débit est faible ou nul. Dans la zone 2, la PAP devient supérieure à la $PAIv$, le débit dépend donc de la différence entre les deux pressions et augmente. A la base (zone 3) la PAP et la PVP sont supérieures à la $PAIv$, le débit dépend donc de la différence entre PAP et PVP, les vaisseaux sont largement ouverts, le débit augmente encore. Dans la zone 4, la $PAIv$ devient sans action face à l'augmentation de la PAP et PVP, l'ouverture des vaisseaux est intermédiaire, le débit est plus faible que dans la zone 3.

1.1.2.3. Le système veineux

1.1.2.3.1. Remontée du sang veineux.

Les vaisseaux du système veineux ramènent le sang au cœur. Un flux veineux normal dépend de quatre facteurs : le cœur (flux dynamique ou spontané), la respiration (le flux rythmé), la pompe musculaire et les valvules.

L'ensemble de la force du flux rythmé produit par l'action de pompage du cœur est perdu lorsque le sang s'écoule depuis les artères à travers le vaste réseau de capillaires. La pression résiduelle du flux dynamique en sortie des capillaires est basse, environ 15mmHg. Elle suffit cependant pour produire un gradient de pression considérable par rapport à celle du côté droit du cœur où la pression veineuse est de 0. Le système veineux fonctionne donc à basse pression, et son flux dépend beaucoup moins de l'action de pompage du cœur.

Les veines profondes et superficielles sont équipées de valvules ou clapets, disposés tous les quatre à cinq centimètres et qui imposent un sens unique de circulation du sang en empêchant le reflux. Néanmoins, la remontée du sang des pieds vers le cœur nécessite l'intervention de plusieurs mécanismes qui vont faciliter le phénomène.

La compression de la voûte plantaire ainsi que la contraction des muscles des mollets et des cuisses sont deux mécanismes qui chassent le sang vers le haut. C'est dans les muscles du mollet que le mécanisme de la pompe musculaire est le plus développé pouvant produire une pression de plus de 200mmHg. Cette pression est suffisante pour expulser le sang des sinusoides jusqu'aux veines profondes. Celles-ci subissent à leur tour une force de compression similaire en raison du fort fascia qui recouvre le compartiment musculaire qui les contient. Ainsi, à chaque contraction musculaire, le sang est poussé vers le cœur.

Les mouvements respiratoires diminuent la pression au sein du thorax lors de chaque inspiration, de façon à faciliter le retour veineux. Dans les bras et le cou, le flux vers le cœur augmente durant l'inspiration en raison de la pression intrathoracique négative qu'elle produit. Le contraire est vrai dans les jambes. Lors de l'inspiration, le diaphragme descend, ce qui augmente la pression intrabdominale et ralentit le flux. Le flux augmente quelque peu avec l'expiration, puisque celle-ci s'accompagne d'une réduction de la pression intra-abdominale.

1.1.2.3.2. Anatomie

A l'exception des veines superficielles principales, les veines ont de minces parois présentant peu de muscles. Elles sont formées de trois couches comme les artères, mais leur couche musculaire est beaucoup plus réduite. Les parois des principales veines superficielles des extrémités sont plus épaisses que celles des veines profondes. De plus, puisqu'elles sont conçues pour la distension, elles contribuent peu à faciliter le flux.

En temps normal, les veines sont seulement partiellement remplies de sang. Leur aire transversale est trois fois supérieure à celle des artères correspondantes.

1.1.3. Vasoconstriction/relaxation artérielle.

1.1.3.1. Mécanismes contractiles des cellules musculaires lisses vasculaires.

1.1.3.1.1. Mécanismes dépendants du calcium.

La cellule musculaire lisse vasculaire (Vascular smooth muscle cells, VSMCs) est une cellule très spécialisée dont la fonction primaire est la contraction et la relaxation. Ce phénotype contractile est nécessaire pour l'accomplissement de la fonction primaire de nombreux organes, dont le réseau vasculaire^{2, 3}. La contraction est initiée par des changements au niveau de l'interaction entre les fibres d'actine et de myosine⁴. Ce phénomène est contrôlé par une phosphorylation sur le résidu sérique 19 de la chaîne légère de myosine (Myosin Light Chain, MLC) qui rend l'interaction entre les deux partenaires impossible. Cette phosphorylation est dépendante de l'activité d'une kinase, la MLC kinase (MLCK) qui est elle-même régulée par le système Ca^{2+} /calmodulin (CaM). De nombreuses voies de signalisation régulant le calcium ont donc été décrites comme impliquées dans la régulation de la contractilité des VSMCs. Le plus souvent, des agonistes neuronaux et hormonaux transmettent un signal au niveau de récepteurs couplés aux protéines G et à la phospholipase C (PLC), amenant à la production de second messager de type inositol-1,4,5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). Ensuite, l'IP₃ peut se lier au récepteur du réticulum sarcoplasmique (Sarcoplasmic reticulum SR) et entraîner la libération de calcium dans le cytosol de la cellule. La première cible de cette montée de Ca^{2+} intra-cellulaire est la CaM.

Une fois les réserves internes de Ca^{2+} épuisées, le maintien de l'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} dans la VSMC dépend de l'entrée de Ca^{2+} au niveau de la membrane plasmique, un phénomène requis pour que les stocks internes de Ca^{2+} soient restaurés. Le Ca^{2+} entre soit par des canaux calciques voltage dépendants de type L et T (voltage-operated Ca^{2+} channels VOC L- et T-type) ou des canaux non dépendants du voltage (non-voltage-operated Ca^{2+} channels non-VOC)⁵.

L'ouverture des VOC est donc dépendante du potentiel de membrane (E_m) et est stimulée par une dépolarisation de la membrane plasmique^{6, 7}. Comme le E_m est principalement gouverné par la perméabilité en potassium de la membrane plasmique⁸, l'activation des VOC est régulée par les canaux potassiques. Dans les VSMCs, au moins 5 types de canaux K^+ ont été décrits mais ce sont les canaux K^+ dépendants du voltage (K_v) qui sont responsables de la maintenance du potentiel de membrane⁹⁻¹¹. La conductance, la probabilité d'ouverture et l'expression sont les 3 paramètres des K_v qui régulent l'amplitude des courants potassiques. Une baisse de l'amplitude de ces courants est suffisante pour dépolariser la membrane plasmique d'une VSMCs et causer la contraction de celle-ci.

Un autre type de canaux potassique impliqué dans la maintenance du potentiel de membrane sont les canaux K^+ activés par le Ca^{2+} (Ca^{2+} -activated K^+ channels K_{Ca}), subdivisés en fonction de leur conductance. Les canaux à large conductance (BK_{Ca})¹² sont activés par le Ca^{2+} et l'efflux de K^+ résultant de leur activation peut être utilisé pour contrebalancer une dépolarisation de la membrane plasmique et la contraction.

En ce qui concerne la classe des canaux non-VOC, ils sont divisés en canaux dépendants de la stimulation de récepteurs (receptor-operative Ca^{2+} channels ROC) et dépendants des réserves internes calciques (store-operated Ca^{2+} channels SOC). Les ROCs sont régulés par l'interaction entre un agoniste et un récepteur¹³⁻¹⁵ alors que les SOCs sont activés par une déplétion en calcium provenant du RS^{16, 17}.

1.1.3.1.2. Liens entre les voies de signalisations impliquant le Ca^{2+} et les ROS/RNS

Les espèces réactives d'oxygène et d'azote (reactive oxygen species ROS and reactive nitrogen species RNS) représentent une large classe de molécules régulant de nombreux aspects de biologie des VSMCs comme la contraction, la prolifération et la migration. Les ROS/RNS sont synthétisés au niveau mitochondrial par les NADPH oxydases et NO oxydases¹⁸. De nombreuses enzymes impliquées dans la synthèse des ROS/RNS sont sensibles au Ca^{2+} et un changement dans la signalisation calcique peut rapidement entraîner une modulation de la production des ROS/RNS. De façon réciproque, ROS/RNS peuvent réguler la signalisation calcique des VSMCs par une modification des résidus amino-acides sur des sites spécifiques comme une oxydation des résidus méthionine en sulfoxydes, une nitrosylation des résidus cystéine, une carbonylation et désamination ou encore une nitration. Toutes ces modifications résultent en une altération de la fonction protéique ou en une augmentation de la dégradation des protéines. Dans de nombreux autres types cellulaires, l'action des ROS/RNS sur la signalisation calcique fait intervenir par une inhibition des pompes calciques ainsi qu'une activation des canaux, résultant en une augmentation globale de la concentration calcique intracellulaire^{19,20}.

1.1.3.1.3. Contraction dépendante du calcium

La contraction des VSMCs n'est pas uniquement régulée par le calcium. En effet, l'état de phosphorylation de la MLC est également régulé par la MLC phosphatase (MLCP) dont l'activité est dépendante de RhoA, de la famille des petites protéines G, et de sa cible la kinase Rho (ROCK)²¹. ROCK phosphoryle MLCP et inhibe son activité, favorisant ainsi un état phosphorylé de la MLC et amenant à la contraction (Figure 1-3). De façon plus générale, le second messenger DAG, relâché après activation de la PLC, active la protéine Kinase C (PKC) qui présente dans de nombreux cas un effet pro-contraction. En effet, la PKC est impliquée notamment dans la phosphorylation de la MLCK, ERK1/2, ROCK, de la protéine kinase II dépendante de la CaM, ainsi que nombreux canaux et transporteurs ioniques.

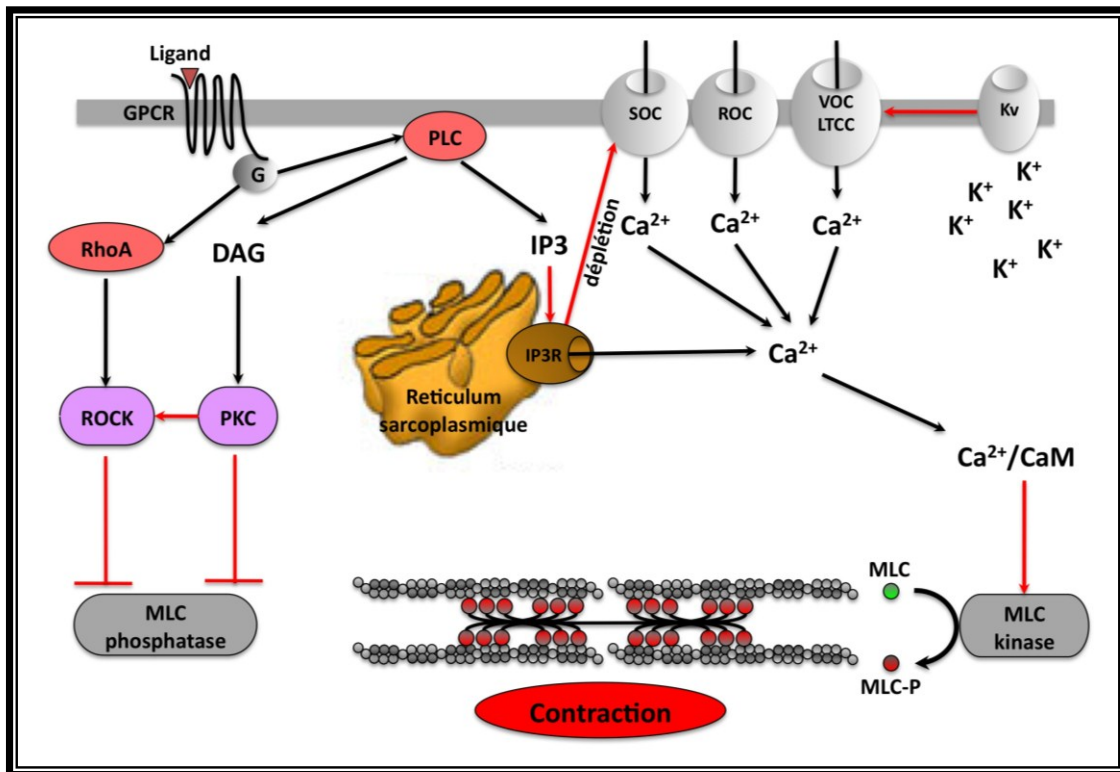


Figure 1- 4: Vue simplifiée de la contraction des VSMCs.

Les agonistes neuronaux ou humoraux se fixent à des récepteurs membranaires couplés à la phospholipase C et entraînent la production des seconds messagers inositol-1, 4, 5-triphosphate (IP₃) et diacylglycérol (DAG). La liaison de l'IP₃ sur son récepteur présent sur le réticulum sarcoplasmique (SR) entraîne une relâche de Ca²⁺ depuis le SR dans cytosol. Ca²⁺ lie la calmoduline (CaM) la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) est activée par le complexe Ca²⁺/CaM. Ceci déclenche la phosphorylation de la MLC, interaction entre myosine et actine et contraction. Comme les stocks internes de Ca²⁺ sont vides, la maintenance de l'augmentation de [Ca²⁺]_i va dépendre de l'entrée de Ca²⁺ par des canaux calciques présents sur la membrane cellulaire et également nécessaire à la reconstitution des stocks internes. Les canaux calciques dépendants du voltage (VOC) s'ouvrent dans le cas d'une dépolarisation de la membrane plasmique, due par exemple à la diminution d'expression ou d'activité des canaux potassiques dépendants du voltage (Kv). L'ouverture des canaux calciques dépendants de récepteurs (ROC) est régulée par la fixation d'un agoniste, celle des canaux calciques dépendants des réserves internes (SOC) par déplétion du SR. L'état de phosphorylation de la MLC dépend également de la phosphatase de la MLC (MLCP). La protéine RhoA, appartenant à la famille des petites protéines G, et sa cible la kinase Rho (ROCK) jouent un rôle important dans la régulation de l'activité de la MLCP. ROCK phosphoryle la MLCP et inhibe son activité, favorisant l'état phosphorylé de la MLC et la contraction. Le second messenger DAG est à l'origine d'une activation de la protéine kinase C (PKC). Dans de nombreux cas, la PKC est pro-contraction par phosphorylation de nombreuses cibles dont ROCK.

Le phénomène contraire à la contraction est la relaxation et fait intervenir des mécanismes limitant l'entrée de Ca^{2+} et favorisant sa clairance. L'entrée de calcium est limitée par une activation fonctionnelle des Kv ou BKCa qui va permettre le maintien du potentiel de membrane. La clairance dépend largement d'ATPases calciques de la membrane plasmique (plasma membrane Ca^{2+} ATPases PMCA) qui vont rejeter le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule²², et d'ATPases présentes sur le SR (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases SERCA) qui vont pomper le Ca^{2+} intracellulaire dans le SR²³ (Figure 1-4).

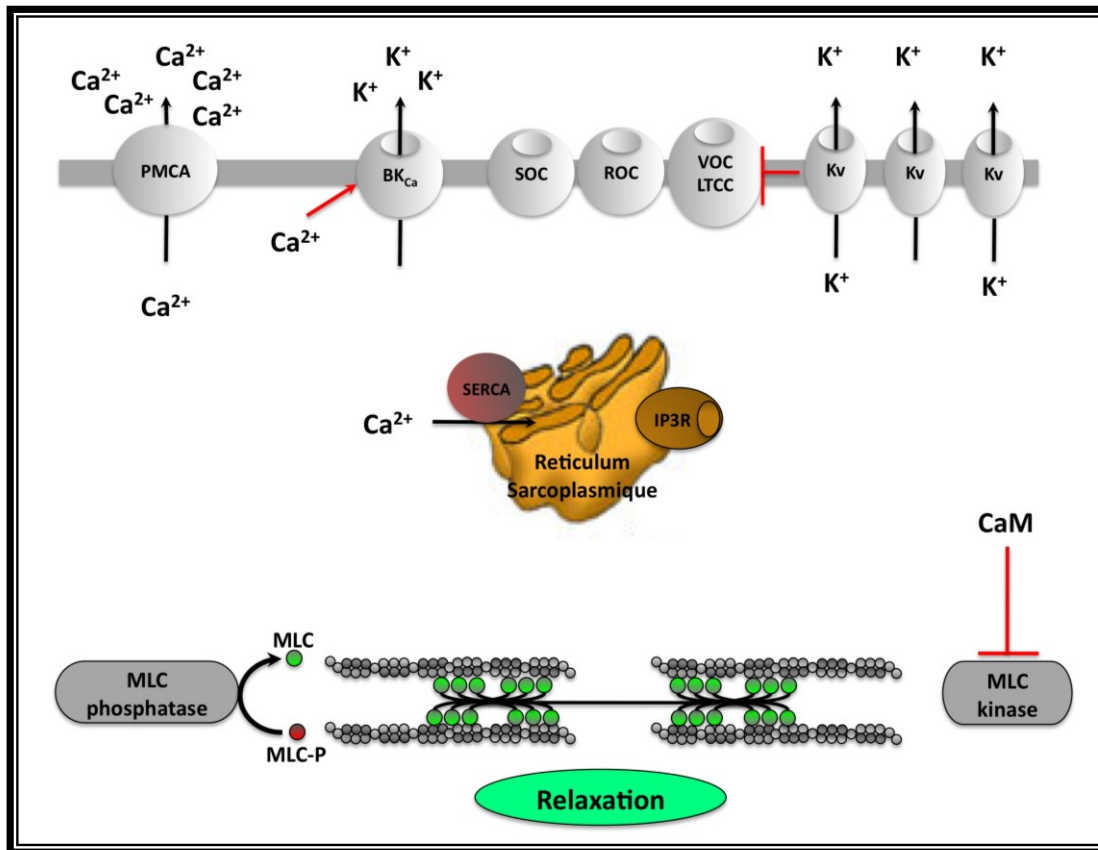


Figure 1- 5: Vue simplifiée de la relaxation des VSMCs

L'entrée de calcium est limitée par une activation fonctionnelle des Kv ou BKCa qui va permettre le maintien du potentiel de membrane. La clairance dépend largement d'ATPases calciques de la membrane plasmique (plasma membrane Ca^{2+} ATPases PMCA) qui vont rejeter le Ca^{2+} à l'extérieur de la cellule, et d'ATPases présentes sur le SR (sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPases SERCA) qui vont pomper le Ca^{2+} intracellulaire dans le SR.

1.1.3.2. Action de l'endothélium.

L'endothélium joue un rôle important dans la régulation des fonctions vasculaires en produisant un très grand nombre de substances actives biologiquement qui participent à la régulation du tonus vasculaire, de la croissance cellulaire, de l'inflammation, de la thrombose et de l'homéostasie. L'action de l'endothélium au niveau du tonus vasculaire passe par une balance entre la production de médiateurs vasoconstricteurs et de médiateurs vasodilatateurs.

1.1.3.2.1. Monoxyde d'azote NO

L'endothélium vasculaire produit du NO à partir de l'arginine par la NO synthase d'origine endothéliale (eNOS). Le NO va induire à la fois une vasodilatation des vaisseaux artériels pulmonaires, une inhibition de la prolifération cellulaire en particulier des cellules musculaires lisses et une régulation négative de la production d'endothéline-1. Le NO est le résultat de la catalyse de la L-arginine en citrulline par la eNOS. Très labile, le NO diffuse vers les cellules musculaires lisses sous jacentes et active la guanylate cyclase cytoplasmique (non membranaire) catalysant la production de Guanosine monophosphate cyclique (cGMP) intra-cellulaire à partir de la Guanosine triphosphate (GTP). C'est le cGMP²⁴ formé qui va entraîner l'effet relaxant sur le muscle lisse (Figure 1-6). Le cGMP active des protéines kinases dépendantes du cGMP²⁵ qui vont entraîner une diminution du taux de Ca²⁺ intracellulaire par:

- Augmentation de l'activité des BK_{Ca}
- Inhibition des VOCS²⁶
- Activation des pompes Ca²⁺/ATPase de la membrane plasmique²⁷
- Activation des pompes Ca²⁺/ATPase du SR²⁸
- Inhibition du récepteur IP₃²⁹
- Inhibition de la synthèse d'IP₃³⁰⁻³²
- Stimulation de l'activité de la MLCP³³
- Inhibition de la PKC³⁴

Le cGMP peut également être hydrolysé en GMP inactif par les phosphodiésterases (PDEs)³⁵, hydrolysant les liaisons phosphodiésters. L'activité PDE, et notamment de la PDE5, est donc importante dans le contrôle des concentrations intracellulaires disponibles de cGMP.

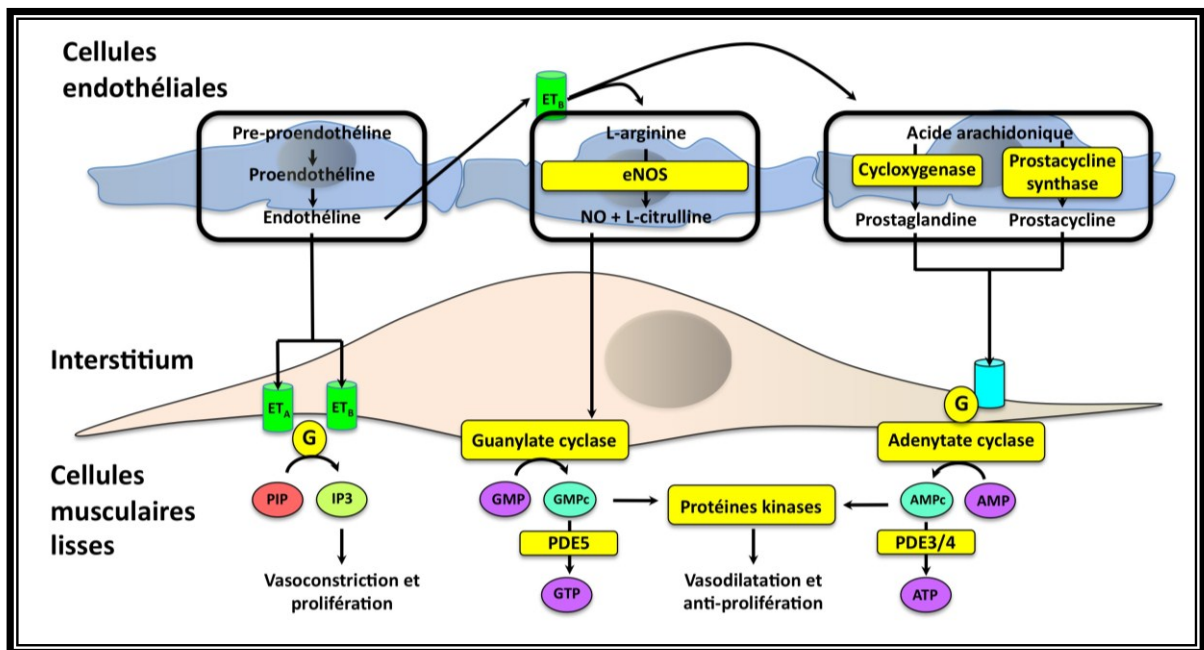


Figure 1- 6: Régulation de la constriction/relaxation des cellules musculaires lisses par les composés endothéliaux. Inspirée de Humbert et al, New England Journal of Medicine 2004³⁶.

L'endothéline-1 (ET-1) est produit par clivages successifs de la préproendothéline puis de la proendothéline. L'ET-1 possède une forte activité vasoconstrictrice et pro-prolifération cellulaire par liaison sur deux récepteurs transmembranaires couplés à des petites protéines G. L'effet de l'ET-1 sur les SMCs par fixation sur les récepteurs A et B fait intervenir l'activation de la PLC et la production de DAG et IP3. L'effet ET-1 sur les cellules endothéliales par le récepteur ET_B entraîne une vasodilatation par l'augmentation de NO et de prostacycline. Le NO va induire à la fois une vasodilatation, une inhibition de la prolifération cellulaire et une régulation négative de la production d'endothéline-1. Le NO est le résultat de la catalyse de la L-arginine en citrulline par la eNOS. Le NO active la guanylate cyclase cytoplasmique (non membranaire) catalysant la production de Guanosine monophosphate cyclique (cGMP) intra-cellulaire à partir de la Guanosine triphosphate (GTP). C'est le cGMP formé qui va entraîner l'effet relaxant sur le muscle lisse. Le cGMP active des protéines kinases dépendantes du cGMP qui vont entraîner une diminution du taux de Ca²⁺. Prostaglandines et prostacyclines dérivent d'acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (AA) par catalyse des cyclooxygénases et prostaglandines/prostacyclines synthases. Ces dérivés exercent un effet vasodilatateur par une cascade signalétique déclenchée après leur fixation sur leurs récepteurs TPR couplés aux protéines G. Ceci active l'adénylate cyclase et la production d'AMP cyclique responsable comme le GMPC d'une diminution de calcium intracellulaire.

1.1.3.2.2. Endothéline -1

L'endothéline-1 (ET-1) est un peptide d'origine endothéliale produit par clivages successifs de la preproendothéline puis de la proendothéline^{37, 38}. L'ET-2 et l'ET-3 sont des isoformes également produites par clivage de ces précurseurs mais l'endothélium produit uniquement la forme ET-1. L'expression de la pré-proendothéline est stimulée par des hormones comme l'épinéphrine, l'angiotensine, des substances dérivées de l'agrégation des plaquettes comme le Transforming growth factor β (TGF- β), des produits de la coagulation comme la thrombine et des cytokines comme l'interleukine (IL)-1^{39, 40}. La production de l'ET-1 est également régulée de façon négative par le NO, la prostaglandine et la prostacycline^{41, 42}. Il a également été montré que les SMCs produisent un facteur inhibiteur, probablement dégradant la proendothéline ou l'ET-1^{43, 44}.

L'ET-1 possède une forte activité vasoconstrictrice, des propriétés d'activation de la prolifération cellulaire et une action proagrégante plaquettaire. Elle agit de façon autocrine et paracrine par liaison sur deux récepteurs transmembranaires couplés à des petites protéines G^{45, 46}. L'ET-1 a une affinité particulière pour le récepteur ET_A exclusivement présent sur les SMCs⁴⁵, mais lie également le récepteur ET_B, présent sur les SMCs ainsi que les cellules endothéliales et qui est capable de lier les autres isoformes d'ET. L'effet de l'ET-1 sur les SMCs par fixation sur les récepteurs A et B fait intervenir l'activation de la PLC et la production de DAG et IP3. L'IP3 entraîne une augmentation de calcium intracellulaire^{47, 48} par recrutement des réserves internes calciques. Le DAG et l'augmentation de calcium intracellulaire stimulent d'un autre côté la PKC et la prolifération⁴⁹.

L'effet ET-1 sur les cellules endothéliales par le récepteur ET_B entraîne une vasodilatation par l'augmentation de NO et de prostacycline⁵⁰⁻⁵⁴.

1.1.3.2.3. Prostanoïdes

Les prostanoïdes sont une sous-classe d'écossanoïdes formés par l'endothélium et activant le récepteur des thromboxanes et prostanoïdes (TPR) présents sur les VSMCs. Les prostanoïdes dérivent d'acides gras insaturés comme l'acide arachidonique (AA), qui est le principal précurseur, ou les acides éicosatriénoïque et éicosapentanoïque. L'AA peut être apporté par l'alimentation ou par dégradation de la phosphatidylcholine dans la membrane

phospholipidique suite à l'activation de la phospholypase A₂ (PLA₂) par une augmentation de la concentration calcique intracellulaire ou stimulation par l'acétylcholine. La seconde étape implique l'activation des cyclooxygénases 1 et 2 (COX) catalysant la transformation de l'AA en prostaglandines endoperoxydes⁵⁵ PGG₂ et PGH₂. La COX-1, exprimée ubiquitairement est responsable la production de base de prostaglandine. L'expression des COX-2, en revanche, est induite par des agents inflammatoires (TNF, cytokines), augmentant la production de prostaglandines en situation d'inflammation. Les prostaglandines endoperoxydes synthétisés à partir de l'AA sont dites de la série indice 2. PGH₂ est le substrat pour diverses enzymes dont prostaglandine synthases menant à la formation des prostaglandines D₂, E₂, F_{2α}, la prostacycline synthase (PGI-S) conduisant à la prostacycline (PGI₂,) et la thromboxanes synthase (TX-S) catalysant la formation de la thromboxanes A₂ (TXA₂).

PGI₂ est le principal produit formé depuis l'AA dans l'endothélium et décrit comme un puissant inhibiteur de l'agrégation plaquettaire, un agent relaxant du muscle lisse vasculaire⁵⁶⁻⁵⁸ et un agent hypotenseur systémique^{59, 60}. Une réponse biphasique à la prostacycline a également été observée sur des vaisseaux isolés, où à faibles doses, PGI₂ a un effet relaxant alors qu'à fortes doses elle a un effet contractant^{61, 62}. Prostaglandines et prostacyclines exercent un effet vasodilatateur par une cascade signalétique déclenchée après leur fixation sur leurs récepteurs TPR couplés aux protéines G. Ceci active l'adénylate cyclase et la production d'AMP cyclique^{63, 64} responsable comme le GMPc d'une diminution de calcium intracellulaire. De même que pour le cGMP, les PDE peuvent hydrolyser le cAMP en AMP et diminuer la disponibilité intracellulaire en cAMP, et donc contrebalancer les effets des prostacyclines. La thromboxane présente elle un effet vasoconstricteur, principalement par activation de la cascade IP₃^{65, 66}.

LE SAVIEZ-VOUS

John Robert Vane remporta en 1982 le prix Nobel de médecine, avec Sune Bergström et Bengt Samuelsson, pour ses travaux sur l'aspirine. Il découvrit son mode d'action, par inhibition de la biosynthèse de la prostaglandine.

1.1.3.2.4. La sérotonine

La sérotonine, encore appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une monoamine, synthétisée par les cellules entérochromaffines du tube digestif et par les neurones sérotoninergiques, puis stockée dans les plaquettes. Elle est fabriquée à partir du tryptophane qui est d'abord convertit en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par la tryptophane hydroxylase. Le 5-HTP est ensuite transformé en 5-HT par la 5-HTP décarboxylase.

La sérotonine agit en se liant à des récepteurs membranaires spécifiques (5-HTR) couplés à des protéines G. On connaît au moins 14 gènes codant ces récepteurs sérotoninergiques 5-HT, capables de donner par épissage alternatif au moins 30 protéines réceptrices différentes⁶⁷. Dans la circulation pulmonaire, l'implication des récepteurs 5-HT_{1B}⁶⁸, 5-HT_{2A} et 5-HT_{2B}⁶⁹⁻⁷¹, et 5-HT₇ a été montrée⁷². Les effets de vasoconstriction et de prolifération cellulaire sont secondaires à l'internalisation de la 5-HT soit par un récepteur, soit par un transporteur (5-HTT)^{73, 74}. L'effet vasoconstricteur au niveau cellulaire se fait via les récepteurs 5-HTR qui activent la phospholipase C par l'intermédiaire d'une protéine G⁷⁴.

1.1.3.3. Régulation par le système nerveux autonome.

Les fibres nerveuses du système autonome aboutissent au niveau de l'adventice et entrent en contact avec les cellules musculaires lisses de la media. Ce système est constitué du système sympathique (impliquant l'adrénaline), du système parasympathique (impliquant l'acétylcholine) et du système dit non-adrénergique non-cholinergique.

1.1.3.3.1. Contrôle adrénergique

Des examens histochimiques et immunohistochimiques ont révélé la présence de terminaisons sympathiques au niveau des artères extrapulmonaires et des veines pulmonaires de nombreuses espèces⁷⁵. La stimulation des récepteurs A induit une vasoconstriction, provoquant une augmentation de la pression artérielle pulmonaire⁷⁶, alors que la stimulation des récepteurs B induit une vasodilatation sur des préparations artérielles pulmonaires isolées de chien⁷⁷.

1.1.3.3.2. Contrôle cholinergique

Contrairement aux voies respiratoires où l'innervation cholinergique est le principal déterminant de la bronchoréactivité, la circulation pulmonaire reçoit peu de terminaisons cholinergiques. Le rôle de la stimulation vagale sur les résistances pulmonaires semble varier selon les espèces. L'acétylcholine provoque des effets antagonistes, à la fois dilatateurs et constricteurs⁷⁵; le type de réponse dépendrait alors du niveau du tonus initial⁷⁸. La libération d'acétylcholine par ces terminaisons active les récepteurs muscariniques présents sur les cellules endothéliales et musculaires lisses. L'augmentation de la résistance pulmonaire semble médiée par les récepteurs de type M1 chez le lapin⁷⁹, alors que les récepteurs M1 et M2 semblent impliqués chez le chien⁸⁰. La relaxation endothélium dépendante induite par l'acétylcholine est médiée par les récepteurs M3⁸¹.

1.1.3.3.3. Contrôle non adrénérgique, non cholinergique

L'existence de ce système a été démontrée par la persistance de mécanismes dilatateurs nerveux malgré le blocage des systèmes adrénérgique et cholinergique⁷⁵. Chez le rat, ce système peut provoquer la constriction ou la dilatation des petites artères pulmonaires⁸². Les neurotransmetteurs de ce système varient selon les espèces étudiées. Ainsi le CGRP (Calcitonin gene-related peptide) et le NO ont une action vasodilatatrice, alors que le neuropeptide Y (NPY) a une action vasoconstrictrice. La substance P (SP) et l'ATP peuvent avoir une action vasoconstrictrice et/ou vasodilatatrice dépendante ou non de l'endothélium selon les récepteurs, l'espèce et le tissu considéré. Plus récemment, il a été montré que le VIP (Vasoactive intestinal peptide) possède une action vasodilatatrice systémique et pulmonaire, inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses et diminue l'agrégation plaquettaire⁸³. Le VIP par l'intermédiaire des récepteurs va activer la production de cAMP et cGMP⁸⁴.

La régulation de la pression sanguine dans le système circulatoire est primordiale pour une circulation fonctionnelle et constante. Dans certain cas toutefois, la gestion de cette pression sanguine est défailante et est à l'origine de pathologies. C'est le cas de l'hypertension artérielle où l'ensemble des vaisseaux sanguins est affecté. On parle alors d'hypertension systémique. Un type d'hypertension affecte de façon spécifique la PA : l'hypertension pulmonaire (PHT).

1.2. Hypertension pulmonaire.

L'**Hypertension pulmonaire (PHT)** est une pathologie du réseau vasculaire pulmonaire caractérisée par une augmentation des pressions pulmonaires et dont le symptôme principal est un essoufflement à l'effort. Chez l'adulte la PAH est définie par une pression artérielle pulmonaire (PAP) moyenne de repos supérieure à 25mmHg et/ou supérieure à 30mmHg à l'effort⁸⁵. Selon la WHO (World Health Organisation, Organisation mondiale sur la Santé), les patients atteints de PHT peuvent être classés parmi l'un des 5 groupes basés sur la cause de la pathologie.

1.2.1. Classification de l'Organisation mondiale sur la Santé.

Classification clinique PHT
1. Hypertension artérielle pulmonaire (PAH, Groupe I).
1.1. Idiopathique : aucune cause décelée, absence d'antécédents familiaux 1.2. Héritaire 1.3. Drogues et toxines 1.4. Associée à une connectivite, une infection VIH, une hypertension portale, à une cardiopathie congénitale, une Schistosomiase, une anémie hémolytique. 1.5. Associée à une pathologie veineuse ou capillaire (maladies veino-occlusives pulmonaires, hémangiome capillaire pulmonaire). 1.6. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né.
2. PHT veineuses pulmonaires, secondaire à une cardiopathie gauche (Groupe II) auriculaire, ventriculaire ou valvulaire.
3. PHT secondaire à maladies respiratoires (Groupe III) : hypoxémie (broncho-pneumopathies chroniques obstructives COPD, apnée du sommeil).
4. PHT post-embolie (Groupe IV) : obstruction thrombo-embolique des artères pulmonaires proximales ou distales, ou obstruction d'origine non thrombotique (tumeur, parasite, corps étranger).
5. PHT par mécanismes divers (Groupe V) : Sarcoidose, histiocytose X, lymphangiomatose, compression des vaisseaux pulmonaires (adénopathies, tumeur, médiastinite fibrosante).

Table 1- 1: Classification clinique des PHT selon l'Organisation mondiale de la Santé.

1.2.1.1. Groupe I : Hypertensions artérielles pulmonaires.

Les PHT du Groupe I, dites Hypertensions Artérielles Pulmonaires (PAH), sont des PHT d'origines inconnues (idiopathiques), des formes familiales et plus communément des syndromes associés au HIV, à la consommation d'anorexigènes, à des pathologies cardiaques congénitales ou des tissus conjonctifs⁸⁶. Ce groupe prend également en compte les PHT du nourrisson. Toutes ces situations sont caractérisées par une dysfonction endothéliale pulmonaire et des modifications histologiques similaires, ce qui justifie une classification commune et une prise en charge clinique semblable. La prévalence de la maladie est estimée à 50-60/millions mais la difficulté du diagnostic conduit à une sous estimation de la prévalence réelle^{87, 88}. Une surveillance accrue des populations à risque par échocardiographie Doppler ne permet de détecter les PAH de sévérités faibles à modérées que chez 13 à 26% des patients présentant une sclérose systémique ou des pathologies du tissu conjonctif^{89, 90}. Les taux de mortalité restent très élevés et inacceptables⁸⁶ (50% à 5 ans) du fait d'un mauvais diagnostic mais également parce que la pathogénèse de la PAH est encore aujourd'hui très énigmatique.

1.2.1.1.1. PAH idiopathique ou familiale.

La PAH idiopathique est une maladie rare, sans cause déterminée et avec absence d'antécédents familiaux. Elle touche environ deux fois plus les femmes que les hommes et est diagnostiquée en moyenne à 37 ans⁹¹. La prévalence de cette forme est d'environ 6 par million⁸⁷. La transmission héréditaire de la PAH a été reportée approximativement dans 6 à 10% des patients atteints et 50 à 90% de ces individus présentent une mutation dans le gène codant pour BMPR2 (Bone Morphogenic Protein Receptor type 2)^{92, 93}. Le phénotype n'est pas exprimé dans toutes les générations, mais lorsqu'il est présent, il apparaît dans le bas âge et est associé à une plus forte sévérité et une progression plus rapide de la maladie^{94, 95}. Cette mutation est également présente dans 25% des patients avec une PAH idiopathique⁹⁶ et 15% des patients présentant une PAH associée à l'utilisation d'anorexigènes (fenfluramine) et très rarement dans les autres formes de PAH^{97, 98}.

1.2.1.1.2. PAH associée à des cardiopathies congénitales.

De nombreuses cardiopathies congénitales telles que la tétralogie de Fallot, le Shunt gauche-droit ou la persistance du canal artériel, sont caractérisées par une communication entre le cœur droit et gauche. En raison des différences de pression régnant dans les cavités cardiaques et les gros vaisseaux issus du cœur, si la cardiopathie n'est pas corrigée chirurgicalement, elle est responsable d'une augmentation importante et prolongée des pressions dans la circulation pulmonaire, exposant la circulation pulmonaires aux pressions systémiques. La PAH se développe comme complication du syndrome initial, et est qualifiée alors de secondaire. Elle est en plus associée à une hypertrophie ventriculaire droite qui dans ce cas est adaptative car il n'y a pas régression du phénotype hypertrophique fœtal. Ce type d'hypertrophie ventriculaire droite est une réponse beaucoup plus longue par rapport à une hypertrophie compensatrice et mal adaptative. La défaillance cardiaque droite peut donc survenir après des dizaines d'années.

1.2.1.1.3. PAH associée à des connectivites¹.

Une artériopathie pulmonaire primaire peut survenir assez communément chez les patients atteints de sclérodémie systémique¹. A l'autopsie, 65 à 80% des patients présentent des signes histologiques de PAH, alors que seulement moins de 10% présentent réellement des signes cliniques⁹⁹. Des signes histologiques de PAH ont également été observés dans des cas de lupus systémiques érythémateux¹ et d'arthrite rhumatoïde.

1.2.1.1.4. PAH associée au virus d'immunodéficience humaine (HIV) ou à une hypertension portale.

La proportion d'individus atteints par une PAH est 6 à 12 fois plus importante dans la population infectée par le HIV que dans la population générale¹⁰⁰. L'occurrence semble être liée à la durée d'infection par le HIV¹⁰¹ mais comme le HIV n'infecte pas directement les cellules endothéliales vasculaires ou les VSMCs, les mécanismes induisant une PAH dans le cas d'une infection HIV restent peu clairs.

La prévalence de la PAH est également 6 fois plus importante dans le cas d'une hypertension portale. Les études hémodynamiques ont estimé la prévalence de la PAH de 2 à 6% chez ces patients et le risque augmente avec la durée de l'hypertension portale.

1.2.1.1.5. PAH associée à la consommation de drogues et toxines.

L'association entre la prise d'anorexigènesⁱ (stimulant la relâche de sérotonine et bloquant la reprise) et la PAH fut observée pour la première fois en Europe après l'augmentation de l'incidence suite à l'introduction de la molécule Aminorex fumarate¹⁰². Après le retrait de la molécule, l'incidence de la PAH est redevenue basale, mais des molécules structurellement reliées comme la Fenfluramine et la Dexfenfluramine ont été développées dans les années 1980 et leur consommation, même pendant uniquement 3 mois, a de nouveau été associée au développement de PAH.¹⁰³ Des études épidémiologiques ont également lié le développement de la PAH avec la consommation d'huile de colza¹⁰⁴, de tryptophane¹⁰⁵ (précurseur de la sérotonine) et de drogues illicites comme la méthamphétamine¹⁰⁶ et la cocaïne¹⁰⁷.

1.2.1.1.6. PAH associée à des hémoglobinopathies.

La prévalence de la PAH chez les patients atteints de drépanocytoseⁱ est évaluée entre 10 et 30%^{108, 109}. Dans 50% des cas où cette association est présente le taux de survie est de 2 ans. D'autres anémies telles que les Bêta-thalassémiesⁱ, les sphérocytoses héréditairesⁱ (maladie de Minkowski-Chauffard) ont également été associées au développement d'une PAH^{110, 111}.

1.2.1.1.7. PAH associée à d'autres étiologies.

Des PHT cliniquement et histologiquement indifférenciables des PAH ont été observées dans environ 15% des individus présentant une télangiectasie hémorragique héréditaireⁱ¹¹². Thrombocytosesⁱ, syndromes myélodysplasiquesⁱ, aspléniesⁱ, pathologies thyroïdiennes, pathologies pulmonaires veino-occlusives et d'hémangiomes capillaires pulmonaires peuvent également être associés à une PAH¹¹³⁻¹¹⁵.

1.2.1.2. Groupe II, Hypertensions veineuses pulmonaires

Les Hypertension veineuses pulmonaires (PHTV), qui présentent une prévalence de 3,650/million, sont les PHT liées aux pathologies du cœur gauche : auriculaires, ventriculaires ou valvulaires. L'augmentation des pressions dans le ventricule gauche se transmet de façon rétrograde jusqu'au système veineux pulmonaire et crée une vasoconstriction au niveau du lit artériel pulmonaire. Ce phénotype est généralement

reversé par une intervention chirurgicale rétablissant la dysfonction cardiaque gauche, mais il existe certains cas d'hypertension pulmonaire persistante après la chirurgie^{116, 117}.

1.2.1.3. Groupe III : PHT associées à l'hypoxie.

1.2.1.3.1. Broncho-pneumopathies chroniques obstructives

Les Broncho-pneumopathies chroniques obstructives (Chronic obstructive pulmonary diseases COPD) sont un désordre du parenchyme pulmonaire et des voies respiratoires entraînant une ventilation limitée à l'exercice, des infections pulmonaires récurrentes et souvent une hypoxie et une hypercapnie. Principalement causée par la fumée de cigarette, la COPD est associée à des changements au niveau du réseau vasculaire pulmonaire comme une hyperplasie de l'intima et une diminution de la lumière des vaisseaux¹¹⁸. Dans 50% à 70% des cas de COPD il y a développement d'une PHT. Néanmoins, cette PHT est en général modérée et les traitements visent à résoudre les désordres liés à la COPD avant tout. Bronchodilatateurs, corticostéroïdes, thérapies anti-inflammatoires et plus important, oxygène, sont administrés directement dans le poumon par inhalation.

1.2.1.3.2. Pneumopathies interstitielles.

Les pneumopathies interstitielles sont un groupe de désordres hétérogènes présentant une destruction inflammatoire ou fibrotique du parenchyme pulmonaire et communément associées à une PHT¹¹⁹. Par exemple, la fibrose pulmonaire idiopathiqueⁱ (IPF), est une forme commune de pneumopathie interstitielle dans laquelle la PHT a une prévalence estimée supérieure à 40%¹²⁰. Des données récentes ont mis l'accent sur le manque de corrélations existant entre les fonctions et les pressions pulmonaires chez les patients atteints par une IPF, suggérant que des mécanismes autres que le degré de fibrose sont à l'origine de la PHT¹²⁰.

1.2.1.3.3. Troubles respiratoires du sommeil.

Les troubles respiratoires du sommeil peuvent être associés à une PHT, notamment dans les cas de fréquentes et sévères hypoxémies. L'élévation des pressions est généralement modérée, même dans les cas d'apnée du sommeil.

1.2.1.4. Groupe IV : PHT post-embolie, thrombotique ou non.

La PHT thromboembolique est causée par une obstruction de branches artérielles pulmonaires à la suite d'un ou de récurrents évènements emboliques sans complète résorption du thrombus¹²¹. L'augmentation subséquente des résistances vasculaires pulmonaires PVR est considérée comme secondaire à une obstruction mécanique des artères pulmonaires proximales et au développement d'une artériopathie secondaire dans les petits vaisseaux pré-capillaires¹²².

1.2.1.5. Groupe V : PHT associées à des mécanismes divers

La sarcoïdose, souvent regroupée avec les pneumopathies interstitielles, est en fait une maladie inflammatoire systémique qui atteint préférentiellement les poumons, mais qui peut aussi atteindre n'importe quels autres organes. Généralement sans gravité, elle guérit spontanément dans 80% des cas. Dans les 20 % restants, les patients développent des complications respiratoires menaçantes comme une PHT. La fréquence avec laquelle la PHT complique la sarcoïdose augmente avec la sévérité de la maladie¹²³.

1.2.2. Défaillance du cœur droit.

L'augmentation des pressions pulmonaires est la caractéristique distinctive des PHT. Néanmoins, cette montée de pression n'a qu'un modeste impact sur le pronostic vital des patients. En réalité, ce pronostic dépend de la capacité du cœur droit à gérer cette augmentation de pression^{124, 125}.

De manière fonctionnelle, le RV pompe le même volume que le LV mais en utilisant 75 % moins de force que le LV du fait des faibles résistances que présente la circulation pulmonaire. De ce fait, la paroi libre du RV est plus fine et plus élastique que celle du LV. Selon la loi de Laplace, dans une sphère à fine paroi, l'augmentation de la pression accroît le stress au niveau de la paroi, à moins que l'épaisseur de cette paroi soit augmentée ou que le rayon interne de cette chambre soit réduit. Lorsque la pression, les résistances pulmonaires et la post-charge augmentent, des changements morphologiques et fonctionnels s'opèrent donc au niveau du RV¹²⁶ selon cette même loi, car il doit augmenter sa force pour compenser.

1.2.2.1. Hypertrophie

L'augmentation de la post-charge est principalement à l'origine d'une synthèse protéique et d'une augmentation de la taille des cellules par addition de sarcomères qui va amener à une hypertrophie ventriculaire droite. La synthèse protéique au niveau des cardiomyocytes est directement induite par l'étirement et des influences autocrines, paracrine et neuro-hormonales. D'une part, l'augmentation de la post-charge est ressentie par les intégrines, des hétérodimères transmembranaires présentant des attachements avec la matrice extracellulaire (Extracellular Matrix ECM) et le cytosquelette, et permettant de convertir le signal mécanique reçu en un signal intracellulaire chimique. Ce signal intervient dans la synthèse de protéines contractiles et impliquées dans la signalisation autocrine et paracrine^{127, 128}. D'autre part, des canaux ioniques sensibles à l'étirement présents sur les myoblastes, les fibroblastes et les cellules endothéliales¹²⁹ sont également à l'origine d'une augmentation de l'expression protéique¹³⁰. L'angiogénèse est un élément clé associé à la prolifération/croissance des cardiomyocytes qui est secondaire à l'augmentation des pressions.

1.2.2.2. Défauts contractiles.

Dans le RV normal adulte, la composition en chaîne lourde de myosine (Myosine Heavy Chain (MHC) est de environ 30% de la forme alpha (MHC- α) et le reste de la forme bêta (MHC- β). La défaillance cardiaque droite associée à une PAH est accompagnée d'une réduction de 5% de MHC- α ¹³¹. Du fait que cette forme MHC- α a une activité adénosine triphosphatase plus importante que la MHC- β , sa disparition dans la défaillance RV se traduit par une diminution significative de la fonction systolique¹³². Les protéines régulatrices comme la Troponine et la Tropomyosine, peuvent aussi être impliquées dans la baisse des performances contractiles. Par exemple, la phosphorylation de la Troponine T par la Protéine kinase C inhibe l'association de la Troponine T sur la Tropomyosine et peut contribuer à une diminution de l'activité triphosphatase.

1.2.2.3. Dilatation

De façon à compenser la diminution de la fraction de raccourcissement (différence entre le diamètre ventriculaire en diastole et le diamètre en systole, rapporté au diamètre en diastole) et pour maintenir le volume cardiaque, le RV se dilate et augmente sa pré-charge.

La progression des dysfonctions contractiles est associée à une défaillance du RV qui présente alors des pressions de remplissage hautes, une dysfonction diastolique et un débit cardiaque réduit. Par hypertrophie et dilatation, le RV devient progressivement plus sphérique^{133, 134}, la paroi libre est stressée du fait d'un épaississement non proportionnel¹³⁵.

1.2.2.4. Défaillance

Les mécanismes exacts menant à la défaillance du RV chez les patients avec une PAH ne sont pas encore complètement compris. Plusieurs mécanismes ont été proposés : ischémieⁱ, dysfonctions des cellules microvasculaires endothéliales, apoptose des myocytes. Il est encore considéré que les principes et concepts appliqués au LV peuvent également être appliqués au RV. Toutefois, le RV répond de façon sous-obtimale à une augmentation de la post-charge en comparaison du LV. En effet, la défaillance du RV peut apparaître en seulement 3 à 5 ans chez des patients atteints par une PAH, alors qu'un patient présentant une hypertension systémique peut vivre des dizaines d'années sans symptômes prédisant une réponse mal adaptative du LV. De plus, il existe de nombreuses différences entre le RV et le LV notamment embryologiques^{136, 137}. Le métabolisme énergétique¹³⁸ et l'expression génique¹³⁹ en réponse à l'augmentation de la post-charge sont également différents entre les deux compartiments. Ceci suggère donc que les mécanismes moléculaires impliqués dans la réponse mal adaptative du RV secondaire à une augmentation de la post-charge sont différents de ceux impliqués dans la réponse du LV.

Le RV est soumis à de nombreux changements morphologiques après la naissance. En effet, chez le fœtus, il existe un flux entre le cœur droit et gauche à travers le foramen ovale et les pressions dans la PA et l'aorte sont égales du fait de la présence du canal artériel (les poumons au stade fœtal n'ont pas encore de fonction d'échange gazeux, le sang de l'artère pulmonaire retourne alors vers l'aorte par le canal artériel, est réoxygéné par le placenta via les artères ombilicales et retourne au fœtus par la veine ombilicale). L'épaisseur des parois libres du RV et LV, ainsi que leurs forces, sont également similaires. Le RV est donc naturellement hypertrophié à la naissance, et cette hypertrophie régresse avec la disparition du canal artériel et la mise en place de la circulation pulmonaire¹⁴⁰. Dans le cas de cardiopathie congénitale, ce stade fœtal d'hypertrophie du RV ne régresse pas car les pressions sont maintenues élevées. Dans ce cas aussi, la défaillance peut apparaître très tardivement, après des années^{141, 142}. Ceci suggère donc que les mécanismes moléculaires

impliqués dans la réponse mal adaptative du RV sont également différents de ceux observés au cours du développement.

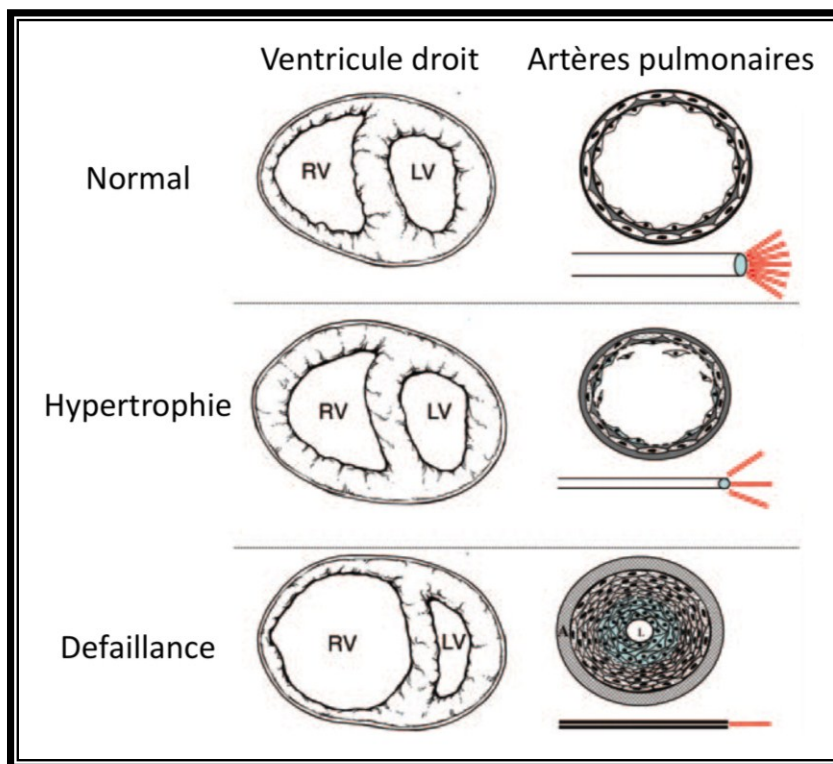


Figure 1- 7: Schéma de la progression théorique de la maladie vasculaire et du subséquent effet sur la fonction du ventricule droit RV. Champion et al. Circulation 2009¹⁴³.

Panel du haut: RV en condition physiologique (débit cardiaque Q , post-charge et perfusion normaux). Panel du milieu : RV hypertrophie, stade clinique de compensation. Le Q est préservé et l'hémodynamique est minimalement affectée, mais la masse du RV, les résistances vasculaires PVR sont très fortement augmentées et la compliance et la perfusion des poumons sont diminuées. Panel du bas : remodelage vasculaire sévère associé a une défaillance du RV. Le Q est diminué du fait de la défaillance de la pompe cœur, les PVR et la perfusion continuent à décroître.

1.2.3. Réversibilités des PHT

Dans le cas des PHT d'origines connues ou secondaires, le traitement du problème initial ayant déclenché la PHT permet en général de diminuer les pressions et de rétablir un phénotype normal.

Dans des cas de COPD chez des fumeurs de longue date, un sevrage tabagique peut être utile pour diminuer les pressions pulmonaires. Dans les cas d'apnées du sommeil, qui touchent des personnes de surpoids, un amaigrissement et le recours à la ventilation nocturne donnent de bons résultats. Dans d'autres cas le recours à la chirurgie est indispensable, mais suffisant à l'amélioration de la PHT. Chez les patients présentant une PAH associée à une cardiopathie congénitale de type shunt gauche-droit, une réparation chirurgicale extrêmement tôt dans la vie évitera la progression des lésions vasculaires pulmonaires et permettra une guérison complète. De même, dans le cas des PHT thromboemboliques (groupe IV), la chirurgie par endartériectomie pulmonaire est reconnue comme le traitement standard pour la majorité des patients. La procédure consiste à retirer les tissus fibreux qui obstruent les PAs et elle est accompagnée d'un arrêt de la circulation et d'une hypothermie prolongée. Dans de nombreux cas il y a restauration complète ou presque de l'hémodynamiques pulmonaires.

Néanmoins, dans de nombreux autres cas il n'y a pas possibilité de corriger le problème initial, le patients est inopérable, une PHT persistante ou une vasculopathie secondaire peuvent être des complications observées après chirurgie¹⁴⁴. Dans ces cas, les interventions thérapeutiques appliquées aux PAH peuvent être bénéfiques¹⁴⁵⁻¹⁴⁸. Aussi, l'amélioration des thérapeutiques PAH est essentielle.

1.3. Diagnostic clinique.

1.3.1. Présentation clinique

Les symptômes de la PAH ne sont pas spécifiques et peuvent inclure pour symptôme principal une dyspnée d'effort en lien avec l'insuffisance cardiaque droite. Fatigue, faiblesse, angine de poitrine, syncope et distension abdominale peuvent être observés. La dysfonction du cœur droit peut également se traduire par des œdèmes des membres inférieurs.

L'examen clinique doit rechercher des signes d'insuffisance ventriculaire droite qui se manifestent par une Hépatomégalie. La biologie standard est classiquement normale. Les anomalies qui peuvent cependant être retrouvées ne sont pas spécifiques : baisse du nombre de plaquettes (thrombopénie) et anémie modérée, insuffisance rénale, anomalies du bilan hépatique, taux de prothrombine spontanément bas. Une recherche d'auto-anticorps sera effectuée afin de rechercher une maladie auto-immune.

1.3.2. Classification fonctionnelle de l'insuffisance cardiaque.

La sévérité de l'insuffisance cardiaque est cotée selon la classification fonctionnelle NYHA (New York Heart Association):

Classe I : l'activité physique n'est pas limitée, les activités physiques habituelles ne provoquent pas de troubles.

Classe II : l'activité physique est légèrement limitée mais l'individu est asymptomatique au repos. Les activités physiques habituelles provoquent une dyspnée, une fatigue ou des douleurs thoraciques.

Classe III : l'activité physique est limitée de façon marquée mais l'individu reste asymptomatique au repos. Une activité moins intense que l'activité quotidienne induit une dyspnée ou une fatigue.

Classe IV : l'individu est incapable de faire le moindre effort et présente des manifestations d'insuffisance cardiaque droite. La dyspnée ou la fatigue peuvent être également présentes au repos.

Cette classification comporte des limites, elle est clairement subjective, fondée sur un interrogatoire peu standardisé. De plus les patients limitant eux-mêmes leur activité de façon spontanée, ils sous estiment souvent leur handicap fonctionnel. Néanmoins, cette classification reste largement utilisée en pratique quotidienne.

1.3.3. Mesures non invasives de diagnostic

1.3.3.1. Test à l'effort.

Parce que la dyspnée d'effort est le principal symptôme de la PAH, l'évaluation de ces paramètres au niveau clinique est capitale. Le test de 6 minutes de marche 6MWT (6 minutes walk test) sert à évaluer la tolérance respiratoire et cardiaque des patients à l'effort. Il mesure la distance qu'un individu est capable de marcher pendant 6 minutes, le plus

rapidement possible, sur une surface plane. Des études ont montré que ce test a une valeur de pronostique¹⁴⁹ et il est utilisé non seulement pour le diagnostic clinique mais également pour l'évaluation de l'efficacité des molécules en phase clinique. Le 6MWT est plutôt utilisé chez des patients à un stade avancé de la maladie. Chez les patients asymptomatiques ou à un stade peu avancé, une épreuve d'effort plus classique est utilisée, demandant à fournir un effort maximal sur tapis ou vélo. Il peut être demandé communément au patient de réaliser des paliers de 3 minutes sur tapis roulant selon de protocole décrit par Bruce en 1974¹⁵⁰. Pour une mesure plus sensible des performances cardio-vasculaires, un protocole de progression rapide (1 min par palier) couplé avec l'analyse des gaz respiratoires peut être envisagé.

1.3.3.2. Electrocardiogramme.

L'électrocardiogramme ECG peut à la fois suggérer ou confirmer un diagnostic PHT en montrant des signes d'hypertrophie du ventricule droit et de l'oreillette droite. Une hypertrophie du RV est présente sur l'ECG dans 87% des cas de PAH idiopathique¹⁰⁰.

1.3.3.3. Radiographie thoracique

La radiographie pulmonaire est anormale dans la majorité des cas (90%)¹⁰⁰. Elle va alors montrer une augmentation de la taille de la silhouette cardiaque (cardiomégalie) et une augmentation du volume du diamètre des troncs artériels pulmonaires et des artères pulmonaires proximales.

1.3.3.4. Echocardiographie Doppler

L'évaluation de la fonction ventriculaire droite peut être mesurée par échocardiographie qui est de ce fait le principal outil de diagnostic. La dimension du cœur droit (ventricule et oreillette) en systole et diastole peut être observée. Les anomalies morphologiques, la cinétique, le degré de dilatation et d'hypertrophie du RV sont visualisables. L'échocardiographie fournit également de nombreux paramètres appréciant la fonction contractile et éjectionnelle du RV par mesure de :

- La fraction de raccourcissement¹⁵¹ de surface qui se calcule à partir des surfaces télédiastoliques et télésystoliques du RV,

- L'amplitude de l'excursion systolique de la portion latérale de l'anneau tricuspide qui est normalement de l'ordre de 20 mm¹⁵².

- L'index Tei¹⁵³, calculé par la somme des temps isovolumiques de contractions et relaxation divisé par le temps d'éjection, est un index de la fonction globale du RV à la fois systolique et diastolique et semble être prédictif du pronostic^{154, 155}.

- La dP/dt peut être calculée à partir du flux d'insuffisance tricuspide en mesurant la différence de pression et de temps entre les vitesses de 0 et 2 m/s¹⁵⁶. La valeur normale est supérieure à 400 mmHg/s.

- La vitesse de l'onde S¹⁵⁷ : la vitesse de déplacement systolique de l'anneau tricuspide latéral est normalement de l'ordre de 15 cm/s. Sa diminution en deçà de 11 cm/s est considérée comme le témoin d'une altération de la fonction LV.

- La vitesse et l'accélération de l'onde présystolique¹⁵⁸ enregistrée en Doppler tissulaire à l'anneau tricuspide, juste avant l'onde S, semblent être des paramètres intéressants de fonction ventriculaire droite et seraient relativement peu sensibles aux variations de conditions de charge. Les valeurs normales sont de l'ordre de 13 cm/s pour la vitesse max et de 3 m/s² pour l'accélération.

- Le pic de strain systolique¹⁵⁹ du RV est un paramètre de déformation myocardique qui peut être mesuré soit à partir du Doppler tissulaire, soit à partir du 2D speckle tracking. Une diminution de cet index en deçà de 20% serait en faveur d'une dysfonction VD.

- L'échographie 3D¹⁶⁰ en temps réel permet une acquisition centrée sur le cœur droit. Sous réserve d'une qualité suffisante de détection des parois ventriculaires, notamment de la paroi antérieure, et avec l'aide de logiciels adaptés à la morphologie du VD, elle permet de mesurer les volumes et de calculer la fraction d'éjection du VD.

L'évaluation de la PAP systolique^{161, 162} s'estime classiquement à partir de la vitesse du flux d'insuffisance tricuspide la vitesse ou de la vitesse de régurgitation tricuspidiennne (à travers la valve séparant l'oreillette droite et le ventricule droit) qui lui est proportionnelle^{163, 164}. En cas d'absence d'insuffisance tricuspide, ou de mauvaise qualité du flux, l'étude du temps d'accélération pulmonaire (PAAT, Pulmonary Artery Acceleration

Time). Dans une étude menée par Lanzarini et al., un PAAT < 93 msec a permis d'identifier 67.4% des patients avec une PAH¹⁶⁵.

L'évaluation des PVR peut être approchée en échographie^{163, 166} par le rapport de la vitesse maximale de l'insuffisance tricuspide sur l'intégrale temps-vélocité du flux pulmonaire antérograde, dont la valeur normale est inférieure à 0,2.

1.3.3.5. Imagerie à résonance magnétique.

L'utilisation de l'imagerie cardiaque à résonance magnétique (MRI) pour le diagnostique et le suivi des maladies cardio-vasculaires est maintenant bien établie. La MRI permet une évaluation directe de la taille du RV, de sa morphologie et de sa fonction⁹¹ avec un haut niveau de reproductibilité^{167, 168}. L'imagerie cardiaque MRI sur patients présentant des RVs avec des fonctions sévèrement altérées a révélé que des paramètres tels que le RV EDV, le LV EDV, et le volume cardiaque, peuvent être des facteurs indépendants de prédiction de la défaillance cardiaque droite et de la survie¹⁶⁹. La MRI permet également d'accéder à la morphologie de la PA et de mesurer son élasticité par observation des changements de l'aire transversale. Cette mesure a également été démontrée comme prédictive de la survie dans une cohorte de 86 patients PAH¹⁷⁰. Le diamètre de la PA principale et des PAs droite et gauche, mesurés par MRI, corréleront de façon importante avec les valeurs obtenues avec les angiogrammes pulmonaires conventionnels¹⁷¹. L'utilisation d'agents de contraste comme le gadolinium permet également la visualisation du flux sanguin et de sa vélocité. De façon similaire à l'échocardiographie, la MRI avec contraste permet de calculer divers paramètres, comme la régurgitation tricuspidiennne, qui permettent une évaluation des PVR. Aussi, des informations sur l'épaississement de la paroi des vaisseaux, le rétrécissement de la lumière et la dilatation peuvent être obtenues¹⁷¹. De récentes avancées permettent également de quantifier la perfusion pulmonaire et donc de visualiser clairement la diminution de la perfusion chez les patients atteints¹⁷². Cette technique, qui n'utilise pas de radiations, peut donc évaluer l'efficacité d'un traitement par un suivi « avant/après » des patients.

1.3.3.6. Biomarqueurs.

Actuellement, la classe fonctionnelle déterminée par le classement de la NYHA, le 6MWT, les données hémodynamiques d'échocardiographie et de cathérisation droite permettent une réelle évaluation du pronostic vital des patients atteints de PAH. Il existe quelques biomarqueurs dont la mesure, moins invasive, informe le médecin de l'évolution de la pathologie.

1.3.3.6.1. Taux de vasodilatateurs/vasoconstricteurs.

Se présentant sous forme gazeuse, le NO peut être mesuré dans l'air expiré. Cette mesure peut également se faire de façon indirecte par le dosage du cGMP plasmatique, qui reflète de l'activité de la NO synthase. Ces analyses ne sont toutefois pas disponibles en clinique.

La concentration de l'inhibiteur des NO synthases : asymmetrical dimethylarginine¹⁷³, est également le reflet de la dysfonction endothéliale. Il est considéré comme un facteur de pronostic pour des pathologies athéromateuses et pourrait également être dosé pour la PAH¹⁷⁴.

L'ET-1 fait partie des facteurs circulants retrouvés augmentés dans le plasma chez les patients atteints de PAH ($0.95 \pm 0.52 \text{ fmol/ml}$ dans l'artère pulmonaire)¹⁷⁵⁻¹⁷⁷. Toutefois, l'ET-1 possède une demi-vie très courte, de quelques minutes, ce qui complique sa mesure. Son taux peut aussi varier en fonction d'autres données hémodynamiques comme l'hypertension systémique ce qui rend sa mesure peu spécifique à la PAH.

1.3.3.6.2. Le BNP « Brain natriuretic peptide ».

Le BNP est une hormone naturellement produite par les oreillettes, et produite par le myocarde ventriculaire en cas de remodelage cardiaque. Le BNP est synthétisé sous forme de précurseur proBNP qui sera clivé dans le sang (en N ou C terminal) par la corin. Ainsi, le N-terminal prohormone (NT-proBNP), clivé en N-terminal, est également un marqueur de dysfonction ventriculaire. Ce dernier possède une demi-vie plus longue que le BNP. Il est donc plus facilement mesurable par immunoluminescence¹⁷⁸. On estime le taux de BNP normal pour un jeune adulte $<25 \text{ pg/mL}$ et de NT-proBNP $<70 \text{ pg/mL}$ ¹⁷⁹. Le BNP joue un rôle important dans l'homéostasie cardiovasculaire, le tonus vasculaire, la perméabilité endothéliale et le volume sanguin¹⁸⁰. Il présente également un effet pro-inflammatoire,

composante retrouvée dans la PAH¹⁸⁰. Il a été montré que les taux élevés de BNP/NT-proBNP mesurés pouvaient corrélérer avec la classe WHO¹⁸¹, les données hémodynamiques, les pressions et le Q¹⁸², ou encore le 6MWT¹⁸³. Une amélioration des fonctions hémodynamiques entraîne une diminution des niveaux de BNP^{182, 184}. Il a été également décrit que la détérioration du RV est corrélée à une montée des niveaux de BNP/NT-proBNP¹⁸⁵⁻¹⁸⁸. Cette élévation survient cependant à un stade tardif de la maladie. Le BNP/NT-proBNP reste un des seuls biomarqueurs sanguins actuellement utilisés chez les patients atteints de PAH.

La Troponine T cardiaque (cTnT) fait également partie des marqueurs connus pour indiquer la sévérité de la PAH. Marqueur spécifique en cas de lésion des cardiomyocytes, elle est détectable lors du remodelage ventriculaire. Cependant, la cTnT qui n'est détectable que chez une minorité de patients, reste un marqueur très tardif et non spécifique de la PAH puisqu'elle permet également le diagnostic de syndromes coronariens aigus.

1.3.3.6.3. Marqueur du métabolisme oxydatif

Par une augmentation du métabolisme oxydatif, notamment observé dans la PAH, la production d'acide urique est augmentée. Ce dernier est connu comme un facteur de risque de mortalité dans les problèmes cardiaques. Également augmenté dans le sérum de patients avec une PAH idiopathique, sa concentration est corrélée aux résistances vasculaires pulmonaires¹⁸². Cependant, l'acide urique est élevé dans diverses conditions et sa mesure demeure peu discriminative.

1.3.3.6.4. Cytokines/Interleukines

De façon très récente, la GDF-15 (Growth differentiation factor-15), faisant partie de la famille des cytokines TGF- β , a été montrée comme pouvant pronostiquer la survie des patients dans la PAH¹⁸⁹. En effet, la concentration plasmatique de la GDF-15, normalement faible chez l'individu sain, peut-être très fortement augmentée dans des pathologies telles que l'embolie pulmonaire et l'insuffisance cardiaque gauche. Nickel et al. ont montré lors d'une étude sur des patients présentant une PAH idiopathique, qu'il existe une corrélation entre le niveau de GDF-15, le test de marche de 6 minutes et les données hémodynamiques telles que la pression auriculaire droite. Une importante concentration de

GDF-15 correspond à un mauvais pronostic de survie chez la moitié des patients PAH¹⁸⁹. Toutefois, le dosage de GDF-15 n'est pas corrélé à la PAP moyenne laissant entrevoir les limites de ce biomarqueur.

Plus récemment, il a été démontré qu'il existe une relation entre le taux circulant de cytokines pro-inflammatoires et le potentiel de survie des patients. Les patients présentant une HTAP ont des taux d'IL-1 β , -2, -4 -6 -8 -10 et -12p70 supérieurs par rapport aux patients contrôles. Les niveaux d'IL-6, -8, -10 et -12p70 ont été décrits comme pouvant prédire la survie, de façon supérieure aux traditionnels marqueurs comme le test de marche de 6 minutes. Toutefois, ils ne sont pas encore utilisés cliniquement.

1.3.4. Mesure invasive: la cathétérisme droit

Tous les patients suspectés d'avoir une PAH après une évaluation non invasive sont soumis à un cathétérisme droit avant que toute thérapie soit proposée. La procédure consiste en l'introduction d'un cathéter sous contrôle radiologique dans l'artère pulmonaire dans le but de déterminer la PAP, les PVR et le débit Q. Le cathétérisme droit permet également d'évaluer l'évolution de la pression pulmonaire après administration de produits potentiellement vasodilatateurs (monoxyde d'azote ou adénosine), permettant d'anticiper la réponse à certains médicaments. Cette mesure reste la meilleure solution pour obtenir des données hémodynamiques dans la PHT. Néanmoins, cette mesure se fait sur des patients au repos et ne reflète donc pas la véritable étendue des données hémodynamiques.

1.4. Traitements

1.4.1. Prise en charge des patients aujourd'hui.

1.4.1.1. Traitements de base

Un traitement anticoagulant est recommandé dans la plupart des cas, avec une amélioration de la survie. Il s'agit principalement d'une mesure de prévention visant à protéger les poumons contre le risque d'apparition de caillots de sang qui pourraient freiner encore plus la circulation sanguine dans les poumons. Des antidiurétiques sont conseillés si il y présence d'œdèmes dans les membres inférieurs ou d'enflure. L'oxygénothérapie qui consiste à respirer de l'oxygène, est conseillée aux personnes dont l'oxygénation du sang

est perturbée. En effet, elle permet au sang d'être aéré de façon plus efficace qu'avec l'air extérieur.

1.4.1.2. Les autres traitements pouvant être proposés en plus du traitement de base.

1.4.1.2.1. Bloqueurs calciques

Les inhibiteurs calciques ne sont actifs que dans moins de 10% des formes primitives. La réponse à ce type de médicament peut néanmoins être estimée par un test de vasodilatation au cours du cathétérisme droit. Pour ses patients réactifs, Nifedipine et Diltiazem peuvent permettre une amélioration des paramètres hémodynamiques et de la survie^{36, 190}.

1.4.1.2.2. Prostacyclines et analogues.

L'Époprosténol est le premier analogue des prostacyclines approuvé pour le traitement de la PAH. Cette molécule a une demi-vie très courte de 3 à 5 minutes et demande donc à être injectée directement dans les veines en perfusion continue 24 heures sur 24. Les études réalisées principalement avec des patients avec une PAH ou une PHT associée à une maladie des tissus conjonctifs, ont démontré une amélioration des symptômes, de la capacité à l'exercice (mesurée par le 6MWD), une diminution des PAPs et des PVRs¹⁹¹⁻¹⁹³. Les études à long terme ont évalué une amélioration de la survie chez les patients PAH en comparaison des données contrôles historiques, à 1 an (87.8% vs 58.9%), à 2 ans (76.3% vs 46.3%), et à 3 ans (62.8 vs 35.4%)^{194, 195}. Communément, la dose de départ est de 2 à 4ng/kg/min et cette dose est ajustée en fonction des symptômes et des effets secondaires observés. La plupart des experts pensent que le dosage optimal pour une monothérapie chronique est entre 25 et 40ng/kg/min. Les effets secondaires les plus courants sont des maux de tête, des diarrhées, des douleurs articulaires, des rougeurs et des douleurs aux mâchoires lors de la mastication¹⁹⁵.

L'Iloprost est un analogue stable de la prostacycline, sa demi-vie est 10 fois supérieure à l'époprostenol, soit entre 20 et 30 min. Dans une large étude sur 203 patients atteint d'une sévère PAH ou d'une PHT thromboembolique, 6 à 9 inhalations (2.5 à 5µg) par jour d'Iloprost améliorent le 6MWT de 10%, et une amélioration significative des paramètres hémodynamiques est observable après 12 semaines¹⁹⁶. Une étude à long terme

sur 63 patients publiée récemment a montré que la survie à 2 ans sous Iloprost (6 à 9 inhalation de 4 µg par jour) est de 83% alors que la survie prédite est de 63%¹⁹⁷. Les effets secondaires les plus fréquents sont une toux prononcée et une hypotension systémique.

1.4.1.2.3. Inhibiteurs de la voie ET-1

Le Bosentan est le premier antagoniste des récepteurs à l'endothéline à avoir été développé et mis sur le marché. Administré par voie orale, ce traitement a démontré un bénéfice clinique significatif dans une étude de 169 patients atteints de PAH idiopathique suivit sur 2 ans. La survie à un an sous Bosentan a été évaluée à 97% dans cette cohorte, et 89% à 2 ans (contre les 69% et 57% prédits)¹⁹⁸. Globalement, la tolérance du Bosentan est satisfaisante. Les effets indésirables survenant de façon plus fréquente sont : des céphalées, des bouffées de chaleur, des anomalies de la fonction hépatique, des œdèmes des membres inférieurs et parfois de l'anémie.

1.4.1.2.4. Inhibiteurs de la PDE-5

Le Sildénafil est un inhibiteur de la PDE5, utilisé précédemment pour les dysfonctions érectiles. L'étude SUPER-1 (Sildenafil Use in Pulmonary Arterial Hypertension) réalisée sur 278 patients avec une PAH, une PHT associée à une maladie des tissus conjonctifs ou une PHT persistance après chirurgie d'un shunt gauche-droit sur 12 semaines, a révélé une amélioration du 6MWT et une diminution des PAPs chez les patients traités au Sildénafil (20, 40, or 80 mg, 3 fois par jour) en comparaison des patients ayant reçu le placebo. Une étude à long terme sur 222 patients ayant complété une année de traitement au Sildénafil (80mg, 3 fois par jour) en monothérapie a montré une amélioration soutenue dans le 6MWT^{199, 200}. Les effets secondaires le plus fréquemment observés sont : maux de tête, malaises d'estomac, rougeur du visage, maux de dos, troubles de la vision, diarrhée et saignements de nez.

1.4.2. Actuellement en phase clinique

1.4.2.1. Activateurs de la Guanylate Cyclase.

Des agents stimulants la GC, comme le YC-1 et le BAY 420-2272 augmentent la sensibilité de l'enzymes vis a vis des faibles taux de NO alors que les activateurs de la GC tel que BAY-58-2667 jouent préférentiellement sur l'enzyme oxydée ou l'hème libre, lui donnant la capacité d'induire une vasodilatation en absence de NO. Riociguat et

Cinaciguat, deux stimulateurs de la GC ont été testés dans des phases cliniques avec des contrôles placebo et ont été bien toléré par les patients. Une administration aiguë de Riociguat en phase clinique 2 a été décrite comme associée à une amélioration des paramètres hémodynamiques, de l'index cardiaque et de la capacité à l'exercice chez 4 patients présentant une PHT modérée à sévère (incluant PAH, PHT thromboembolique ou associée à une maladie des tissus interstitiels), de manière dose dépendante et de manière supérieure à la thérapie par inhalation de NO.

1.4.2.2. Inhibiteurs des RTK.

L'inhibiteur du récepteur au PDGF Imatinib a été testé sur 28 patients PAH en phase clinique II. Malgré une significative diminution des PVRs et une augmentation du débit Q, aucune amélioration du 6MWT n'a été observée par rapport aux patients traités avec un placebo²⁰¹. De plus, des effets secondaires sévères ont été notés dans 39% des patients ayant reçu Imatinib, contre 23% des patients ayant reçu le placebo. Dans la phase clinique Ib pour l'inhibiteur de multiples kinase Sorafenib (ciblant des récepteurs angiogéniques comme le récepteur au VEGF, au PDGF et ciblant également la voie Ras/Raf/MEK/ERK) testé sur 12 patients PAH (déjà sous une thérapie agressive), une significative diminution (>5mmHg) des PAPs a été mesurée chez 4 patients malgré un manque global d'amélioration dans le 6MWT et une significative diminution du débit Q²⁰². Des effets secondaires de grade 1 ont été observés, comme des diarrhées, syndrome pieds-mains-bouche, rougeurs cutanées et alopécie. Les limites de l'utilisation des inhibiteurs RTK résident dans le fait qu'ils sont très peu sélectifs et qu'ils mènent à des dysfonctions ventriculaires, attribuables à une perte ou une dysfonctions des myocytes²⁰³.

1.4.2.3. Inhibiteurs de ROCK

Chez un petit nombre de patients PAH et PHT^{204, 205}, l'inhibiteur de ROCK Fasudil administré en intraveineuse a montré une diminution des PVRs, associée par contre à une hypotension systémique.

1.4.2.4. Première thérapie génique pour la PAH.

En comparaison des autres maladies thoraciques comme les cancers, l'asthme, la fibrose kystique, la PAH est un peu en retard en ce qui concerne les applications de thérapies géniques. En effet, le premier essai clinique mettant en place un transfert de gène

a commencé en 2010²⁰⁶. Des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) autologues programmées pour surexprimer la eNOS ont été administrées à des patients présentant une PAH idiopathique ou une PAH associée à une sclérodémie. Les données préliminaires montrent une modeste mais significative amélioration du 6MWT et des PAP. Néanmoins, étant donné qu'une thérapie aux EPC seules (sans transfert de gène) dans 2 précédents essais cliniques ont également montré une amélioration du 6MWT et des PVR²⁰⁷, il est difficile d'évaluer le réel bénéfice associé uniquement au transfert de gène additionnel.

1.5. L'Hypertension Artérielle Pulmonaire (PAH).

La PAH, qui réfère aux PHTs de groupe I, est multifactorielle et de nombreuses dysfonctions cellulaires sont à l'origine de ce syndrome menant à des artères pulmonaires obstruées et contractées. Ceci est suivi d'une augmentation des résistances vasculaires PVRs, créant une augmentation des pressions pulmonaires PAPs, à une hypertrophie ventriculaire droite compensatoire et finalement la décompensation cardiaque droite et le décès.

1.5.1. Histologie caractéristique.

La connaissance de l'évolution naturelle des lésions chez les patients est assez limitée, notamment car elle est basée sur l'examen histologique d'explants pulmonaires, de prélèvements post-mortem et rarement de biopsies pulmonaires chirurgicales. La PAH est une pan-vasculopathie qui affecte principalement les petites PAs distales⁸⁶. De nombreuses anomalies artérielles peuvent être observées comme une hyperplasie de l'intima, une hypertrophie de la media, une prolifération de l'adventice, thrombose, inflammation et une artériopathie plexiforme. L'artériopathie plexiforme associe une hypertrophie de la media, une fibrose de l'intima, des lésions plexiformes et des thromboses organisées (Figure 1- 8). Dans certains cas, des lésions veineuses ou capillaires peuvent être observées en association aux artériopathies.

La communauté scientifique est d'avis que l'hypertrophie de la media apparaît plus tôt et est plus réversible que l'apparition de lésions plexiformes. L'hypertrophie de la media est secondaire à l'hypertrophie et l'hyperplasie des fibres musculaires lisses et à l'augmentation de la matrice conjonctive et des fibres élastiques. Les lésions plexiformes dérivent d'une prolifération aberrante et focale des cellules endothéliales entourées de

myofibroblastes, de VSMCs et de ECM. Les lésions plexiformes sont décrites dans les PAH idiopathiques et familiales uniquement et sont donc un phénomène rare.

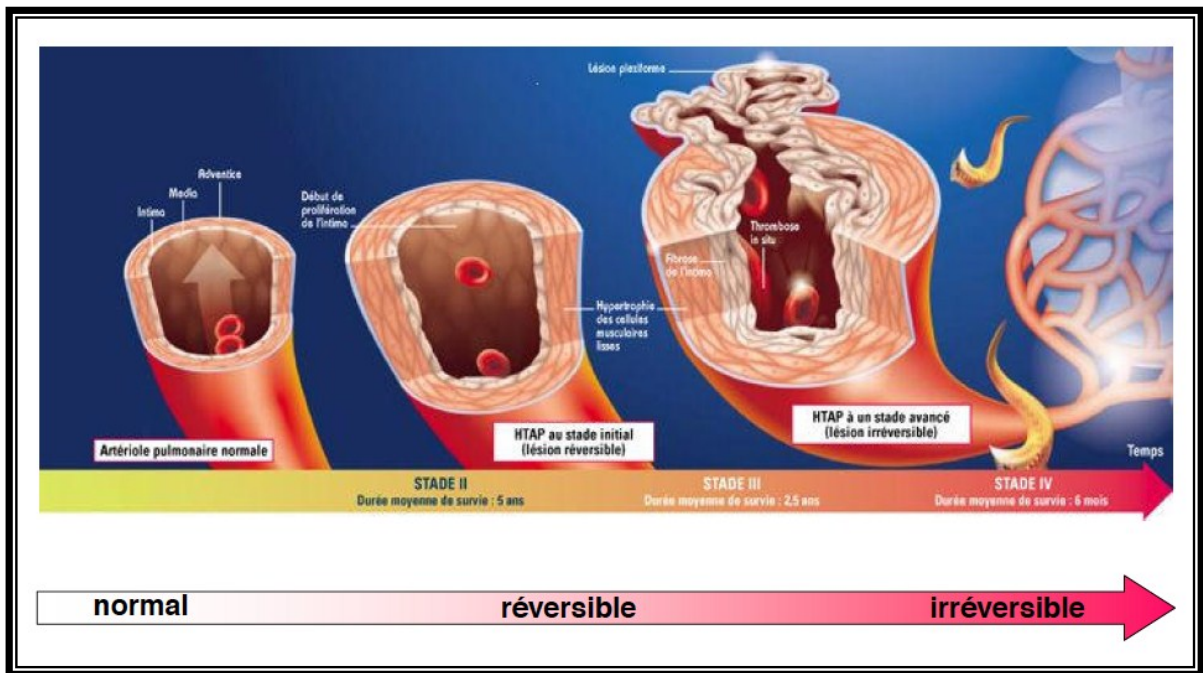


Figure 1- 8 : Atteinte évolutive de la paroi des artères pulmonaires. Humbert.

L'hypertrophie de la media est secondaire à l'hypertrophie et hyperplasie des fibres musculaires lisses et à l'augmentation de la matrice conjonctive et des fibres élastiques. Elle apparaît tôt, au stade initial et est une lésion réversible. Au stade avancé, l'hypertrophie de la media est associée à une hyperplasie de l'intima, une prolifération de l'adventice, à la présence de thromboses organisées et d'inflammation et au développement de liaisons plexiformes. Les lésions plexiformes dérivent d'une prolifération aberrante et focale des cellules endothéliales entourées de myofibroblastes, de VSMCs et de ECM. Cette étape est considérée comme irréversible et associée à un mauvais pronostic vital.

1.5.2. Modèles animaux.

1.5.2.1. Le modèle hypoxique.

L'induction d'une PHT chez le rat et la souris par une exposition à l'hypoxie chronique est un modèle très utilisé. Après 2 semaines en hypoxie (10% O₂), les rats développent une PHT modérée, la PAP est doublée et une hypertrophie du RV est notable. Néanmoins, ce modèle est rarement associé à une défaillance du RV. Au niveau histologique, ce modèle est associé à une rapide muscularisation des petites artères (normalement non musculaires), le recrutement et la différenciation locale de fibroblastes, le recrutement de cellules mononucléaires, progénitrices et la transdifférenciation des cellules endothéliales en cellules mésenchymateuses^{208, 209}. La muscularisation évolue rapidement en hypertrophie des VSMCs²¹⁰, probablement du fait d'une augmentation de la prolifération. L'inflammation semble jouer un rôle important dans le remodelage vasculaire associé à ce modèle, elle apparaît tôt et est persistante²¹¹. Chez la souris, une augmentation significative de la PAP est observée mais le remodelage vasculaire associé est minimal, moins net que chez le rat²¹²⁻²¹⁴. Il y a augmentation de la prolifération des VSMCs à un stade plus tardif durant l'exposition²¹⁵, un épaissement des artères pulmonaires proximales avec hypertrophie de l'adventice, fibrose et diminution de la compliance^{216, 217}. Il n'y a aucune indication dans ce modèle hypoxique de la présence de lésions plexiformes non réversibles. De plus, le retour à des conditions normoxiques permet la réversion totale de la pathologie (K.R. Stenmark, observations non publiées). Ceci est également le cas dans la forme humaine de la maladie associée à d'importantes altitudes, appelée aussi la maladie de Monge, qui est dramatiquement diminuée avec le retour à des conditions barométriques proches du niveau de la mer.

LE SAVIEZ-VOUS

Les Andes restent la grande chaîne montagneuse la plus habitée de notre planète, avec une population estimée à 30 millions d'habitants occupants 1.300.000km². Les populations sont physiologiquement adaptées à ces conditions barométriques extrêmes. C'est une perte de l'acclimatation à l'altitude qui est à l'origine de la maladie de Monge, du nom du Docteur qui la décrit en 1928.

1.5.2.2. « Fawn-hooded rats »

« Fawn-Hooded rats » (FHR) est le seul modèle de rat développant une PAH de façon spontanée. Les FHR présentent un désordre dans le stockage des plaquettes caractérisé par une incorporation aberrante de la sérotonine dans les plaquettes. La PAH dans les FHR est héritée, se développe lentement au niveau de la mer mais le processus peut être accéléré par une exposition à l'hypoxie/altitude^{218, 219}. Les FHR présentent des PASMC vasoconstrictes et prolifératives et une production élevée de ET-1. C'est le modèle offrant le plus sévère spectre de PAH associée à l'hypoxie. Néanmoins, les FHR présentent 2 désavantages majeurs. D'abord, les rats présentent également une anomalie alvéolaire et capillaire. Ensuite, un certain degré d'hypertension systémique est également observé alors que ce n'est pas une caractéristique de la maladie humaine.

1.5.2.3. La monocrotaline.

La monocrotaline est un alcaloïde présent dans la *Crotalaria spectabilis*. C'est une toxine qui est activée, métabolisée en monocrotaline pyrrole *in vivo* par le cytochrome P-450 au niveau hépatique, et qui va entraîner des lésions vasculaires. Ce modèle est couramment utilisé pour induire une PHT chez le rat car il est très facile à mettre en place, par simple injection sous-cutanée ou intrapéritonéale (60mg.Kg⁻¹). Les mécanismes exacts par lesquels l'ingestion de monocrotaline est associée au développement d'une PHT ne sont pas complètement connus. Néanmoins, beaucoup pensent que cette toxine endommage directement les cellules endothéliales²²⁰ car l'augmentation des PAPs et le remodelage vasculaire ne débutent que 2 semaines après injection²²¹. D'autres études ont suggéré que l'augmentation des PAPs et le processus de remodelage vasculaire seraient causés par une précoce et dramatique accumulation de cellules inflammatoires mononucléaires dans l'adventice des petits vaisseaux²²². Ce modèle est associé à une hypertrophie et des dysfonctions du RV, qui sont deux paramètres essentiels dans la PHT, puisque ce sont les principaux facteurs déterminant la survie. Cinq semaines après injection de monocrotaline, les pressions systoliques du RV peuvent atteindre 80mmHg et être associées à un faible taux de survie des rats (30%)²²¹.

Le système de métabolisation de la crotaline par le cytochrome P450 peut différer entre les espèces, notamment entre les rats et les souris^{223, 224}. Des méthodes de transformation *in vitro* et chimiquement de la monocrotaline en pyrrole actif ont donc été développés pour pouvoir outrepasser ce problème²²⁵. Une injection intraveineuse du composé actif et stabilisé dans le diméthylformamide directement dans la jugulaire est associée au développement d'une PHT chez la souris²²⁶. Ce modèle n'est pas très utilisé dans la littérature mais il présente l'avantage, par rapport au modèle hypoxique, d'entraîner une défaillance cardiaque droite et donc d'être plus près du modèle humain.

1.5.2.4. *SUGEN 5416 et hypoxie.*

Taraseviciene-Stewart et ses collègues ont développé un modèle de PAH sévère de façon à mieux accéder à la compréhension des mécanismes impliqués dans la formation des lésions plexiformes que présentent les patients avec une PAH²²⁷ en combinant l'hypoxie et une injection de SUGEN 5416, un inhibiteur du récepteur au VEGF (impliqué dans le maintien et la différenciation des cellules endothéliales). Très récemment, le modèle a évolué pour être obtenu par une unique injection de SUGEN 5416 (20 mg/kg) suivie par 3 semaines d'hypoxie (10% d'O₂) puis 10 à 11 semaines en normoxie²²⁸. Les rats développent une artériopathie similaire à celle présentée par les patients et qui devient de plus en plus grave avec le temps. Les lésions plexiformes ne se développent néanmoins que très tardivement à la 13 ou 14^{ème} semaine, rendant le modèle plus lourd à l'utilisation. De plus, dans ce modèle, les RVSPs atteignent environ 96 mmHg (vs. 21 mmHg pour les rats contrôles), des valeurs de pression très hautes, qui sont associés de façon surprenante qu'à de faibles taux de mortalité des animaux en comparaison du modèle monocrotaline ou des patients. Peu de données sur l'hypertrophie ventriculaire droite dans ce modèle sont disponibles, et les faibles taux de mortalité suggèrent que peut être la défaillance cardiaque droite est tardive. Ce modèle est à mon avis très intéressant pour l'étude des lésions plexiformes spécifiquement, et des dysfonctions endothéliales plus généralement. Dans le cas d'études portant sur les PASMCs comme il en est question ici, ce modèle est je pense moins indispensable. De plus, la présence de lésions plexiformes n'est décrite que pour les PAH idiopathiques et familiales, ce qui correspond à un faible pourcentage des PAH, et la question de l'apport de ce modèle ainsi que de l'extrapolation des résultats trouvés aux

autres types de PAH et autres PHT peut être posée. Une meilleure connaissance de ce modèle est néanmoins nécessaire et pourrait apporter de nouvelles données.

1.5.3. Dysfonction endothéliale.

LE SAVIEZ-VOUS

La position exceptionnelle de l'endothélium dans la circulation sanguine fut reconnu dès 1954 par Rudolf Altschul²²⁹, un Professeur d'histologie de l'Université du Saskatchewan au Canada. Ce fut un chercheur hors normes et un visionnaire qui écrivit dans son livre : « ...the secretory function of endothelium need to be considered... there are reasons to accept its dysfunction in the case of degenerative vascular diseases”.

La vasoconstriction est classiquement reconnue comme un phénomène précoce dans la pathogénèse de la PAH. Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules endothéliales jouent un rôle prépondérant dans la sécrétion de molécules stimulatrices et l'état contractile des VSMCs au niveau basal est le résultat de l'équilibre entre l'influence de facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs. Dans la PAH, l'hypertension est induite par une dérégulation de cette balance qui peut être due à un excès de vasoconstricteur versus vasodilatateurs. Les cellules endothéliales peuvent être engagées dans une synthèse anormale de substances stimulatrices :

- une baisse de monoxyde d'azote (NO) du fait d'une diminution de l'expression de la NO synthase endothéliale²³⁰
- un excès de thromboxane A₂²³¹, qui stimule l'agrégation plaquettaire
- une réduction de prostacycline par diminution de l'expression de la prostacycline synthase²³².
- une augmentation de la sécrétion d'ET-1²³³ qui contribue à la résistance vasculaire pulmonaire²³⁴. Rubens et al¹⁷⁵, ont montré qu'il existait une forte corrélation entre la concentration d'ET-1 présente, les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et la pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP), reflétant donc de la sévérité de la PAH.

Il est également possible qu'un excès de sérotonine²³⁵ (vasoconstricteur) soit causé par la prise d'anorexigènes (aminorex, fenfluramine). Ils diminuent l'assimilation de la sérotonine par les cellules endothéliales en interagissant avec son transporteur (5-HTT) et/ou inhibe son activation par la monoamine oxydase, et causent un largage massif de cette dernière par les plaquettes (qui présentent une activité augmentée dans la PAH).

1.5.4. Phénotype cancéreux.

Le paradigme cancéreux de la PAH a été décrit pour la première fois en 1998²³⁶ par Tudor et Voelkel, qui introduisirent le concept de cellules endothéliales "quasi malignes" et angiogéniques²³⁷ au niveau des lésions plexiformes. Après la description du « sceau » cancéreux par Hanahan and Weinberg en 2000²³⁸, il a été plus clairement défini que les lésions vasculaires retrouvées dans la PAH sont gouvernées par la plupart des mécanismes à l'origine du développement tumoral malin: comme la persistance de voie de signalisation en faveur de la prolifération⁸⁶, l'évasion des mécanismes stimulant l'apoptose et freinant la croissance, et la participation des mécanismes angiogéniques. Dans une toute récente mise à jour de la description de ce « sceau »²³⁹, Hanahan et Weinberg décrivent l'instabilité génomique, l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique comme des caractéristiques émergente du phénotype tumoral (Figure 1-9). Ces mécanismes apparaissent également régulés de façon aberrante dans les PSMCs^{83, 240-243}, augmentant le parallèle qui peut être fait entre PAH et cancer. De plus, il est suggéré que les propriétés oncogéniques et suppresseur de tumeurs de protéines et microARN, qui jouent un rôle capital dans le développement et le maintien du phénotype pathologique tumoral²⁴⁴, auraient également un rôle dans le maintien du phénotype dans la PAH.

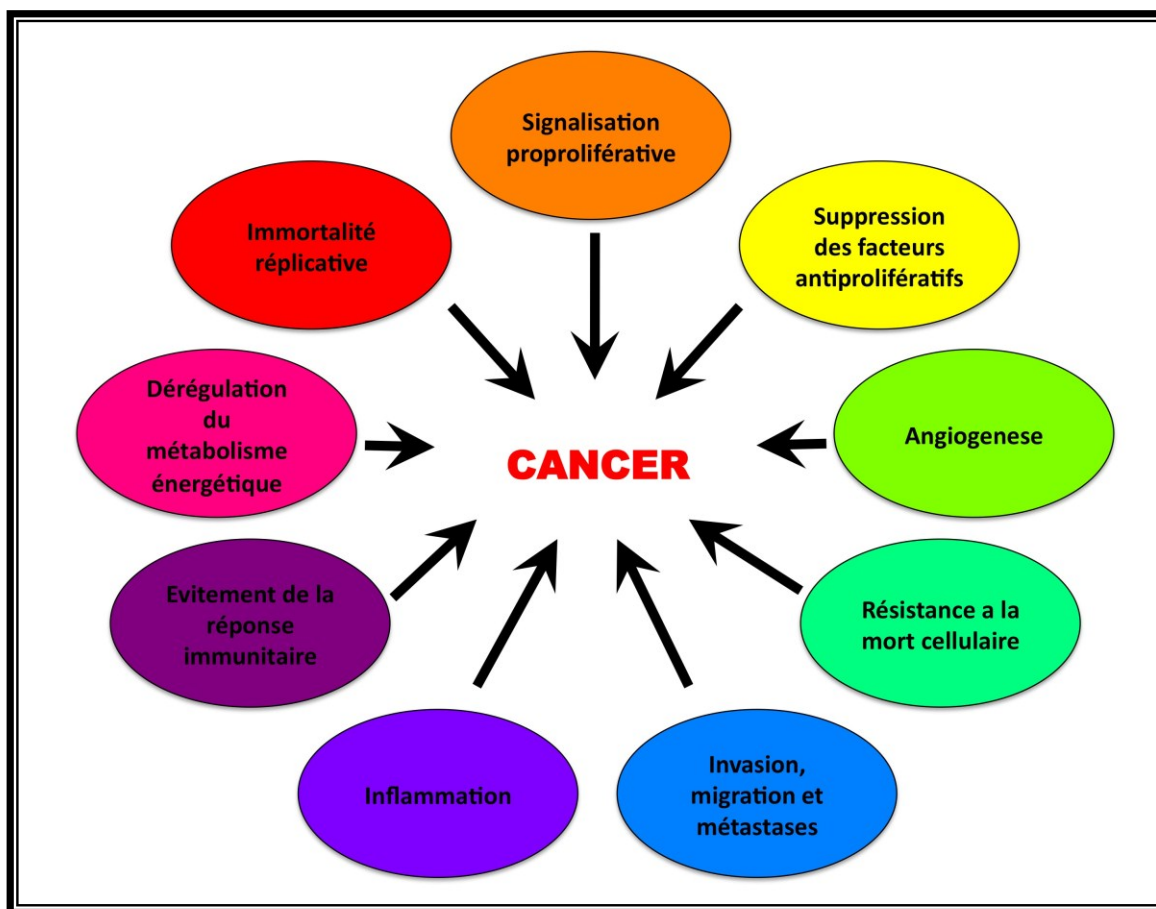


Figure 1- 9: « Sceau » du cancer décrit par Hanahan and Weinberg en 2011²³⁹.

Mécanismes cellulaires à l'origine du développement tumoral malin. L'instabilité génomique, l'inflammation, la reprogrammation du métabolisme énergétique sont des caractéristiques émergentes du phénotype tumoral.

1.5.4.1. Angiogénèse

1.5.4.1.1. Lésions plexiformes

Dans de nombreux cas de PAH, la formation d'une structure particulière appelée « lésion plexiforme » est observée. Cette structure ressemble à des glomérules rénaux et semble refléter une croissance anormale des cellules endothéliales^{245, 246}. Cela semble

également être associé à une réponse angiogénique vis à vis d'un stimulus local d'hypoxie ou d'ischémie, avec la formation de vaisseaux collatéraux par rapport aux artères obstruées.

Des anomalies et remodelages sont observés dans les différentes structures de la paroi des vaisseaux et contribuent à la constriction et l'obturation des petites artères pulmonaires. Ces dernières, dans la PAH, sont caractérisées par une fibrose de l'intima (cellules endothéliales), une hypertrophie et une hyperplasie de la media du fait d'une augmentation du nombre de VSMCs, et une prolifération de l'adventice par production accrue de matrice extracellulaire. Chaque type cellulaire est donc atteint dans sa fonction.

1.5.4.2. Instabilité génique

1.5.4.2.1. Mutation BMPR2

Le gène Bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) apparaît muté dans les formes familiales de la maladie, entraînant des dysfonctions dans la voie de signalisation du Transforming Growth factor- β (TGF- β) et des changements dans les taux de prolifération et d'apoptose^{247, 248}. Cette mutation est en effet associée à une perte de fonction de la voie de signalisation impliquant les suppresseurs de tumeurs SMAD (mothers against decapentaplegic homolog)^{248, 249}, et une augmentation de la voie de signalisation oncogénique p38/MAPK (Mitogen-activated protein kinase)^{250, 251}.

BMPR2 est également diminué en expression dans d'autres formes de PAH, comme celles associées au HIV^{252, 253}. Néanmoins, des études sur modèles animaux ont amené de la controverse. Alors qu'un modèle de souris transgéniques exprimant un transgène dominant-négatif BMPR2 développe spontanément un certain degré d'hypertrophie ventriculaire droite et d'hypertension pulmonaire²⁵⁴, une infection adénovirale exprimant un dominant positif de BMPR2 ne démontre pas d'amélioration de la condition dans un modèle de rat monocrotaline²⁵⁵. Aussi, BMPR2 ne peut être considéré comme la cause majeure de développement de la PAH.

c-Src (sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog) a été décrit comme un partenaire de BMPR2, l'interaction avec le domaine C-terminal de BMPR2 diminuant son activité. La mutation BMPR2 (ou la diminution d'expression) diminue cette interaction, augmentant l'activation de c-Src et suggérant un possible rôle de c-Src dans la PAH²⁵⁶.

1.5.4.2.2. Mutation dans le gène codant pour ALK1.

Une mutation dans le gène de ALK1 (Activin-like kinase 1) a été détectée dans un groupe de patient présentant une PHT associée à une télangiectasie hémorragique héréditaire^{257, 258}. Ces patients présentent également, tout comme dans le cas de la mutation BMPR2, une altération dans la voie de signalisation SMAD. De plus des cas de PAH chez des enfants arborant une mutation ALK1 mais sans présence de télangiectasie ont également été décrits^{259, 260}, suggérant que cette mutation pourrait être un facteur de risque indépendant pour la PAH.

1.5.4.2.3. Polymorphismes

Transporteur a la sérotonine 5-HTT.

L'analyse de la séquence promotrice du gène codant pour le 5-HTT a révélé l'existence d'un polymorphisme au niveau d'un motif, qui, selon qu'il est long ou court, va réguler une vitesse de transcription rapide ou lente, respectivement^{261, 262}. L'existence de ce polymorphisme a conduit à s'interroger sur la fréquence du génotype long chez les patients PAH (et PHT). Les études réalisées n'ont pas réussi à montrer que le génotype long est réellement un facteur de susceptibilité ou de prédisposition de la PAH^{261, 263, 264}. Néanmoins il se pourrait que la présence de ce génotype puisse influencer la sévérité ou l'évolution de la maladie.

Canaux potassiques Kv.

L'activité des Kv est importante pour la régulation du potentiel de membrane, du tonus vasculaire et de la prolifération des VSMCs. Des SNPs (single-nucleotide polymorphisms) dans le gène KCNA5 codant pour Kv1.5 ont été identifiés chez les patients atteints par une PAH idiopathique²⁶⁵. Parmi ces SNPs, certains sont présents dans le promoteur. Ils pourraient donc altérer le site de liaison des facteurs de transcription TFs et influencer la perte d'expression et d'activité des Kv1.5 dans la maladie.

1.5.4.3. Inflammation

Le rôle de l'inflammation dans la PAH est supporté par la présence d'auto-anticorps, de cytokines pro-inflammatoires IL-1 et IL-6 et d'infiltrats inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes T et B) chez les patient présentant une

PAH²⁶⁶. Ceci suggère que l'inflammation pourrait contribuer au développement de certaines formes de PAH²⁶⁷.

Compte tenu du fait que la PAH est associée à des maladies auto-immunes, telles que la sclérodermie ou la thyroïdite, il a longtemps été suggéré que l'auto-immunité est impliquée dans la pathogénèse de la PAH. Des auto-anticorps dirigés contre les cellules endothéliales et les fibroblastes ont été plus récemment détectés dans le sérum de patients avec une PAH idiopathique et associée à une sclérodermie²⁶⁸⁻²⁷⁰, confirmant les croyances ultérieures. De plus, la présence d'auto-anticorps antinucléaires et anti-tissulaires a été très récemment mesurée dans les séras de patients présentant une COPD cliniquement stable²⁷¹. Aussi, malgré que la PAH ne soit pas une maladie auto-immune, l'auto-immunité semble avoir un rôle important dans la pathogénèse de cette maladie.

Concernant les cytokines pro-inflammatoires, une augmentation des concentrations en IL-1 et IL-6 a été reporté chez les patients présentant une PAH idiopathique et associée à une sclérodermie^{272, 273}.

Des infiltrats de cellules inflammatoires, principalement composés de lymphocytes T et B, de macrophages et cellules dendritiques sont présents autour des artères pulmonaires remodelées dans les poumons des patients atteints par une PAH²⁷⁴. Les lymphocytes B jouent probablement un rôle majeur dans la pathogénèse de la PAH de par leur implication dans la présentation des antigènes, la production de cytokines, la différenciation des cellules T effectrices et de part leur collaboration avec les cellules dendritiques²⁷⁵. Une augmentation de l'activité des lymphocytes Treg et une diminution des cellules T cytotoxiques CD8+ a aussi été rapportée chez les patients présentant une PAH²⁷⁶. Ces cellules pourraient être à l'origine du contrôle de l'activité des lymphocytes B et T ainsi que de la fonction des cellules dendritiques²⁷⁷. Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène qui sont également responsables de l'initiation de la réponse inflammatoire. Les cellules dendritiques peuvent aussi se différencier en d'autres types cellulaires, comme les ECs. Perro et al. ont démontré l'augmentation de la présence des cellules dendritiques immatures au niveau des lésions vasculaires et leur rôle dans le remodelage des vaisseaux pulmonaires²⁷⁷.

1.5.4.4. Dérégulation du métabolisme énergétique et résistance à la mort cellulaire dépendante des mitochondries.

Les mitochondries sont des senseurs métaboliques qui reçoivent à tout moment les signaux de « santé de la cellule » et décident de la survie (production d'ATP) ou non (apoptose) de celle-ci²⁷⁸. Si les demandes des cellules prolifératives excèdent les apports, l'apoptose peut apparaître comme un moyen de préserver les réserves ou d'éviter le transfert des dommages causés à l'ADN par le stress oxydatif à la génération suivante. Aussi, la suppression de ces mécanismes apoptotiques qui dépendent des mitochondries peut offrir aux cellules prolifératives, un moyen de survivre indépendamment des apports et des dommages.

1.5.4.4.1. Prévalence de la glycolyse

La voie de signalisation glycolytique convertit dans le cytoplasme le glucose en pyruvate, avec production d'une faible quantité d'ATP. En sortie de glycolyse, le pyruvate peut être soit converti en lactate, soit être transféré dans la mitochondrie pour l'oxydation du glucose (Figure 1- 10). Pour cette dernière, le pyruvate est converti en Acétyl-CoA par le biais d'une enzyme, la pyruvate deshydrogénase (PDH), puis c'est l'Acétyl-CoA qui est introduit dans le cycle de Krebs. Il y a alors production de donneurs d'électrons NADH qui vont transférer les électrons au complexe I de la chaîne de transporteurs d'électrons (Electron transporter chain, ETC), et de donneurs FADH₂ qui vont eux, transférer leurs électrons au complexe III. Le flux d'électrons dans la ETC entraîne la production de ROS et de protons, à l'origine du $\Delta\Psi_m$ négatif. L'ATP synthase utilise cette énergie, stockée dans le $\Delta\Psi_m$, pour la synthèse d'ATP. Aussi, le $\Delta\Psi_m$ apparaît comme le reflet de l'activité de la ETC et des fonctions mitochondriales.

Otto Warburg, Prix Nobel 1931 pour ses travaux sur la respiration cellulaire, a démontré que la prévalence de la glycolyse vis-à-vis de l'oxydation du glucose joue un rôle essentiel dans l'installation et la maintenance d'un cancer. Dans le cancer, les mitochondries sont hyperpolarisées (hypernégatives) et la production des ROS mitochondriaux est diminuée^{240, 279}. Les mitochondries arborent un fonctionnement

modifié, leur activité est supprimée avec une prévalence pour la glycolyse vis-à-vis de l'oxydation du glucose. De la même façon, ce phénotype est également retrouvé dans la PAH²⁴⁰ et se matérialise également par une hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$), une diminution de l'activité de la PDH et une baisse de la production des ROS, comme l' H_2O_2 ²⁸⁰. La ETC n'est donc pas alimentée, d'où l'hyperpolarisation du $\Delta\Psi_m$ et la baisse de la production de ROS. Les ROS étant également des activateurs des canaux potassiques Kv1.5, la baisse de leur production dans la PAH corrèle avec la diminution d'activité des Kv1.5. Le pyruvate, non décarboxylé en acétyl-CoA, reste dans le cytoplasme soit pour être converti en lactate par la lactate déshydrogénase (LDH) avec production de NAD^+ , soit pour être utilisé dans des réactions anaplerotiques associées à la synthèse des acides aminés requis par les cellules prolifératives. Cette prévalence de la glycolyse est un signal pour la cellule qui arbore des caractéristiques de prolifération et de résistance à l'apoptose, en partie car les enzymes de la glycolyse ont également des fonctions anti-apoptotiques²⁸¹.

1.5.4.4.2. Apoptose dépendante des mitochondries

Dans les situations pathologiques (à l'opposé des situations physiologiques comme au cours du développement), la mitochondrie est considérée comme l'organelle provoquant la mort cellulaire²⁸². Le phénomène de départ est l'accroissement de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale pouvant aboutir à sa rupture²⁸³. Ce phénomène est produit par l'ouverture du pore non spécifique mPTP (mitochondrial permeability transition pore) qui va permettre à diverses substances apoptogènes d'être libérées dans le cytosol, dont principalement le cytochrome c, faisant normalement partie de la chaîne respiratoire, et l'AIF (Apoptosis-inducing factor) (Figure 1-10). La libération de ces facteurs proapoptotiques va mener à l'activation d'effecteurs, les caspases et à une cascade de protéolyse jusqu'à l'activation de DNAses. Le mPTP est formé d'au moins 3 éléments : le canal anionique dépendant du voltage (Voltage-Dependent Anion Channel, VDAC), la translocase ANT (Adenine Nucleotide Translocase) traversant la membrane interne et la cyclophiline-D, une protéine matricielle inhibitrice de l'ouverture du pore²⁸⁴⁻²⁸⁶. Des interactions spécifiques entre le mPTP et les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'ouverture du pore²⁸⁷. Bax et Bak, sont essentielles pour que la perméabilité du pore soit déclenchée. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL ralentissent le mécanisme de

déclenchement de l'apoptose et favorisent la survie de la cellule²⁸⁸. Bad et Bid envoient un signal apoptotique à la mitochondrie par une interaction avec Bcl-2 et empêchant la fermeture du VDAC. L'Hexokinase, enzyme catalysant la première étape de la glycolyse, peut être transloquée sur la membrane mitochondriale où elle se fixe sur le canal anionique voltage dépendant (VDAC) et inhibe alors l'apoptose par blocage mécanique des facteurs pro-apoptotiques à l'intérieur de la membrane mitochondriale²⁸⁹⁻²⁹¹.

LE SAVIEZ-VOUS

Chez les animaux, lors de la reproduction sexuée, la quasi totalité des mitochondries de la cellule œuf provient du gamète femelle. Des évidences montrent que les mitochondries paternelles entrent dans l'ooplasmе au moment de la fécondation et qu'elles sont rapidement et spécifiquement ciblées pour la dégradation par le système ubiquitine en place²⁹². Les raisons de cette sélection seraient évolutives (sélection de l'ADN mitochondrial le plus fort) ou développementales (élimination de mutations).

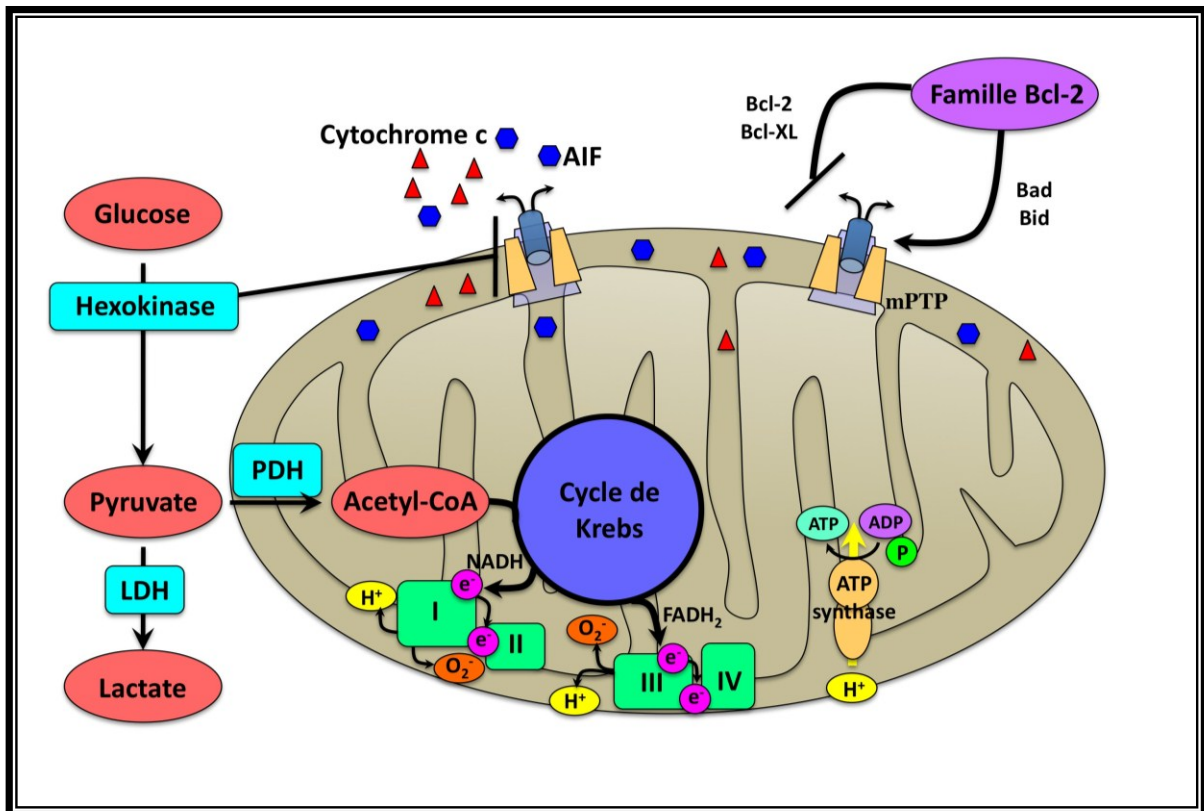


Figure 1- 10: Métabolisme mitochondrial et apoptose dépendante des mitochondries.

Lors de la glycolyse faisant intervenir des enzymes comme l'hexokinase, le glucose est converti en pyruvate, avec production d'une faible quantité d'ATP. En sortie de glycolyse, le pyruvate est soit converti en lactate, soit transféré dans la mitochondrie pour l'oxydation du glucose. Pour cette dernière, le pyruvate est converti en Acétyl-CoA par la pyruvate deshydrogénase (PDH). L'Acétyl-CoA qui est introduit dans le cycle de Krebs permet la production de donneurs d'électrons NADH, qui vont transférer leurs électrons au complexe I de la chaîne de transporteurs d'électrons (ETC), et de donneurs FADH₂ qui vont eux, transférer leurs électrons au complexe III. Le flux d'électron dans la ETC entraîne la production de ROS et de protons qui sont à l'origine du $\Delta\Psi_m$ négatif. L'ATP synthase utilise cette énergie, stockée dans le $\Delta\Psi_m$, pour la synthèse d'ATP. Aussi, le $\Delta\Psi_m$ apparaît comme le reflet de l'activité de la ETC et des fonctions mitochondriales. La voie métabolique et la voie apoptotique sont liées. Dans les situations pathologiques la mitochondrie est considérée comme l'organelle provoquant la mort cellulaire. L'ouverture du pore non spécifique mPTP (mitochondrial permeability transition pore) va permettre à diverses substances apoptogènes d'être libérées dans le cytosol, dont principalement le cytochrome c et l'AIF (apoptotic inducible factor) qui vont activer les effecteurs : les caspases. Des interactions spécifiques entre le mPTP et les protéines de la famille Bcl-2 régulent l'ouverture du pore. Les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL favorisent la survie et donc la fermeture du pore. Bad et Bid peuvent interagir avec Bcl-2 et empêcher sa fonction sur VDAC et favoriser l'apoptose. L'hexokinase peut également être transloquée sur le mPTP et empêcher son activité apoptotique.

1.5.4.4.3. Activation pseudo hypoxique de Hif-1 α

Durant la respiration normoxique, le transport d'électrons libres dans les complexes I et III de la ETC, résulte en la production de quelques radicaux superoxydes. Ces ROS sont potentiellement toxiques pour la cellule et sont rapidement convertis par la superoxyde dismutase-2 (SOD-2) présente dans la mitochondrie, en un second messager diffusible, le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). L'H₂O₂ régule l'activité de Hif-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α)²⁹³, un facteur de transcription sensible au potentiel redox, ainsi que l'ouverture et l'expression des Kv²⁹⁴. En conditions hypoxiques, les senseurs mitochondriaux sont altérés et l'expression des Kv, tels que Kv1.5 et Kv2.1 est diminuée^{294, 295}. Les mitochondries des cellules PAH-PASMCs sont déficientes au niveau des composants de la ETC, particulièrement le complexe I et SOD2. Ceci résulte en une diminution de la production de ROS créant une pseudo-condition d'hypoxie et une activation normoxique de Hif-1 α .

1.5.4.5. Signalisation pro-proliférative

1.5.4.5.1. Mitogènes

Dans la PAH, les patients présentent une augmentation du taux circulant de facteurs de croissances comme le PDGF (platelet-derived growth factor)^{296, 297}, l'EGF (Epidermal growth factor)²⁹⁸, de cytokines comme l'Interleukin-6 (IL-6), ou d'agonistes comme l'Endothelin-1 (ET-1)^{297, 299, 300}. Ces facteurs agissent comme de puissants mitogènes qui régulent de nombreuses réponses biologiques comme la prolifération, la survie et le métabolisme. Ces facteurs exercent leurs effets par fixation à des récepteurs présentant une activité tyrosines kinase (TKRs)) ou une activité serine/thréonine kinase, et par transduction d'un signal mitogène, notamment par des voies de signalisation impliquant des oncoprotéines. Il est donc vraisemblable que ce genre d'activités oncogéniques soient retrouvées dans la PAH.

1.5.4.5.2. Protéines avec activités oncogéniques et suppresseurs de tumeurs

RhoA/ROCK.

Nous avons vu précédemment que l'axe RhoA/ROCK joue un rôle particulier dans le maintien de l'état contractile des VSMCs. D'un autre côté, l'inhibition de RhoA/ROCK atténué également la prolifération des VSMCs³⁰¹. Des études principalement menées sur des

fibroblastes ont montré que la signalisation via RhoA/ROCK est importante pour la progression en phase G1 du cycle cellulaire en réponse à des mitogènes. Ceci requiert l'activation des CDKs (cyclin-dependent kinases). Les CDK sont activées par liaison avec des cyclines, notamment la cycline D1 et inhibées par une augmentation de l'expression de p27^{kip1} et p21^{cip1}. L'axe RhoA/ROCK est capable de réprimer p27^{kip1} et p21^{cip1}, ainsi que de stimuler la production de cycline A^{302, 303}.

Nuclear Factor of activated T-cells NFAT.

Le maintien du phénotype tumoral dans la PAH requiert l'activation du facteur de transcription NFAT (Nuclear factor of activated T-cells), responsable d'une partie des désordres associés à la PAH. L'activation de ce facteur de transcription est à l'origine de :

- réprimer la transcription de gènes pro-apoptotique comme Kv1.5, résultant en une accumulation de potassium intracellulaire, une dépolarisation de la membrane des PSMCs, une stimulation de l'ouverture des canaux calciques voltage dépendants entraînant une entrée de calcium dans la cellule, stimulant la contraction et de la prolifération. De plus, l'augmentation de Ca²⁺ intracellulaire provoque l'inhibition de la voie de signalisation menant à la mort cellulaire programmée par les caspases. Archer et al, ont montré l'importance de Kv1.5 et Kv2.1 dans le potentiel cellulaire³⁰⁴. Cette diminution de l'expression des canaux potassiques dans les PAH-PASMCs maintient la vasoconstriction présente dans la pathologie³⁰⁵. Moins de choses sont connues concernant Kv2.1, mais ils semblent encore plus impliqués que Kv1.5 dans le potentiel membranaire des PSMCs chez le rat³⁰⁴. Il a été montré que les anorexigènes bloquent les Kv et notamment Kv2.1³⁰⁶.

- activer la transcription de gènes pro-prolifératifs tels que Bcl2 qui va s'homodimériser et être transloqué à la membrane mitochondriale, résultant en une fermeture des pores mitochondriaux et une hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_m$), piégeant les facteurs pro-apoptotiques à l'intérieur de la mitochondrie et entraînant la résistance à l'apoptose.

L'inhibition de NFAT permet de stimuler l'apoptose en restaurant les fonctions mitochondriales, diminuer la prolifération des PSMCs, et dans un modèle expérimental *in vivo*, de réduire les PAPs, de diminuer le remodelage vasculaire et d'augmenter la survie³⁰⁷⁻³⁰⁹.

MAPK

La découverte de la mutation sur le gène BMPR2 dans la PAH a ouvert les investigations sur l'implication des suppresseurs de tumeurs et des oncoprotéines dans la pathogénèse de la maladie. En l'absence de son ligand BMP, les BMPRs forment des complexes hétérodimériques³¹⁰ qui activent une réponse dépendante des SMAD, principalement anti-proliférative³¹¹⁻³¹⁴. Par contre, lorsque le ligand BMP se fixe sur le récepteur, les complexes formés par le BMPR activent de façon préférentielle une réponse non-SMAD comme p38/MAPK^{249, 315}, qui est principalement pro-proliférative et anti-apoptotique. BMPR2 est le seul BMPR possédant un long domaine C-terminal. La délétion de ce domaine empêche la formation des complexes hétérodimériques, et favorise une signalisation BMP/SMAD²⁴⁹. La mutation BMPR2 entraîne la formation d'une protéine avec troncature du domaine c-terminal et est également associée à une diminution de la phosphorylation des intervenant SMAD1/5, diminuant la réponse SMAD et augmentant la réponse pro-proliférative en réponse au BMP4 avec une activation anormale de l'axe p38/MAPK^{250, 251}.

Il existe aussi des évidences montrant que ERK1/2 et JNK/SAPK, d'autres membres de la famille des MAPKs, sont régulés par les BMPs^{316, 317}. De plus, l'activation JNK/ERK est également associée à la prolifération des PSMCs induite par la 5-HT et la progression du cycle cellulaire³¹⁸, suggérant que cette voie de signalisation joue un rôle important dans la pathogénèse de la PAH.

HIF-1 α (Hypoxia inducible factor 1 α)/p53

Les concentrations en oxygène dans les tumeurs solides sont communément réduites en comparaison des tissus normaux. L'activation des mécanismes senseurs d'oxygène aide la cellule à s'adapter à l'apport inadéquat en oxygène. Ces mécanismes sont basés sur l'inhibition des protéines avec des domaines Prolyl-hydroxylase PHD). Ces senseurs à l'oxygène organisent une réponse adaptative à l'hypoxie et au stress oxydatif par

activation de HIF-1 α . HIF-1 α est un puissant facteur de transcription influençant l'expression de approximativement 1% des gènes du génome. En diminuant la consommation en oxygène et reprogrammant le métabolisme cellulaire, l'axe PHD/HIF-1 α permet à la cellule de tolérer l'hypoxie et le stress oxydatif. Le problème est que cette réponse adaptative est également associée à la croissance cellulaire. Nous avons vu aussi que la PAH est associée à une activation pseudo-hypoxique de HIF-1 α .

Des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes ont été décrits comme impliqués dans la modulation de l'activité de HIF-1 α et plus particulièrement dans la régulation de la sous unité α . Des suppresseurs de tumeur comme PTEN peuvent avoir un effet négatif sur le niveau d'expression protéique et d'activité de HIF-1 α , possiblement par implication de la PI3 kinase³¹⁹. A l'opposé, des oncogènes tels que Akt, Ras ou Src peuvent promouvoir son activité^{320, 321}. D'un autre côté, certains proto-oncogènes comme les effecteurs de la voie MAPK c-jun et c-fos, sont eux activés par l'hypoxie^{322, 323}, par un mécanisme dépendant de HIF-1 α ³²⁴. HIF-1 α communique également avec le suppresseur de tumeur p53 en hypoxie, qui peut être induit par p21³²⁵, un régulateur clé du cycle cellulaire dans les cellules exposées à l'hypoxie ou au stress oxydatif. Aussi HIF-1 α apparaît comme un puissant régulateur des voies de signalisation oncogénique dans le cancer. Comme une exposition prolongée à l'hypoxie est suffisante pour induire une PHT, qu'il existe une activation normoxique de Hif-1 α dans la PAH et que le stress oxydatif est un mécanisme clé de la pathogénèse de la PAH^{326, 327}, il est naturel de se demander quelle est l'implication des oncogènes et suppresseurs de tumeurs associés à Hif-1 α dans la PAH.

La surexpression de p27 a été montrée comme capable de diminuer la prolifération des PSMCs^{328, 329}, et de prévenir une PAH induite par l'hypoxie *in vivo*. Comme la diminution de l'expression de p27 est une caractéristique des cancers présentant une mutation p53, les intérêts se sont aussi portés sur le rôle de p53 dans la PAH. Les souris déficientes pour p53 développent une PAH plus sévère à l'hypoxie, avec des pressions ventriculaires plus hautes, un ratio RV/LVS plus grand et un épaissement plus important de la media des vaisseaux pulmonaires que les souris de type sauvage³³⁰. De plus ces effets ont été associés à une augmentation de l'expression de HIF-1 α et une perte d'expression de p21. Le rôle de p21 fut étudié plus en détail dans la PAH par une surexpression de p21

induite par un adénovirus dans un modèle de rat présentant un shunt gauche/droit. La surexpression de p21 dans ce modèle a été associée à une inhibition du développement de la PAH, confirmant un effet protecteur de p21³³¹.

1.5.4.5.3. miRNA avec activité oncogénique et suppresseur de tumeur.

Durant les 20 dernières années, l'implication des protéines et facteurs de transcription a activité de suppresseurs de tumeur ou oncogènes a été étudiée et a ouvert de nouvelles voies d'investigation et de nouvelles perspectives thérapeutiques pour la PAH. Plus récemment, les micro-ARNs (miRNA) sont apparût comme une autre classe d'importants régulateurs des processus cellulaires. Leur expression est dérégulée dans de nombreux cancers et autres maladies, et ils présentent leurs propres propriétés oncogéniques ou de suppresseurs de tumeurs. Aussi, leur possible implication dans la PAH a été suggérée.

Les miRNAs sont des petits ARNs non codants de 17 à 23 nucléotides régulant négativement et post-transcriptionnellement l'expression de gène. Ceci intervient par fixation du miRNA sur la région 3'UTR (untranslated région) d'un ARN messager (mRNA)³³². Cette interaction entre le miRNA et sa cible entraîne une répression de la traduction par clivage, séquestration du mRNA ou bien répression ribosomale. Plus de 1000 miRNAs ont été séquencés à ce jour dans le génome humain et il est estimé qu'ils régulent environ 30% de l'expression globale des gènes³³². Les miRNAs sont transcrits par la polymérase 2 en un pri-miRNA non mature (Figure 1- 11). Un complexe protéique comportant l'endonucléase Drosha procède au clivage du pri-miRNA en pré-miRNA possédant une structure en tête d'épingle. Ce pré-miRNA est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5, ou il est clivé par une deuxième endonucléase, Dicer, pour générer un miRNA double brin. Seul le brin 5' va être pris en charge par le complexe RISC pour être dirigé sur l'ARNm cible.

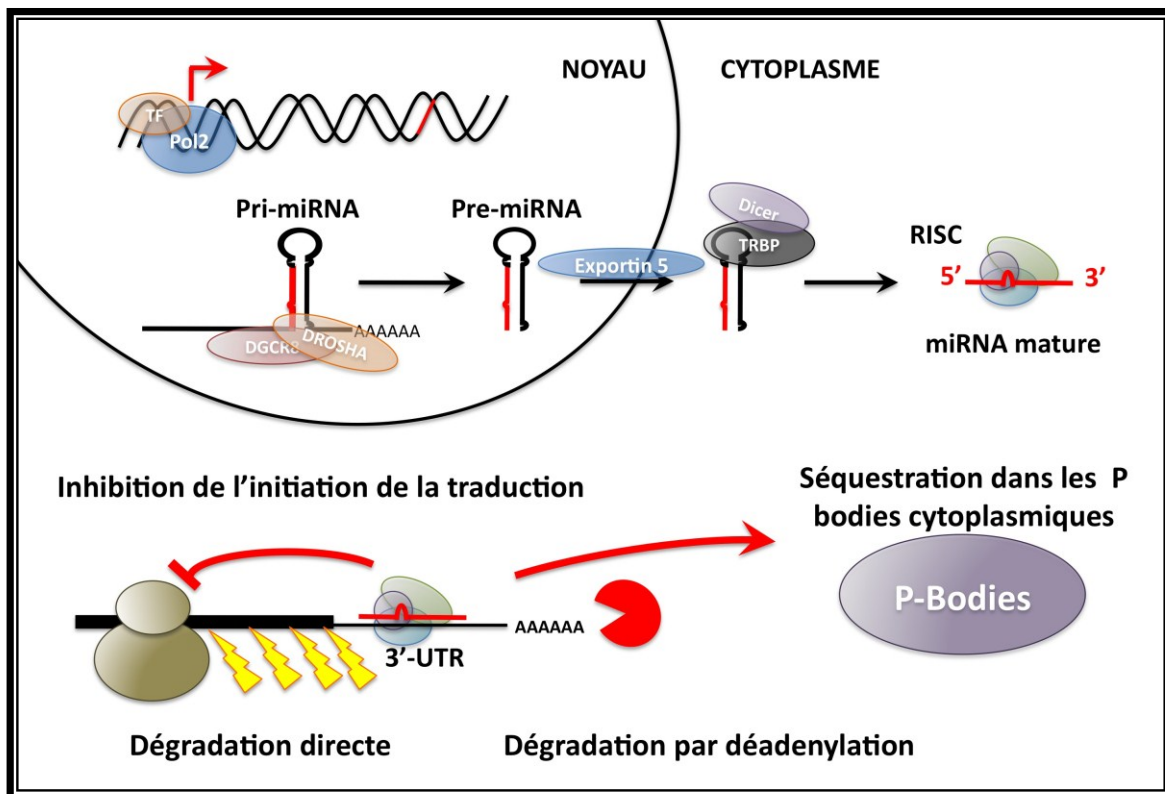


Figure 1- 11: Biosynthèse des microARNs et mécanismes de régulation post-transcriptionnelle de l'expression génique.

Les miRNAs sont transcrits par la polymérase 2 en un pri-miRNA non mature. Un complexe protéique comportant l'endonucléase Drosha procède au clivage du pri-miRNA en pré-miRNA possédant une structure en tête d'épingle. Ce pré-miRNA est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5, ou il est clivé par une deuxième endonucléase, Dicer, pour générer un miRNA double brin. Seul le brin 5' va être pris en charge par le complexe RISC pour être dirigé sur l'ARNm cible. Il y a fixation du miRNA sur la région 3'UTR (untranslated région) d'un ARN messager et répression de la traduction par clivage, séquestration du mRNA ou bien répression ribosomale.

Le rôle fondamental des miRNAs a été mis à jour suite aux observations faites après l'inactivation du gène Dicer chez la souris, une modification génétique létale. De plus, l'altération de l'expression de Dicer liée à un adénocarcinome³³³ induit une expression aberrante de l'ensemble des miRNAs, suggérant que la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes par les miRNAs est une étape essentielle du développement fœtal et pathologique. Les miRNAs sont principalement logés dans les introns des unités transcriptionnelles codant pour des protéines (60%). Leur transcription peut être dépendante du promoteur du gène hôte ou d'un autre promoteur, permettant une fine régulation de la transcription des miRNAs. Cette régulation est similaire à celle rencontrée pour les gènes codant les protéines : les promoteurs sont contrôlés par des facteurs de transcription (transcription factors, TFs), des éléments de régulation positifs et négatifs et des modifications de la chromatine. Aussi, l'expression des miRNA est fortement liée à l'activité des TFs. L'expression de nombreux miRNAs est régulée par des TFs tels que c-Myc, p53 et HIF-1 α , qui sont aberramment activés dans la plupart des cancers. Des évidences ont d'ailleurs montré que la dérégulation de l'activité transcriptionnelle joue un rôle majeur dans le profil d'expression des miRNAs dans le cancer. De nombreux exemples décrivent aussi une régulation réciproque de l'activité du TF par les miRNAs (et donc contrôlant leur propre expression) par des boucles de rétrocontrôle positives ou négatives.

miRNAs dépendants de STAT3

La régulation de l'expression de BMPR2 vient d'être décrite comme sous l'emprise des miRNAs par Brock et ses collègues³³⁴. Par des analyses bioinformatiques ils ont mis à jour que plusieurs intervenants du regroupement de miRNAs 17/92 sont capable de lier et cibler BMPR2. Ce regroupement est situé dans le 3ème intron du gène C13orf25, transcriptionnellement régulé par STAT3 (Signal Transducer and activator of transcription 3). Dans un modèle de cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine HPAECs, l'activation de STAT3 par une stimulation à l'IL-6 entraîne la fixation de STAT3 sur la région promotrice de miR-17/92 (C13orf25), augmentant la transcription du gène, l'expression du miRNA et diminuant finalement l'expression de BMPR2.

miRNAs dépendants de l'hypoxie.

De nombreux miRNAs semblent inductibles par l'hypoxie ou par p53. miR-34a est décrit comme le miRNA dont l'expression est la plus significativement dépendante de p53 dans le cancer, il est en plus relié à une induction de l'apoptose et un arrêt du cycle cellulaire^{335, 336}. Mizuno et al. ont montré une augmentation de l'expression de miR-34a dans les poumons des souris sous hypoxie depuis 2 semaines. L'expression de ce miRNA est par contre supprimée chez les souris délétères du gène p53. Ceci suggère que miR-34a est régulé par l'induction hypoxique de p53 et pourrait être induit dans la voie de signalisation menant au remodelage vasculaire hypoxique dans les poumons³³⁰. miR-210 est un des miRNAs des plus sensibles à l'hypoxie, impliqué dans la régulation de la réponse hypoxique des cellules tumorales et des tumeurs en croissance³³⁷. miR-210 est transcriptionnellement induit par HIF-1 α et sa surexpression protège les cellules mammaires cancéreuses de l'apoptose induite par l'hypoxie³³⁸. miR-210 semble également jouer un rôle dans la régulation du cycle cellulaire³³⁹, des fonctions mitochondriales³⁴⁰ et d'autres facteurs associés au développement de la PAH. Néanmoins, l'expression de miR-210 dans la PAH humaine et expérimentale PAH n'a pas été démontrée comme significativement dérégulée^{341, 342}.

miRNAs dépendants BMP/SMAD.

De façon très intéressante, Davis et al. ont montré qu'une stimulation au TGF- β ou aux BMPs induit rapidement l'expression de miR-21 et miR-199a dans les PSMCs. Ceci fait intervenir une étape post-transcriptionnelle, promouvant la transformation du pri-miR en pré-miR par Drosha. La translocation des R-Smads au noyau en réponse à la stimulation permet leur complexation avec Drosha et facilite le clivage du pri-miRNA³⁴³. Les auteurs ont identifié plus tard dans un groupe de pri-miR régulés post-transcriptionnellement par la signalisation dépendante du TGF- β et des BMPs, une région contenant une séquence conservée similaire à la séquence de l'élément de liaison de SMAD. Les SMADs peuvent lier directement cette séquence et fournir une plateforme pour Drosha, facilitant ainsi le clivage des pri-miRs³⁴⁴. Cette étude fournit un mécanisme intéressant de sélection et de régulation d'un groupe de miRNAs par la voie de signalisation au TGF β /BMP. Comme la

signalisation BMP est altérée dans la PAH³⁴⁵, il est facilement envisageable que ce groupe de miRNAs soit exprimé de façon aberrante dans la PAH.

Caruso et al. ont justement décrit une diminution de l'expression de miR-21 dans le modèle expérimental de PAH par injection de monocrotaline chez le rat³⁴¹. Néanmoins, la régulation, les cibles et le rôle de miR-21 dans la pathogénèse de la PAH restent à être définis. miR-21 a été associé précédemment à une hyperplasie de l'intima³⁴⁶, et pourrait avoir un rôle tout particulier dans le remodelage vasculaire vu dans la PAH.

1.5.4.6. Migration /invasion

Le mécanisme cellulaire considéré comme l'une des différences majeure séparant le phénotype cellulaire acquis par les PAH-PASMCs de celui acquis par les cellules cancéreuses est le pouvoir métastatique. Même si les PAH-PASMCs ne sont effectivement pas métastatiques, il existe des similarités intéressantes entre les VSMCs qui répondent à une blessure ou stimulus inflammatoire et les cellules cancéreuses métastatiques. Dans les deux cas, la cellule répond aux facteurs environnementaux en proliférant, sécrétant des molécules chemotactiles, en dégradant la membrane basale par sécrétion de métalloprotéases qui vont invalider la matrice. Le phénotype contractile des VSMCs est alors transformé en un phénotype dit synthétique, caractérisé par une augmentation de la prolifération et de la migration^{347, 348}. La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la régulation de la migration des VSMCs reste quelque peu limitée mais peut être déduite en partie des études réalisées sur fibroblastes.

1.5.4.6.1. Le cycle migratoire.

Le mécanisme de migration dépend d'un changement polarisé de la forme de la cellule³⁴⁹. En réponse à des signaux environnementaux, le cytosquelette d'actine et de myosine de la cellule adopte des changements dynamiques, générant des géométries dans l'espace et le temps, la cellule devenant de plate et étendue à ronde, allongée et multipolaire³⁵⁰. Pour migrer la VSMC a besoin de déployer des lamellipodes par polymérisation du cytosquelette d'actine en direction du stimulus, un événement proximal qui va permettre à la cellule de s'étendre (Figure 1-12). Des points de contact focaux vont se développer immédiatement au niveau de cette protrusion de façon à créer un attachement de la membrane cellulaire à la matrice extracellulaire. La myosine associée aux filaments

d'actine dans le corps de la cellule, génère des forces permettant la propulsion de la cellule. Le cytosquelette se remodèle et les structures cellulaires qui sont attachées par des protéines adaptatrices à ce cytosquelette se déplacent. Les points de contact présents à l'opposé de la protrusion se détachent par dégradation, facilitant également le déplacement. Les forces de tractions transmises par les points de contacts focaux à la matrice sont générées par activation des moteurs de myosine, via l'activation dépendante du calcium de la MLCK et phosphorylation de la MLC. La voie RhoA/ROCK peut également activer la myosine de façon indépendante du calcium. En plus des points focaux d'adhésion et du réarrangement des filaments d'actine, la migration cellulaire nécessite également un réarrangement des microtubules. Pendant la migration, le noyau de la cellule est réorienté et le MTOC (microtubule organizing center) reste au centre de la cellule.

1.5.4.6.2. Migration vs invasion.

Il existe différents types de migration en fonction de si la migration est aléatoire ou dirigée et s'il y a dégradation ou non de la ECM. Lorsqu'il y a dégradation de la EMC, la mobilité cellulaire est appelée invasion plutôt que migration et implique la formation de structures cellulaires différentes des lamellipodes, appelées invadopodes et podosomes où les métalloprotéinases de la matrice (Matrix Metalloproteinase MMP) sont activées. Que ce soit pour la migration ou l'invasion, la motilité cellulaire implique un réarrangement du cytosquelette d'actine. C'est la profiline qui active la polymérisation de l'actine à l'extrémité positive. La dépolymérisation de l'actine est engagée à l'extrémité négative par la cofiline pour limiter d'une part la longueur des filaments mais également pour la rotation des filaments existants (Figure 1-12). De plus lamellipodes, invadopodes et podosomes partagent un nombre de composants incluant les intégrines et autres protéines nécessaires au niveau des points focaux d'adhésions comme FAK (Focal adhésion kinase), cofiline, paxilline, taline et Src, entre autres (Figure 1- 12).

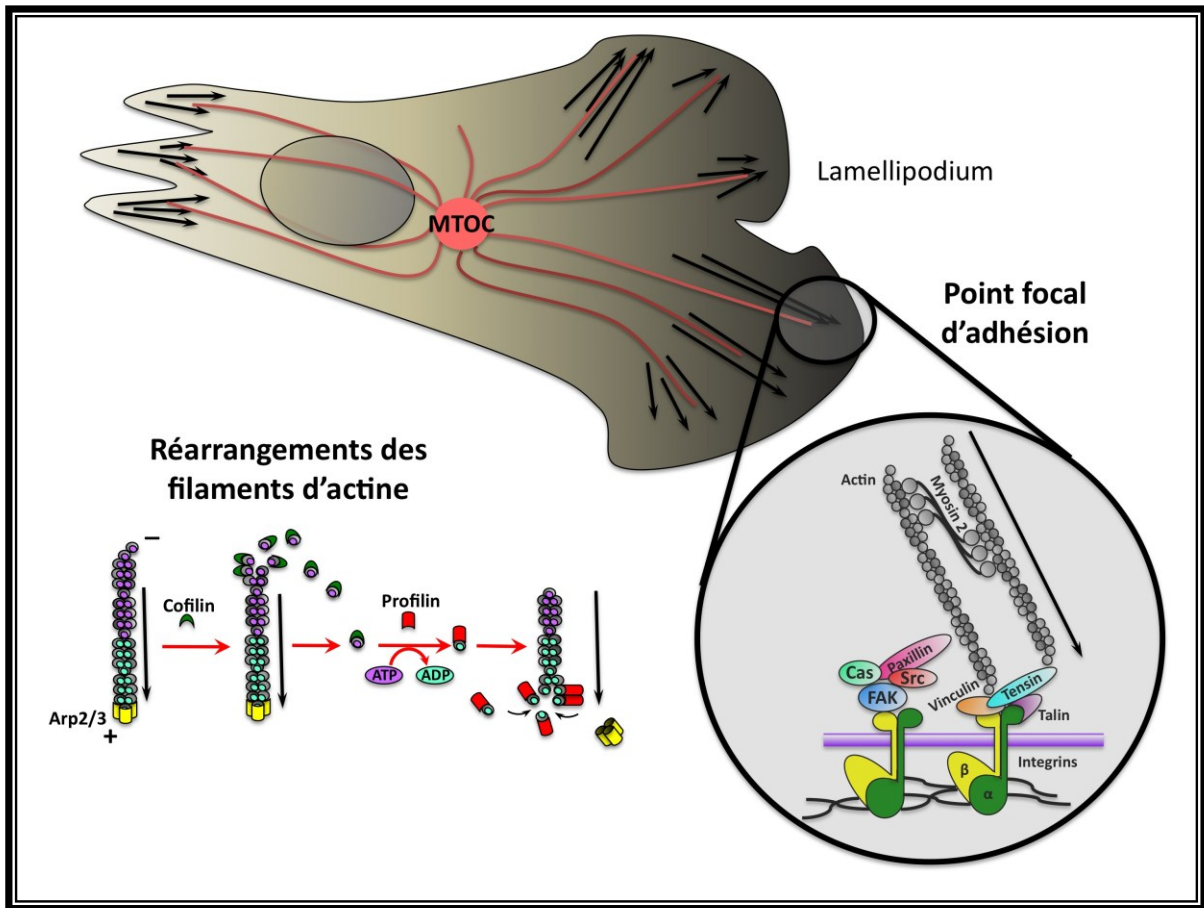


Figure 1- 12: Le cycle migratoire.

Pour migrer la VSMC déploie des lamellipodes par polymérisation du cytosquelette d'actine en direction du stimulus. Des points de contact focaux vont se développer immédiatement au niveau de cette protrusion de façon à créer un attachement de la membrane cellulaire à la matrice extracellulaire. Il y a un réarrangement du cytosquelette d'actine. C'est la profiline qui active la polymérisation de l'actine à l'extrémité positive, alors que la cofiline dépolymérise l'actine à l'extrémité négative. De plus lamellipodes, invadopodes et podosomes partagent un nombre de composants incluant les intégrines et autres protéines nécessaires aux point focaux d'adhésions comme FAK (Focal adhesion kinase), cofiline, paxilline, taline et Src entre autres. La myosine associée aux filaments d'actine dans le corps de la cellule, génère des forces permettant la propulsion de la cellule. Le cytosquelette se remodèle et les structures cellulaires qui sont attachées par des protéines adaptatrices à ce cytosquelette se déplacent. Les points de contact présents à l'opposé de la protrusion se détachent par dégradation, facilitant également le déplacement.

1.5.4.6.3. Migration pathologique.

Le phénotype migratoire des VSMCs, tout comme le phénotype prolifératif, est nécessaire au cours du développement et pour la réparation des lésions tissulaires en réponse à une lésion vasculaire. D'un autre côté, la migration pathologique des VSMCs est un des facteurs majeurs amenant à la formation des plaques athérosclérotiques et à la resténose vasculaire. En cas de lésion, la production de signaux par les cellules lésées active la migration et la prolifération des cellules voisines de façon à activer la réparation. Si ces signaux persistent après réparation, les VSMCs ne retrouvent pas leur phénotype contractile et le phénotype synthétique devient pathologique.

1.5.4.6.4. Migration dans la PAH

Il est assez bien caractérisé aujourd'hui que le PDGF est un puissant stimulateur de la migration des PSMCs³⁵¹⁻³⁵³ notamment par activation de la voie ERK/MAPK. L'augmentation de l'expression et de l'activité de la cofiline et la profiline a également été décrite dans les PSMCs stimulées au PDGF et dans les PAs des rats MCT-PAH³⁵⁴. Cette équipe a aussi montré une implication de la LIMK2, qui est responsable de la phosphorylation et donc de l'activité de la cofiline. LIMK2 est une isoforme de la LIMK1, qui comme c-Src est capable d'interagir avec le domaine c-terminal de BMPR2³⁵⁵ résultant en une diminution de l'activité de LIMK1. La liaison de BMP sur BMPR2 atténue cette diminution d'activité, augmentant la phosphorylation de la cofilin et entraînant des changements dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Ceci suggère donc que dans la PAH, où le signal BMP est détérioré, où BMPR2 peut être muté ou diminué en expression, la séquestration de la LIMK1 serait levée et son activité augmentée, provoquant la phosphorylation de la cofilin et la réorganisation de l'actine propice à la migration. Ceci pourrait être aussi le cas pour LIMK2, mais ces mécanismes restent à être démontrés. Rabinovitch et ses collaborateurs ont également décrits qu'après stimulation au S100A4 (appartenant à la famille des protéines se liant au calcium avec un motif main-EF) ou au BMP-2 la migration des PSMCs est engagée via BMPR2 et RAGE (Receptor for Advanced-glycation end-products)^{356, 357}. De nombreuses études in vitro ont également démontré que l'hypoxie stimule la migration des PSMCs³⁵⁸⁻³⁶⁰, de façon dépendante ou indépendante de l'activation de Hif-1 α . Et finalement il a aussi suggéré une régulation de la migration des PSMCs par la sphingosine-1 via l'implication de ROCK³⁶¹.

Les thérapies actuellement approuvées comme le Bosentan, le Sildénafil ou les analogues des prostacyclines ont des effets vasodilatateurs et des effets antiprolifératifs, principalement associés à la modification des taux de calcium intracellulaires et à une inhibition de la prolifération dépendante du calcium. Tous ces traitements ont montré une amélioration de la qualité de vie des patients et de la survie, mais présentent aussi d'importants effets secondaires^{362, 363}. De plus, étant donné la persistance des hauts taux de mortalité et la persistance des problèmes hémodynamiques chez de nombreux patients, la communauté d'expert est d'avis que ces traitements sont insuffisants. Aussi, l'étude des mécanismes moléculaires impliqués dans la pathogénèse de la PAH reste essentielle.

HYPOTHESE GENERALE.

A l'exception des inhibiteurs des RTK, la plupart des thérapies en phase clinique aujourd'hui visent encore à rétablir la balance vasodilatation/vasoconstriction. Pourtant, certaines évidences montrent qu'il existe un parallèle entre cancer et PAH, suggérant que l'implication des voies de signalisation oncogéniques dans l'étiologie de la PAH est majeure. Nous pensons que cibler des voies de ce type aurait plusieurs avantages. D'abord, activées de façon inappropriée dans la circulation pulmonaire spécifiquement, aucune conséquence sur la circulation systémique ne devrait être associée à leur inhibition. De plus, il serait possible de tirer partie des essais cliniques déjà en cours pour certaines molécules anti-cancer. En effet, des données de tolérance pour certaines molécules pourraient être exploitables pour accélérer leur utilisation dans la PAH.

Aussi, mon travail de Doctorat a visé à démontrer l'implication de nouvelles voies oncogéniques dans la PAH et de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques, plus spécifiques et pouvant potentiellement donner de meilleurs résultats au niveau de la survie.

**CHAPITRE 2: L'AXE DE SIGNALISATION
STAT3/PIM1 JOUE UN ROLE CRUTIAL DANS
LA PATHOGENESE DE LA PAH.
L'INHIBITION DE PIM1, EN AVAL DE STAT3,
ABROGE LA PAH.**

HYPOTHESE DE TRAVAIL.

En 2007, le laboratoire a démontré l'implication du facteur de transcription NFAT dans la PAH, comme étant responsable d'une partie des désordres associés à la pathologie²⁴². Néanmoins une inhibition d'NFAT est associée à des effets secondaires graves (immunosuppression) du fait de l'implication d'NFAT dans la réponse immunitaire.

Les mécanismes d'activation d'NFAT dans la PAH demeurent inconnus et pourraient être d'un grand intérêt thérapeutique pour une inhibition plus spécifique de ce facteur de transcription. Par contre il est nécessaire d'inhiber uniquement l'activation inappropriée de NFATc2 sans toucher à son activation constitutive qui physiologiquement importante et nécessaire, pour le maintien d'une bonne réponse immunitaire par exemple.

Pim-1 (Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus) est un proto-oncogène codant une protéine serine/thréonine kinase¹⁷³. De récents travaux montrent que Pim1 est capable d'induire l'activation de NFAT dans les cellules PC12 et Jurkat^{364, 365}. De plus, la surexpression de Pim1 est liée au développement et à la progression de nombreux cancers en augmentant la prolifération, la survie cellulaire et la résistance à l'apoptose³⁶⁶⁻³⁶⁹. Dans les pathologies cardio-vasculaires, il a été montré que l'activation de Pim1 dans les VSMCs et les cardiomyocytes augmente la prolifération par une modulation de la concentration calcique intracellulaire $[Ca^{2+}]_i$, la résistance à l'apoptose par une augmentation de Bcl2 (protéine dépendante de NFAT et anti-apoptotique) et par une inhibition de la protéine pro-apoptotique Bad (i.e. en augmentant PS¹¹²-Bad)³⁷⁰⁻³⁷². L'augmentation simultanée de Bcl2 et PS¹¹²-Bad provoque une hyperpolarisation du potentiel de membrane mitochondriale, une inhibition du relargage du cytochrome c et de l'activation des caspases-9. L'expression de Pim1 est induite, via l'activation de la voie de signalisation impliquant STAT3³⁷³, par de nombreuses cytokines et facteurs de croissance, dont certains apparaissent augmentés dans le sérum des patients atteints par une PAH³⁷⁴.

STAT3 est un facteur de transcription activé par de nombreuses cytokines, facteurs de croissance ainsi que par des oncoprotéines telles que Ras ou Src^{375, 376} au niveau de RTKs ou de protéines tyrosines kinases non-récepteurs (Src, ERK). Parmi les nombreux activateurs de STAT3, plusieurs apparaissent comme des facteurs augmentés en expression

dans le plasma des patients atteints par une PAH. En comparaison de patients contrôles, les patients avec une PAH montrent, en effet, un taux circulant élevé de cytokines et chemokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6²⁷², la monocyte chemoattractant protein (MCP-1³⁷⁷), RANTES^{378, 379}, Tumor necrosis factor (TNF- α), Interferon (IFN- γ)³⁸⁰, de facteurs de croissance tels que Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)³⁸⁰³⁸¹, de facteurs thrombotiques comme LIGHT³⁸², tous connus pour être des activateurs de STAT3³⁸³⁻³⁸⁷.

La phosphorylation de STAT3 dans le cytoplasme conduit à sa dimérisation, à son transport dans le noyau et à sa fixation sur l'ADN. Les nombreux gènes cibles de STAT3 sont impliqués dans la régulation de la prolifération, l'apoptose et la différenciation. De façon intéressante, des études *in silico* (ENCODE consortium database³⁸⁸) ont révélé la présence de plusieurs sites, conservés entre les espèces, de liaison des STATs sur le 3' du gène codant pour Pim1. De même, plusieurs sites de liaison des STATs ont été identifiés dans le promoteur des trois isoformes de NFAT³⁸⁹, majoritairement impliquées dans la PAH²⁴² (NFATc1, c2 et c3).

Aussi nous émettons l'hypothèse que Pim1 active NFAT dans la PAH, par une voie de signalisation impliquant possiblement STAT3. Alors que le rôle de STAT3 dans la PAH a été suggéré³³⁴, sa fonction exacte reste à être établie, de même que les effets de son activation sur l'expression et l'activation de Pim1 et NFAT.

2. The STAT3/Pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension.

One-sentence summaries: *Pim1 inhibition reverses pulmonary hypertension*

Roxane Paulin¹MS; Audrey Courboulin¹MS; Jolyane Meloche¹BS; Vincent Mainguy²MS; Eric Dumas de la Roque^{3, 4}MD; Nehmé Saksouk¹PhD; Jacques Côté¹PhD; Steeve Provencher²MD; Mark A Sussman⁵PhD and Sébastien Bonnet¹PhD.

Circulation. 2011; 123: 1205-1215

¹Department of Medicine, Université Laval, Québec City, Canada, Centre de recherche du CHUQ Hôtel-Dieu de Québec.

²Faculté de médecine Université Laval, Québec City, Canada, Centre de recherche CRIUCPQ, Québec.

³Université Bordeaux2, 146 rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, France

⁴INSERM U 885, 146 rue Léo Saignat, 33076, Bordeaux, France

⁵SDSU Heart Institute San Diego State University, Biology Department, North Life Sciences room 426 500 Campanile Drive San Diego, CA 92182, USA

Corresponding author:

Dr Sébastien Bonnet

Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec

10 rue McMahon, Québec, Qc,

G1R 2J6, Canada

Phone: 418 525 4444 ext 16350

Fax: 418-691-5562

sebastien.bonnet@crhdq.ulaval.ca

RESUME

INTRODUCTION : La PAH est une pathologie vasculaire caractérisée par une augmentation de la prolifération et de la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire. Le maintien de ce phénotype requiert l'activation du facteur de transcription NFAT. L'onco-protéine kinase Pim-1, impliquée dans la prolifération et la survie cellulaire, est reconnue comme un puissant activateur de NFAT. Dans le cancer Pim-1 est principalement activée par STAT3, un facteur de transcription lui-même activé par des cytokines (Il-6, TNF) et des facteurs de croissance (PDGF) qui sont impliqués dans la pathogénèse de la PAH. *Nous émettons donc l'hypothèse que l'axe STAT3/Pim1 est impliqué dans l'étiologie de la PAH.*

RESULTATS/METHODES : Nous avons montré que l'activation de STAT3 et l'expression de Pim1 sont augmentées ($p < 0.05$; Western blot, qRT-PCR et immunofluorescence) dans la PAH humaine (échantillons pulmonaires, buffy coat et PAH-PASMCs), ainsi que dans les modèles expérimentaux (MCT et CH) en comparaison des contrôles, et corrélaient positivement avec les pressions moyennes et les résistances vasculaires ($p < 0.05$ $n=30$ patients). De plus cet axe est à l'origine de l'expression et de l'activation de NFAT puisque l'inhibition de STAT3 (ARN interférence) diminue l'expression de NFAT ($p < 0.05$ $n=5$; qRT-PCR) alors que l'inhibition de Pim1 diminue son activation ($p < 0.05$, $n=5$; essai luciférase et translocation nucléaire). L'inhibition de l'axe STAT3/Pim1 1) augmente l'apoptose de 25% ($n=150$ $p < 0.05$, TUNEL et TMRM); 2) diminue la prolifération de 30% (PCNA et FLUO3 $n=150$, $p < 0.05$). *In vivo*, l'inhibition de Pim1 par inhalation d'ARN interférents chez les rats MCT-HTAP ($n=10$; $p < 0.05$) montre un effet thérapeutique caractérisé par 1) une inhibition spécifique de NFAT dans les PAs, 2) une baisse des pressions pulmonaires, du remodelage vasculaire et de l'hypertrophie ventriculaire droite (échographie et cathétérisation). Pour finir, les souris déficientes pour Pim1 sont résistantes à l'induction de la PAH ($n=20$).

CONCLUSION : Nous avons démontré pour la première fois que Pim-1 présente un potentiel thérapeutique considérable et que cette protéine pourrait être un bio-marqueur intéressant permettant un diagnostic précoce de la PAH.

ABSTRACT

Background: Pulmonary artery hypertension (PAH) is a proliferative disorder associated with enhanced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and suppressed apoptosis. The sustainability of this phenotype required the activation of a prosurvival transcription factor like signal transducers and activators of transcription-3 (STAT3) and nuclear factor of activated T cell (NFAT). Because these factors are implicated in several physiological processes, their inhibition in PAH patients could be associated with detrimental effects. Therefore, a better understanding of the mechanism accounting for their expression/activation in PAH pulmonary artery smooth muscle cells is of great therapeutic interest.

Methods and Results: Using multidisciplinary and translational approaches, we demonstrated that STAT3 activation in both human and experimental models of PAH accounts for the expression of both NFATc2 and the oncoprotein kinase Pim1, which trigger NFATc2 activation. Because Pim1 expression correlates with the severity of PAH in humans and is confined to the PAH pulmonary artery smooth muscle cell, Pim1 was identified as an attractive therapeutic target for PAH. Indeed, specific Pim1 inhibition *in vitro* decreases pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and promotes apoptosis, all of which are sustained by NFATc2 inhibition. *In vivo*, tissue-specific inhibition of Pim1 by nebulized siRNA reverses monocrotaline-induced PAH in rats, whereas Pim1 knockout mice are resistant to PAH development.

Conclusion: We demonstrated for the first time that inhibition of the inappropriate activation of STAT3/Pim1 axis is a novel, specific, and attractive therapeutic strategy to reverse PAH.

2.1. Introduction

Pulmonary artery (PA) hypertension (PAH) is a proliferative vascular remodeling disease characterized by enhanced inflammation⁸³, vasoconstriction and (PA) smooth muscle cells (PASMCs) proliferation and resistance to apoptosis⁸⁶. This leads to an increase in pulmonary vascular resistance (PVR) and eventually to right heart failure³⁹⁰. The sustainability of this pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype is due in part to the activation of the transcription factor NFAT, Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT)^{240, 242}. Nonetheless, the mechanism by which NFAT expression and activation are increased remains elusive.

The Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT) protein family regulates diverse cellular processes including growth and survival, and is frequently deregulated in cancer. The family is composed of 7 isoforms (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, and STAT6), with STAT3 being the most important in cardiovascular diseases^{391, 392}. STATs are activated (i.e. phosphorylated [P-STAT] and translocated to the nucleus) in response to cytokines (such as Interleukin-6 (IL-6))³⁹³, growth factors (such as Platelet-derived growth factor (PDGF))³⁹³ or agonists (such as Endothelin-1 (ET1) and Angiotensin II (AngII)),³⁹⁴ all of which are implicated in PAH^{297, 299, 300}. Interestingly, several STAT binding sites have been identified within the promoter regions³⁸⁹ of NFATc1; NFATc2 and NFATc3 (the 3 major NFAT isoforms implicated in PAH²⁴²). Although the role of STAT3 in PAH has been suggested³³⁴ its exact function and its effects on NFAT remain to be established.

In cancer, STAT3 promotes the expression of the Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus (Pim1), a proto-oncogene encoding a serine/threonine protein kinase¹⁷³. Overexpression of Pim1 is linked to the development and progression of several cancers by increasing cell proliferation/survival and resistance to apoptosis³⁶⁷⁻³⁶⁹. Finally, Pim1 activation enhanced NFATc1 through 4 activity in rat PC12 cells and lymphoid cells^{364, 365}, suggesting a potential role for Pim1 in PAH.

The present study aimed to elucidate the role of STAT3 and Pim1 in the origin of PAH, particularly with regard to the sustainability of the proproliferative and anti-apoptotic phenotype mediated by NFAT.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Human tissue samples (Tab.1):

All human tissues were obtained from the Laval Hospital tissue bank. PAH tissues were from 8 subjects with nonfamilial PAH, all classified within the group 1 of the latest World Health Organization classification with a mean PA pressure >25 mm Hg. Normal lung tissues were obtained from 8 individuals without PAH undergoing lung resection for benign nodules (n=3) and malignant tumor (n=5). Buffy coat samples were obtained from 7 healthy donors, 13 nonfamilial PAH patients (9 idiopathic PAH and 4 scleroderma-PAH), and 7 patients with scleroderma. All experiments were performed in accordance with Laval University and Laval Hospital biosafety and ethics committee (protocol 20142). All patients gave informed consent before the study.

2.2.2. Cell culture:

For all PASMCs (control and PAH) we used cells in the fourth to sixth passage. PAH-PASMCs were isolated from <1,500 μm -diameter small pulmonary arteries from 3 males with PAH defined by a mean PAP greater than 25mmHg (Supplemental Tab.1) as previously described²⁸⁰. Control PASMCs from 5 patients were purchased (Cell Application group USA). See supplemental material and methods. PASMC (less than passage 6) were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 1% antibiotic/antimycotic (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)²⁴⁰.

2.2.3. Cell treatments:

All treatments from EMD Bioscience, (Mississauga, ON, CANADA) were diluted in DMSO (DMSO final concentration <0.001%). Endothelin 1 (10nM), Angiotensin 2 (200nM), PDGF (30ng.mL⁻¹), TNF α (100ng.mL⁻¹) and Quercetagine (1 μM) were applied for 48h. siRNA (from AMBION, Austin, TX, USA) were transfected at a final concentration of 20nM with CaCl₂. After 12h, medium was changed and experiments were performed 48h after the beginning of the transfection. Adenoviruses were used by simply infection (1 $\times 10^7$ PFU) for 48h as previously described^{240, 280}. Efficiencies of siRNA transfections and adenoviruses infections rates were assessed in Supplemental Fig.11.

	Patient type	Sex	Age	Mean PA pressure (mmHg)	PVR (dyne*sec)/cm ⁵	Buffy Coat	Lung tissue
1	Healthy	F	35	ND	ND	No	Yes
2	Healthy	F	38	ND	ND	No	Yes
3	Healthy	M	45	ND	ND	No	Yes
4	Healthy	M	51	ND	ND	No	Yes
5	Healthy	M	48	ND	ND	No	Yes
6	Healthy	F	44	ND	ND	No	Yes
7	Healthy	F	47	ND	ND	No	Yes
8	Healthy	F	50	ND	ND	No	Yes
9	Healthy	F	30	ND	ND	Yes	No
10	Healthy	F	40	ND	ND	Yes	No
11	Healthy	F	25	ND	ND	Yes	No
12	Healthy	F	27	ND	ND	Yes	No
13	Healthy	M	72	ND	ND	Yes	No
14	Healthy	M	64	ND	ND	Yes	No
15	Healthy	M	18	ND	ND	Yes	No
16	iPAH	M	67	30	219.35	Yes	No
17	iPAH	F	34	62	770.37	Yes	No
18	iPAH	F	24	69	884.21	Yes	No
19	iPAH	F	25	32	279.36	Yes	No
20	iPAH	F	48	29	381.32	Yes	No
21	iPAH	M	57	36	885.71	Yes	No
22	iPAH	F	29	55	1050	Yes	No
23	iPAH	M	68	92	1276.92	Yes	No
24	iPAH	F	58	56	1709	No	Yes
25	iPAH	F	36	67	2274	No	Yes
26	iPAH	F	44	40	755.55	Yes	No
27	SSC-PAH	F	57	56	569.23	Yes	No
28	SSC-PAH	F	59	41	558.49	Yes	No
29	SSC-PAH	F	66	123	1403.07	Yes	No
30	SSC-PAH	F	55	48	980	No	Yes
31	SSC-PAH	F	63	35	546.34	Yes	No
32	PAH group1	F	64	59	926	No	Yes
33	PAH group1	M	72	39	11.7	No	Yes
34	PAH group1	M	58	42	991	No	Yes
35	PAH group1	F	51	51	1199	No	Yes
36	PAH group1	F	48	73	1800	No	Yes
37	PAH group1	F	51	41	990	No	Yes
38	PAH group1	F	68	37	544	No	Yes
39	SSC only	F	63	ND	ND	Yes	No
40	SSC only	F	69	ND	ND	Yes	No
41	SSC only	F	48	22	208.69	Yes	No
42	SSC only	F	46	ND	ND	Yes	No
43	SSC only	F	51	ND	ND	Yes	No
44	SSC only	M	55	28	177.77	Yes	No
45	SSC only	F	64	21	84.21	Yes	No

Table 2- 1: Patients providing blood (buffy coat) and lung tissue:

iPAH: idiopathic PAH; SSC-PAH: PAH associated with scleroderma; SSC: scleroderma; PAH class1: PAH defined as group 1 based on latest World health organization WHO classification.

2.2.4. $\Delta\Psi_m$ and $[Ca^{2+}]_i$

Measurement of the $\Delta\Psi_m$ and $[Ca^{2+}]_i$ in live PASMCs (37°C) were performed using tetramethylrhodamine methyl-ester perchlorate (TMRM) and Fluo-3AM from Invitrogen (Branchburg, NJ, USA) at a final concentration of 5 μ M, as previously described^{241, 242}.

2.2.5. Proliferation and apoptosis measurements.

To study the effect of STAT3 and Pim1 on PASMC proliferation and apoptosis *in vitro*, we established a model where cultured human PAH-PASMCs were exposed to 10% FBS (a condition that is known to promote proliferation)^{240, 242} or 0.1% FBS (a “starvation” condition that promotes apoptosis)^{240, 242}. PASMC apoptosis and proliferation were measured using Apoptag apoptosis detection kit (TUNEL; Millipore, Temecula, CA) and the proliferating cell nuclear antigen PCNA antibody from (DAKO, Carpinteria, CA) according to the manufacturer’s instructions^{241, 242}. Percent of nuclei positive PASMCs for TUNEL or PCNA were determined.

2.2.6. Nuclear translocation assay.

Nuclear localization was measured by immunofluorescence. In humans/rats and mice lungs biopsies PAs were previously stained with SM-Actin (Sigma, 1/5000), STAT3 and NFATc2 activation were measured only in SM-Actin positive cells within distal PAs (<1500 μ m in human, <400 μ m in rats and <300 μ m in mice) in at least 5 to 10 PAs per patient/rat/mice at least in 5 patients/rats/mice. In PASMCs, STAT3 and NFATc2 activation were measured in at least 50 PASMCs per experiment per patient. At least 3 experiments were performed in 3 PAH and 5 healthy patients. Briefly, PY705-STAT3 (Cell Signaling, 1/250) and NFATc2 (ABCam, 1/250) staining were performed as previously described²⁴². Secondary antibodies used were Alexa Fluor 488 or 594 (Invitrogen, Branchburg, NJ, USA). Co-localization between the targeted protein stained in red or green and the nucleus stained in blue with DAPI was assessed using Volocity software from Perkin Elmer USA. Co-localization was assessed at least in 5 to 10 distal arteries (<1500 μ m in human, <400 μ m in rats and <300 μ m in mice) per patient/rat/mice at least in 5 patients/rats/mice. Number of positive cells (with clear co-localization between target and DAPI) was measured. Positive PASMCs/total number of cells ratio was quantified and presented as the percentage of target activation.

2.2.7. NFAT luciferase assay.

Cells were plated in 24-well plate, with 1×10^5 cells per well. NFAT luciferase adenovirus was transfected at 1×10^7 PFU. After 12h, medium was changed and treatments were applied for 48h. Cells were lysed, and luminescence was detected using the Luciferase Assay System (Promega) according to the manufacturer's instructions. Luminescence counts were standardized to protein content.

2.2.8. Quantitative RT-PCR and immunoblots.

Quantitative RT-PCR and immunoblots were performed as previously described²⁴¹.²⁴² qRT-PCR $2^{\Delta\Delta Ct}$ were calculated with 18s as housekeeping gene (Taqman Gene expression Assay, Applied Biosystem, Foster, CA, USA). For immunoblots, protein expression of PY705-STAT3, STAT3, PS473-Akt, Akt, PY701-STAT1, STAT1, PY694-STAT5, STAT5, PS112-Bad, Bad, NFATc2 were quantified and normalized to both smooth muscle actin (Santa Cruz Biotechnology, 1/500) and Amido Black as previously described²⁴². PY705-STAT3/STAT3, PS473-Akt/Akt, PY701-STAT1/STAT1, PY694-STAT5/STAT5 and PS112-Bad/Bad ratios evaluation were obtained from the same gel after 30min stripping at 50 degrees.

2.2.9. In vivo experiments:

Rats were injected s.c. with 60mg.Kg^{-1} of MCT. Mice were injected i.v. with 5mg.Kg^{-1} of monocrotaline pyrrole (MCTP) as previously described²²⁶. Monocrotaline was converted to MCTP using the methodology of Mattocks *et al*²²⁵. Intra-tracheal nebulization was given on day 18, siSCR (AMBION, 1nmol) and siPim1 (AMBION, 1nmol) were combined with InvivoFectamine (Invitrogen, Canada) as described by manufacturer. Mice CH were placed for 2 weeks in normobaric hypoxic chambers maintained with 5.5 l min^{-1} flow of hypoxic air (10% O₂ and 90% N₂). Chambers were opened twice a week for cleaning and replenishment of food and water. Oxygen concentrations were continuously monitored with blood gas analyzers. Soda lime was used to lower carbon dioxide concentration.

2.2.10. Hemodynamic measurements.

All rats and mice underwent hemodynamic and echocardiography (vevo 2100 visualsonics) studies as previously described^{242, 243}. Right catheterizations (closed chest) were performed using SciScience catheters. Direct PA pressures were measured in both rats and mice.

2.2.11. Histology measurements:

% media wall thickness was assessed in distal PAs in rats (<400µm) and mice (<300µm) as previously described²⁴², at least in 5 to 10 distal arteries per rats/mice in least in 5 rats/mice were considered.

2.2.12. ChIP-PCR.

The binding of STAT3 on 3' region of Pim1 gene was studied in ET-1 stimulated PSMCs from 3 control patients. The activation of STAT3 by ET-1 was confirmed by immunoblots as shown in (Fig.1). Cross-links were generated with 1% formaldehyde and chromatin was extracted in lysis buffer (50mM Tris-HCl pH8; 10mM EDTA; 0,2 % SDS and 5mM Na-Butyrate). Chromatin was then sheared by sonication (Diagenode Bioruptor) on ice to an average length of 750bp. After pre-clearing with a mix of protein A/G sepharose beads (4°C for 1 hour), 80µg of chromatin was used for immunoprecipitation with appropriate antibodies [Phospho-Sat3 (Tyr705) from Cell Signaling (9131; 10ml) and normal rabbit IgG from Vectors laboratories (I-1000; 10mg)] in a total volume of 300µl. After overnight incubation at 4°C, 25µl protein-A Dynabeads (Invitrogen) was added and incubate for more than 1 hour. Beads were extensively washed and immunoprecipitated complexes were eluted in buffer E (50mM sodium bicarbonate; 1 % SDS). Cross-links were reversed overnight at 65°C. Samples were treated with proteinase K and the DNA was extracted using phenol-chloroform. Quantitative real-time PCR was performed using SYBR Green I (LightCycler 480, Roche). Enrichment for a specific DNA sequence was calculated using the comparative Ct method. The numbers presented with standard errors are based on two biological repeats (cells/chromatin/IP). Primers used in the PCR reactions were analyzed for specificity, linearity range and efficiency in order to accurately evaluate occupancy (percent of IP/input). VEGF primers were used as positive control, while OR8J1 primers were used as negative control.

2.2.13. siRNAs and adenoviruses efficiencies

Efficiencies of transfections and infections were evaluated by both qRT-PCR and immunoblot see Supplemental Fig.11C.

2.2.14. Statistics:

Averaged data are mean±SEM. Normality of our data was assessed by the Shapiro-Wilk normality test. For comparison between 2 means we used unpaired Student's *t* test. For comparison between more than two means we used one-way ANOVA followed by Dunn's test. For correlation studies Spearman two tails test was used. Significance $p < 0.05$ is indicated by *, $p < 0.01$ by ** and $p < 0.001$ by ***. In cultured cell based experiment *n* indicates the number of patients, while in vivo it indicates the number of animals. For survival analysis a cohort of 20 KO and 20 WT mice exposed to CH or injected to MCTP were prospectively followed for 25 days and sacrificed after hemodynamic studies on day 25 after MCTP injection or CH exposure. Spontaneous deaths were counted as events and mice undergoing planned hemodynamic studies and sacrifices were censored. Time-to-event data were plotted using the Kaplan-Meier method, with differences evaluated using the Log-Rank test. A ($p < 0.05$) was considered as significant.

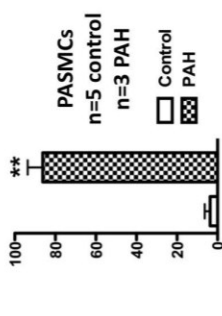
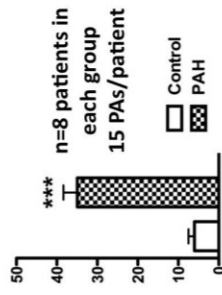
2.3. Results

2.3.1. STAT3 activation is increased in human PAH-PASMC.

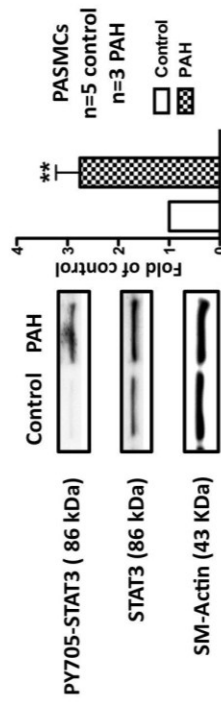
STAT3 activation (nuclear translocation of Y705-phosphorylated STAT3) was measured in whole pulmonary arteries (PAs) of 8 PAH patients and 8 healthy donors (Table 2-1) and in PASMCs isolated from 8 individuals, (3 PAH and 5 healthy donors). Compared with control, the percentage of cells presenting a colocalization between P-STAT3 and DAPI was significantly increased in PAs from PAH patients and in PAH-PASMCs (Figure 2-1A). This finding was confirmed in PASMCs by immunoblots measuring the PY705-STAT3/STAT3 ratio normalized to smooth muscle actin (Figure 2-1A).

A STAT3 activation is increased in human PAH

% of cells with PY705-STAT3/DAPI colocalization in whole distal PAs

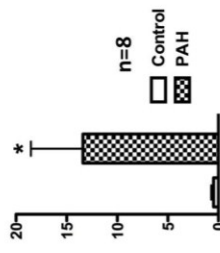


PY705-STAT3/STAT3 Normalized to SM-Actin in PASMCS

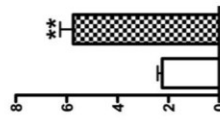


B Pim1 expression is increased in human PAH and correlates with PAH severity

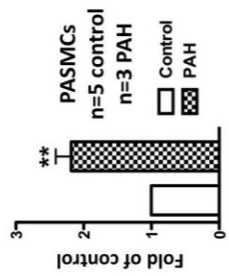
Pim1 total lung mRNA level ($2^{\Delta\Delta Ct}$ to 18S)



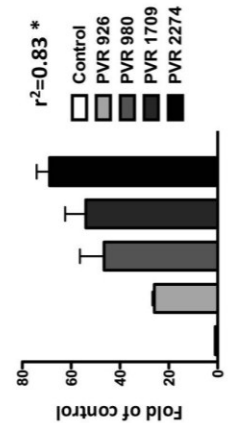
PASMCS Pim1 mRNA level ($2^{\Delta\Delta Ct}$ to 18S)



PASMCS Pim1 / SM-Actin

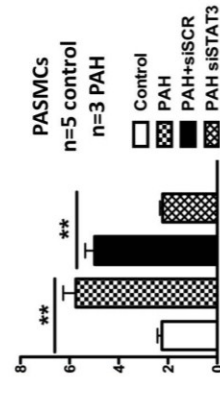


Pim1 total lung mRNA levels correlate with PVR



C STAT3 activation in PAH-PASMC promotes Pim1 expression

Pim1 mRNA level ($2^{\Delta\Delta Ct}$ to 18S) in PASMCS



PY705-STAT3/STAT3 Normalized to SM-Actin

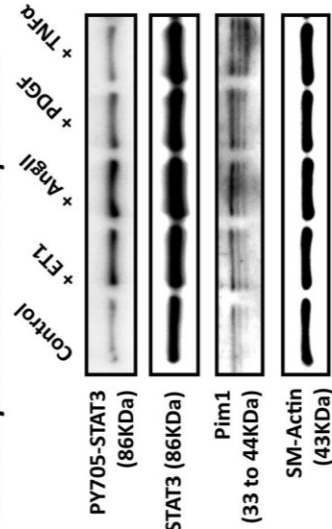
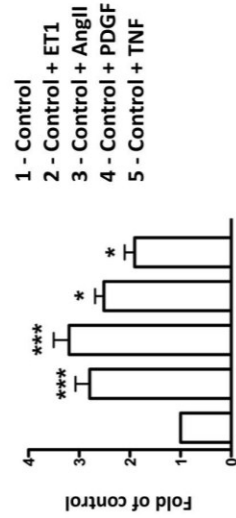


Figure 2- 1: The STAT3/Pim1 axis is activated in Human PAH.

The signal transducers and activators of transcription-3 (STAT3)/Pim1 axis is activated in human pulmonary artery (PA) hypertension (PAH). **A**, STAT3 activation measured by PY705-STAT3 nuclear localization is significantly increased in both whole PAs and PA smooth muscle cells (SMCs) isolated from PAH patients compared with control. This was confirmed by immunoblots showing a 2.8-fold increase in the PY705-STAT3/STAT3 ratio in PAH PASMCS compared with control PASMCS. **B**, Pim1 mRNA levels measured by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) are significantly increased in both lungs and PASMCS isolated from PAH patients compared with control patients. This was confirmed by immunoblots in isolated PASMCS. Finally, Pim1 mRNA levels in lungs correlate with PAH severity assessed by pulmonary vascular resistance (PVR). **C**, PAH PASMCS treated with siSTAT3 had a significant reduction in Pim1 expression (qRT-PCR) compared with the scrambled-treated cells. Endothelin-1- (ET1; 10 nmol/L), angiotensin II- (AngII; 200 nmol/L), platelet-derived growth factor- (PDGF; 30 ng/mL), and tumor necrosis factor- (TNF; 100 ng/mL) treated healthy PASMCS had an increased PY705-STAT3/STAT3 ratio associated with a proportional increase in Pim1 expression measured by immunoblots ($P < 0.05$ vs control group).

2.3.2. Pim1 expression is increased in human PAH-PASMC and correlates with PAH severity.

To investigate the role of Pim1 in PAH, Pim1 expression was measured in both lungs (from 8 PAH and 8 control patients) and in PASMCS isolated from distal PAs (3 PAH and 5 Control patients). Compared to control, a 8-fold and a 2.5-fold increase in Pim1 mRNA levels (qRT-PCR) was observed in PAH-lung tissue and PAH-PASMC respectively (Figure 2-1B). This was confirmed at the protein level in distal PAs by immunofluorescence (Supplemental Figure 2-1A) on lung sections with Pim1 in green, SM-Actin in red and nucleus in blue (DAPI). As shown, green fluorescence was significantly increased in PAH. In addition, the rise in Pim1 was mainly localized within the PASMCS as shown by a greater colocalization between smooth muscle actin and Pim1 giving a yellow staining (Supplemental Figure 2-1A). This finding was confirmed in isolated PASMCS using immunoblots (Figure 2-1B) showing a 2-fold increase in Pim1

protein expression in PAH-PASMCs compare to control.

To determine whether Pim1 expression correlates with PAH severity, Pim1 mRNA expression was measured in human lungs with varying degrees of PAH, evaluated by PVR. As shown, Pim1 mRNA levels positively correlates with PVR (Figure 2-1B). Because PAH is characterized by increased circulating levels of activated T-cells²⁴² and endothelial progenitor cells (EPC)^{395, 396} in which Pim1 is expressed^{397, 398}, Pim1 expression could be used as a PAH marker. Thus, Pim1 mRNA levels were measured in human buffy coat (containing both T-cells and EPC) isolated from healthy donors, patients with idiopathic PAH, patients with scleroderma only and patients with PAH associated with scleroderma (Table 2-1). As in lungs and PAH-PASMC, Pim1 expression was significantly increased in buffy coats of patients with PAH associated or not with scleroderma (Supplemental Figure 2-1B). As in lungs, Pim1 mRNA levels in buffy coats correlates with PAH severity evaluated by both mean of PA pressure and PVR (Supplemental Figure 2-1B). These results further support a role for Pim1 in PAH and suggest that Pim1 may be a good biomarker for the disease.

2.3.3. STAT3 activation in human PAH-PASMC triggers Pim1 expression.

To investigate whether STAT3 plays a role in the regulation of Pim1 in PAH, Pim1 mRNA levels were measured in PAH and control PASMC in the presence or absence of STAT3 siRNA (siSTAT3). Compared to the scrambled siRNA, siSTAT3 significantly reduce Pim1 expression in PAH-PASMC (Figure 2-1C), suggesting that STAT3 activation regulates Pim1 expression in PAH-PASMC. To confirm this finding, healthy-PASMCs were treated for 48h with factors known to activate STAT3 and that are increased in PAH^{297, 299, 300} like ET1, AngII, PDGF and TNF. As expected, these factors increase STAT3 activation measured by immunoblots (PY705-STAT3/STAT3 ratio) by 2.8, 3.2, 2.5, 1.9-fold in ET1, AngII, PDGF and TNF treated PASMC respectively (Figure 2-1C), which promoted Pim1 expression (Figure 2-1C).

To determine whether STAT3 binds directly to the Pim1 gene and activates its transcription, we performed *in silico* analysis using ENCODE consortium database³⁸⁸. This analysis revealed the presence of several STATs binding sites in 3' of the Pim1 gene,

conserved among several species (Supplemental Figure 2-2A). Chromatin immunoprecipitation coupled to PCR (ChIP-PCR) experiments were performed to demonstrate the direct binding of STAT3 in 3' of the Pim1 gene. VEGF gene was used as a positive control (with established STAT3 binding sites³⁸⁹) while OR8J1 gene was used as negative control (without STAT3 binding sites³⁸⁹). As predicted in silico, we showed that STAT3 binds directly to Pim1, while no bindings were identified with OR8J1. Based on our positive control VEGF the interaction between STAT3 and Pim1 (which showed greater binding signal) can be considered as strong (Supplemental Figure 2-2B). Among other putative Pim1 activators, neither STAT1; STAT5³⁹³ nor Akt^{399, 400}, appeared to be activated in PAH-PASMCs (Supplemental Figure 2-3A). Therefore, STAT3 is likely responsible of Pim1 activation in PAH.

2.3.4. Pim1 promotes proliferation and resistance to mitochondria-dependent apoptosis in PAH-PASMCs.

We treated PAH-PASMCs with either Pim1 or STAT3 siRNA and their control-scrambled siRNA, and STAT3 inhibitor peptide (50 μ M) or its negative control. Compared to healthy PASMCs, PAH-PASMCs had a greater proliferation rate (increased % of PCNA positive cells) and were resistant to starvation (0.1% FBS) induced apoptosis (decreased % of TUNEL positive cells Figure 2-2A). Similarly to STAT3 inhibition (siRNA and inhibitor peptide), Pim1 inhibition (siRNA) in “starved” PAH-PASMCs increased apoptosis by 8.2-fold; while PAH-PASMCs (10% FBS) proliferation was decreased by 2.4-fold (Figure 2-2A). These findings were confirmed in healthy-PASMCs stimulated for 48h with PDGF (30ng.mL⁻¹) or ET-1 (10nM)(Supplemental Figure 2-4A) both known as pro-proliferative factors⁴⁰¹⁻⁴⁰³.

Pim1 is implicated in mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) regulation^{404, 405}, thus the increase in apoptosis following Pim1 inhibition might result from the activation of mitochondrial-dependent apoptosis. As the mitochondria transition pore is voltage-dependent⁴⁰⁶, $\Delta\Psi_m$ depolarization is an index of the threshold for mitochondrial-dependent apoptosis, and apoptosis is associated with decreased $\Delta\Psi_m$. Using tetramethylrhodamine methyl-ester (TMRM) we measured $\Delta\Psi_m$ in PAH-PASMCs transfected with Pim1 siRNA and in control-PASMC infected by an adenovirus carrying the Pim1 gene (Ad-GFP-Pim1-

WT). Transfections of PAH-PASMC with Pim1 siRNA caused significant $\Delta\Psi_m$ depolarization, compared with control-scrambled treated PAH-PASMCs. In contrast, infection of control-PASMC with Ad-GFP-Pim1-WT caused a significant $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization compared to Ad-GFP treated control-PASMC (Figure 2-2B). These data confirmed the role of Pim1 in $\Delta\Psi_m$ regulation in PAH-PASMC and thereby mitochondrial-dependent apoptosis. Similar results were obtained with the STAT3 peptide inhibitor (Supplemental Figure 2-4B). Note that Pim1 inhibition has no effects in control PASMC (data not shown).

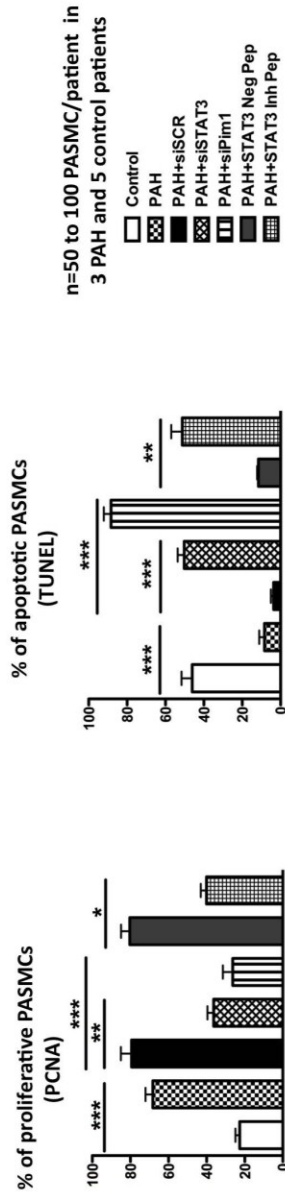
Figure 2- 2: Pim1 is implicated in the regulation of both PASMC proliferation and apoptosis.

(A) PAH-PASMCs had increased proliferation (% PCNA) and decreased apoptosis (%TUNEL) compared with healthy PASMCs. Both STAT3 inhibition and Pim1 inhibition significantly decrease PAH-PASMC proliferation and promote apoptosis.

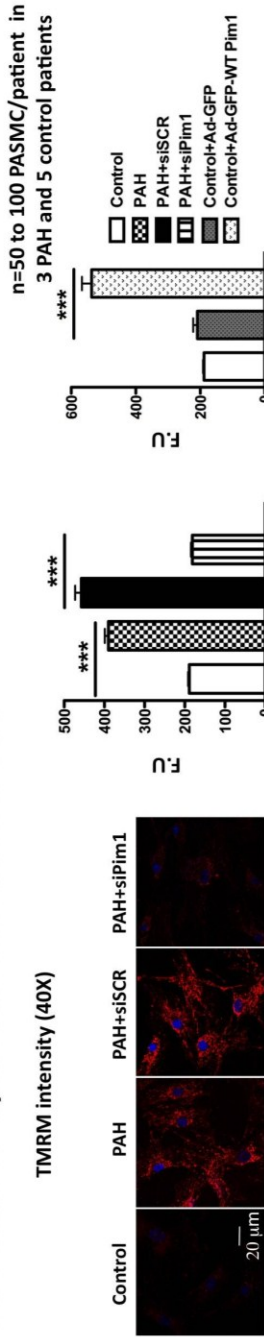
(B) Pim1 inhibition in PAH-PASMC reverses $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization (TMRM), while Pim1 activation in healthy PASMCs using adenovirus overexpressing Pim1 promotes it.

(C) Pim1 inhibition in PAH-PASMC decreases PS112-Bad/Bad ratio, allowing Bad translocation to the mitochondria (increased co-localization between Bad in green and mitochondria (mitotracker red) in red giving a yellow pattern).

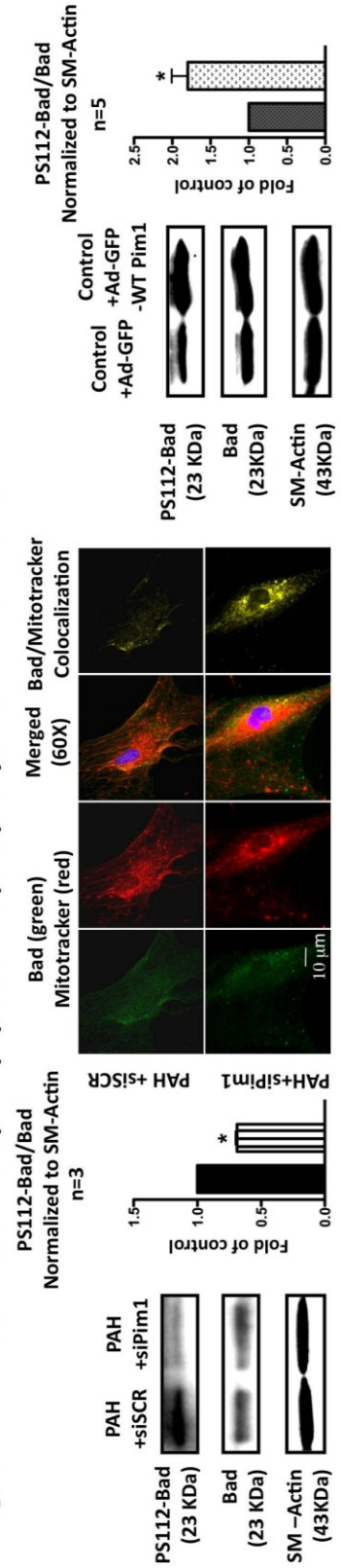
A *Pim1* inhibition decreases proliferation and promotes apoptosis in PAH-PASMC



B *Pim1* inhibition depolarizes $\Delta\Psi_m$ in PAH-PASMC



C *Pim1* inhibition decreases pro-apoptotic Bad phosphorylation in PAH-PASMC



Previous studies revealed that Pim1 inhibits the pro-apoptotic protein Bad (increase P-Bad), blocking its translocation to the mitochondria causing $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization⁴⁰⁷. In PAH-PASMCs, Pim1 inhibition decreases P-Bad/total Bad ratio (Figure 2-2C), promoting Bad (green) mitochondrial (stained with mitotracker red) translocation (greater co-localization in yellow). Control-PASMC infected with Ad-GFP-Pim1-WT showed the opposite effects (Figure 2-2C). These findings confirmed the implication of Pim1 in the resistance to mitochondrial dependent apoptosis seen in PAH-PASMCs.

2.3.5. STAT3 regulates Pim1 and NFATc2 expressions, while Pim1 regulates NFATc2 activation in PAH-PASMC.

We previously demonstrated that the sustainability of the pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype seen in PAH-PASMCs is attributed in part to the activation of the transcription factors NFATc2. In PAH, NFATc2 activation leads to the downregulation of important K⁺ channels like Kv1.5 leading to PASMC depolarization, increasing [Ca²⁺]_i and promoting PASMC proliferation²⁴⁰⁻²⁴². NFATc2 activation also triggers the upregulation of Bcl-2 leading to mitochondrial hyperpolarization and apoptosis inhibition²⁴⁰⁻²⁴². Pim1 is a NFAT activator, thus the Pim1-dependent NFAT activation could be implicated in PAH. NFATc2 expression (qRT-PCR) and activation (Luciferase assay) are increased in PAH-PASMC compared to control PASMCs (Figure 2-3A). PAH-PASMC treated with siSTAT3 showed a significant decrease in both NFATc2 mRNA and activation levels (Figure 2-3A), while PAH-PASMC treated with siPim1 revealed only a decrease in NFATc2 activation level (similar to the one induced by siSTAT3) but not in NFATc2 mRNA level (Figure 2-3A). This last finding was further confirmed using NFATc2 nuclear translocation assay. As shown Pim1 inhibition significantly decrease the amount of NFATc2 (green) colocalizing with DAPI (blue), reducing yellow staining (Supplemental Figure 2-5). Taking together, these findings suggest that STAT3 activation accounts for NFATc2 expression, while Pim1 is required only for the activation of NFAT in PAH-PASMC. These results were further confirmed using the Pim1 inhibitor quercetagine⁴⁰⁸ and Pim1 dominant negative adenovirus (Figure 2-3A). Quercetagine mimic Pim1 siRNA (decrease NFAT activation) in PAH-PASMC while overexpression of Pim1 by Ad-GFP-Pim1-WT in control PASMC enhanced NFAT activation (Figure 2-3A).

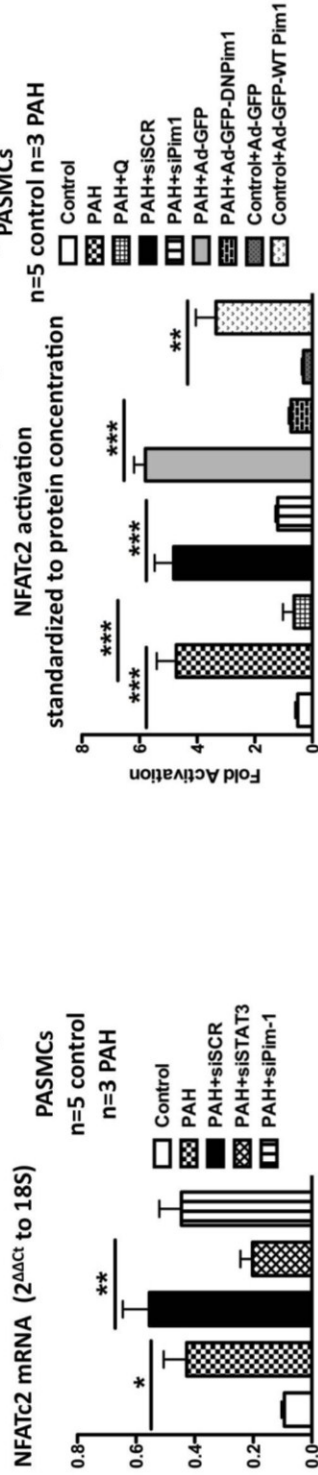
Finally, we provided further evidences that the STAT3/Pim1-dependent NFAT activation in PAH-PASMCs contributes to the pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype by increasing $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 2-3B), a well accepted pro-proliferative factor, and the apoptotic factor Bcl-2 compared to normal PASMCs (Figure 2-3C). Note that Pim1 inhibition has no effects on $[Ca^{2+}]_i$ in control PASMC (data not shown).

Figure 2- 3: The STAT3/Pim1 axis accounts for NFATc2 expression and activation in PAH-PASMCs.

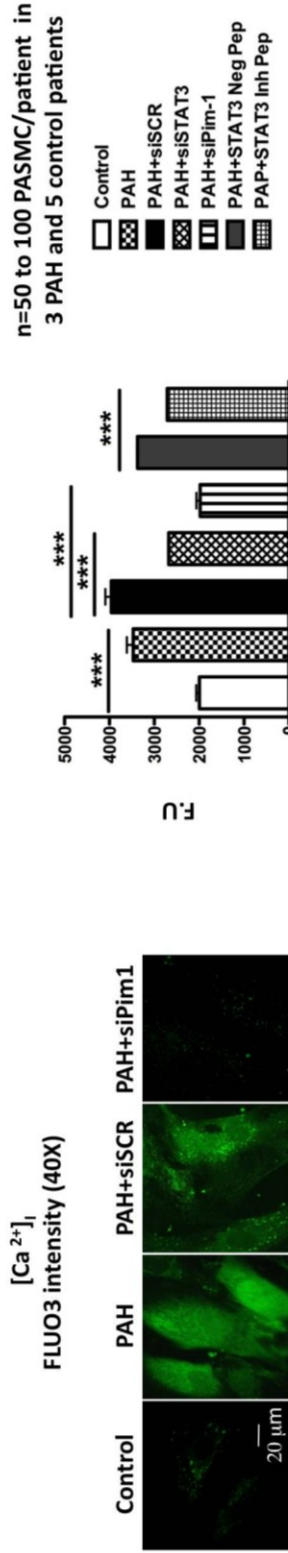
(A) NFATc2 expression is increased in PAH-PASMCs compare to control-PASMC. STAT3 inhibition decreases NFATc2 expression, while Pim1 inhibition has no effects. NFATc2 activation (luciferase assay) is increased in PAH-PASMCs compared to control-PASMCs. Pim1 inhibition decreases NFAT activation, while Pim1 overexpression in control PASMC promotes it.

(B) Pim1 inhibition in PAH-PASMC decreases $[Ca^{2+}]_i$ (FLUO3) and Bcl-2 expression (immunofluorescence).

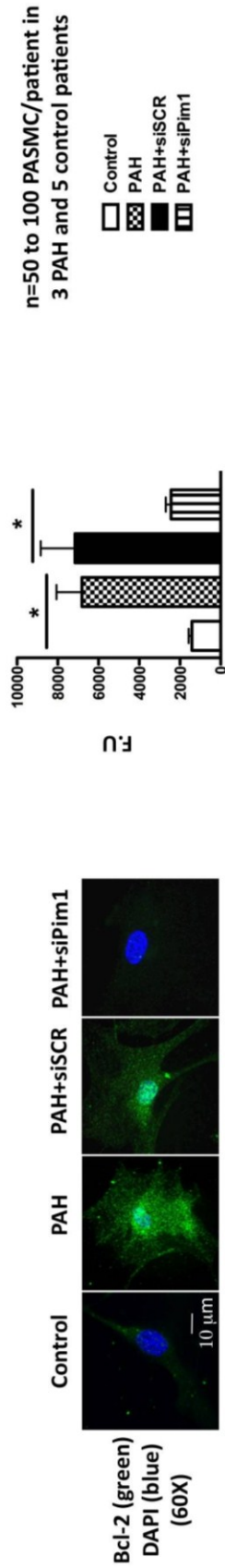
A *STAT3/Pim1 axis increases NFATc2 expression and activation in PAH-PASMC (n=3 patients)*



B *Pim1 inhibition decreases $[Ca^{2+}]_i$ in PAH-PASMCs (n=3 patients)*



C *Pim1 inhibition decreases Bcl-2 expression in PAH-PASMCs*

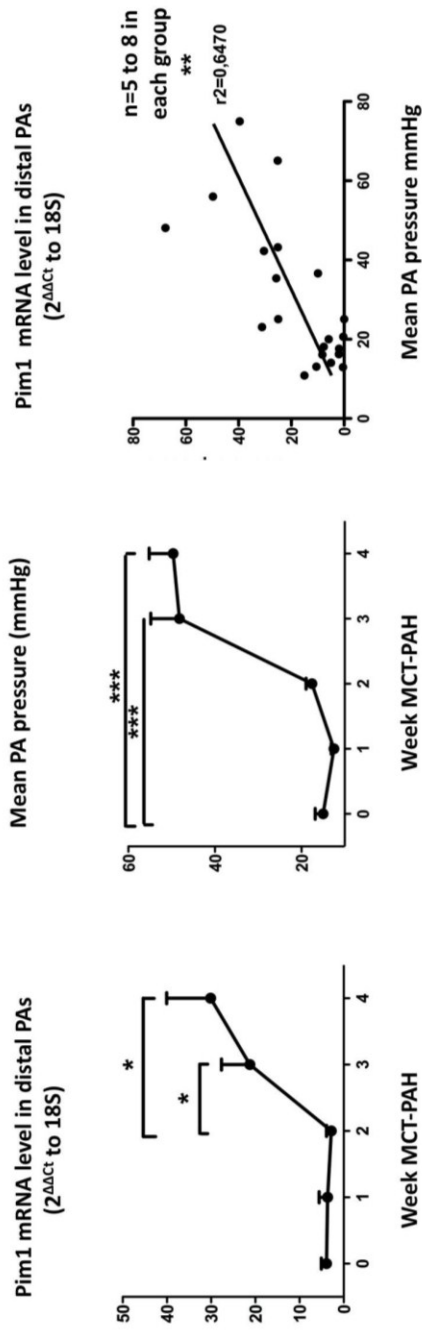


2.3.6. STAT3/ Pim1/NFATc2 axis is increased in rat experimental PAH.

Pim1 expression (qRT-PCR, immunoblots and immunofluorescence) was quantified in both lungs and PAs isolated from monocrotaline (MCT) injected rats, an accepted model of PAH²⁴². Greater Pim1 expression was seen in PAs of rats with severe PAH (more than 21 days after MCT injection). In contrast, light expression was seen in partially remodeled PAs, and no expression was seen in non-remodeled PAs from rats with mild early PAH (1 to 12 days after MCT) (Figure 2-4A and Supplemental Figure 2-6A&C). As in humans, Pim1 expression is confined within the PSMCs (greater colocalization between Pim1 in green and SM-Actin in red Supplemental Figure 2-6A, than Pim1 with the endothelial cell marker VE-cadherin (Supplemental Figure 2-6B)) and correlates with PAH severity (Fig4A). Moreover, Pim1 mRNA levels were measured in rats buffy coat isolated from control rats (mean PA pressure <15mmHg), rats with mild PAH (mean PA pressure less 30mmHg and rats with sever PAH (mean PA pressure greater than 30mmHg). As in distal PAs, Pim1 mRNA levels in buffy coats correlates with PAH severity (Supplemental Figure 2-7A). These results further support a role for Pim1 in PAH and suggest that Pim1 may be a good biomarker for the disease.

Finally, because Pim1 is poorly expressed in other tissues like aorta, kidney and liver (Supplemental Figure 2-7B) make him an attractive therapeutic target for PAH. To further study the implication of the STAT3/Pim1/NFAT axis activation in the progression of PAH, rats were sacrificed at different time points after the s.c. injection of MCT. PA pressure and PAs wall thickness (H&E staining) were measured. STAT3 activation (P-STAT3 nuclear translocation in Figure 2-4B and P-STAT3/STAT3 ratio by immunoblots in Supplemental Figure 2-6C) increases between week 1 and 2 post MCT-injection preceding both Pim1 expression and NFAT activation (qRT-PCR and NFATc2 nuclear translocation in Fig4.A&B and immunoblots in (Supplemental Figure 2-6C), which increased between week 2 and 3 post MCT injection paralleling the increase in both PAs wall remodeling and PA pressure (Figure 2-4A&B). Although these findings don't demonstrate a direct causal links between STAT3 activation and Pim1/NFAT, it confirms the implication of the STAT3/Pim1/NFATc2 in PAH development. These results confirmed the implication of a STAT3-dependent activation of Pim1 in the etiology of PAH.

A *Pim1* expression increases with PAH development in rats injected with monocrotaline.



B *STAT3/Pim1* axis activation triggers NFATc2 expression and activation in rats injected with monocrotaline.

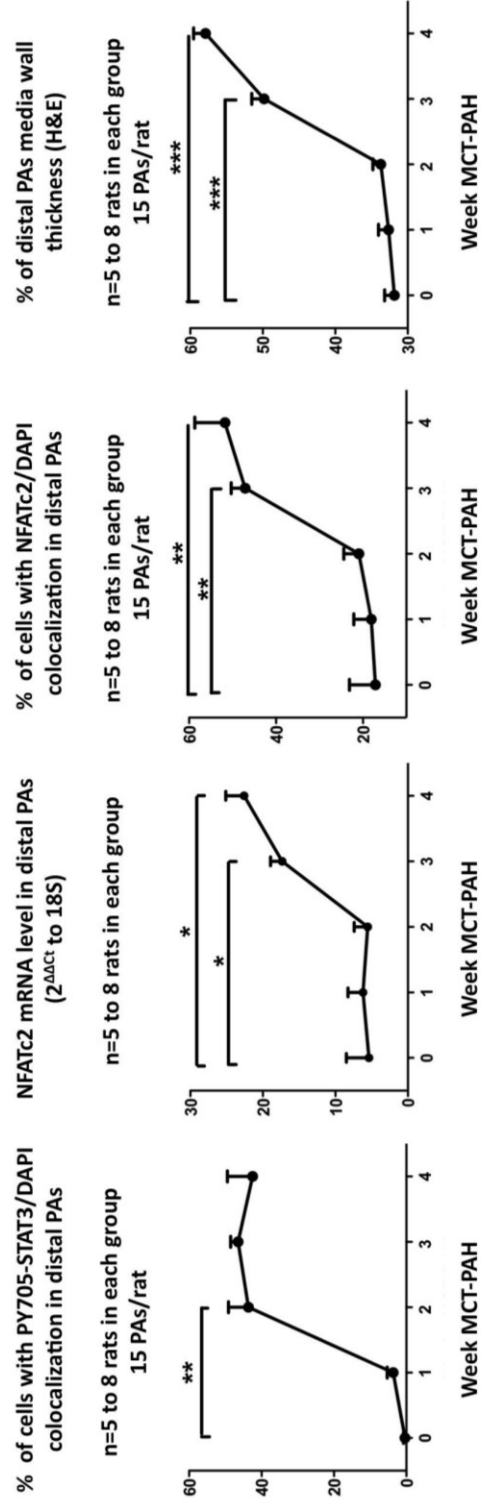


Figure 2- 4: Pim1 expression is increased in the monocrotaline-injected rat PAH model.

(A) Heavy Pim1 mRNA expression is seen in PAs of rats with severe PAH (more than 21 days after MCT injection). In contrast, light expression was seen in mild PAH, and no expression was seen in rats with early PAH. Moreover, Pim1 expression correlates with PAH severity assessed by mean PA pressure.

(B) STAT3 activation (nuclear translocation of PY705-STAT3) precedes both Pim1 expression (qRT-PCR) and NFATc2 expression (qRT-PCR) and activation (nuclear translocation) which paralleled both increased PA wall remodeling (H&E staining) and PA pressure.

2.3.7. Pim1 inhibition reverses MCT-PAH.

Pim1 siRNA (1nmol) was selectively delivered to the lung of MCT-PAH rats 18 days after MCT injection (when endogenous expression of Pim1 peaks), by intra-tracheal nebulization. To verify the tissue distribution of our treatment we: 1) nebulized an adenovirus carrying GFP (Supplemental Figure 2-8A) 2) and measured the effect of Pim1 inhibition in several tissues (Supplemental Figure 2-8B). Both techniques revealed that Pim1 inhibition by nebulized siRNA is localized to the PAs therefore having limited detrimental effect. After confirming that Pim1 siRNA treated MCT-PAH rats had decreased Pim1 expression in both PAs and lungs (qRT-PCR) (Supplemental Figure 2-8B), using non-invasive measurements (Doppler and Echocardiography)²⁴², we showed, Pim1 inhibition increases PA acceleration time (PAAT) and decreases RV wall thickness in comparison with the scrambled treated MCT-PAH rats (Supplemental Figure 2-8C). These findings were confirmed invasively by PA pressure, PA wall remodeling, RV hypertrophy (RV/LVS), and general cardiac functions (exercise capacity on treadmill) measurements (Figure 2-5A).

This finding was associated with significant decrease in Pim1-dependent NFATc2 activation (decrease Pim1/NFATc2 (yellow) and NFATc2/DAPI (purple) co-localization), decreasing PSMCs proliferation (% PCNA) and resistance to apoptosis (% TUNEL) (Figure 2-5B).

2.3.8. *Pim1* knockout mice is resistant to PAH.

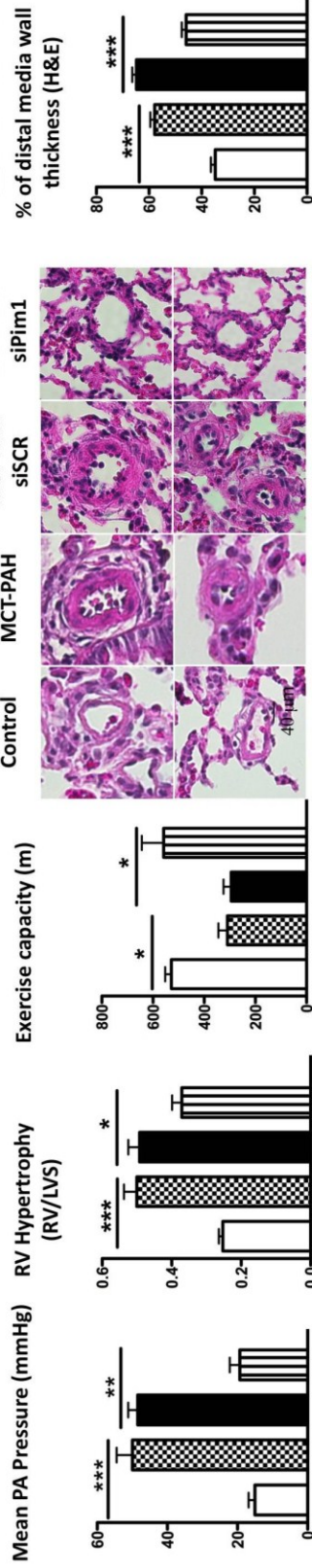
PAH was induced in mice by i.v injection ($5\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$) of pyrrole-modified monocrotaline (MCTP) and by exposure to chronic hypoxia (CH) for 15 days (10% O₂) as previously described²²⁶. As in rats, development of PAH was assessed both non-invasively and invasively. Compare to Pim1 K.O mice, wild type mice injected with MCTP or exposed to CH developed PAH (decreased PAAT, increased RV hypertrophy, PA wall thickness, PA pressure and mortality) without affecting systemic pressure and cardiac output (Figure 2-6A and Supplemental Figure 2-9A&B).

Figure 2- 5: Pim1 inhibition reverses MCT-PAH.

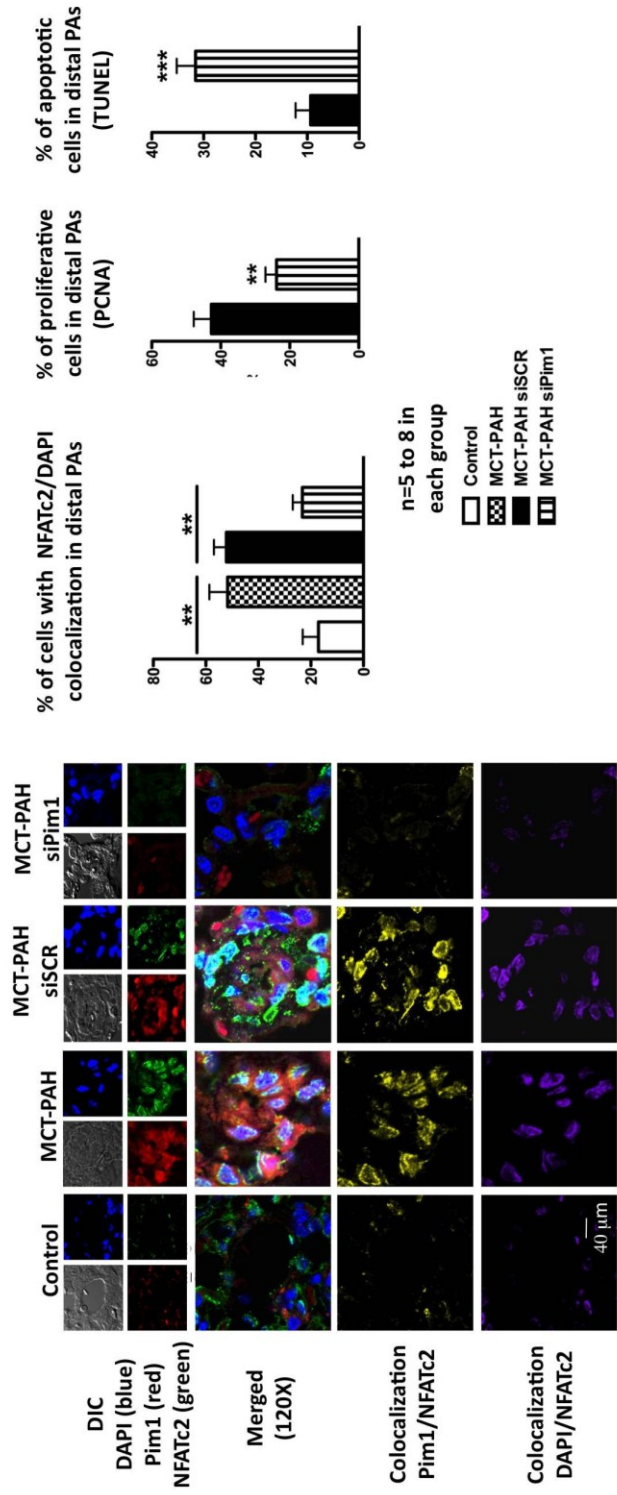
(A) Pim1 inhibition (1 nebulization of 1nmol) 18 days after MCT injection decreased mean PA pressure, RV hypertrophy, improved exercise capacity and diminished distal PA wall thickness.

(B) As in vitro, these effects were mediated by the inhibition of Pim1-dependent NFATc2 activation showed by a decrease in Pim1/NFATc2 (yellow) and in NFATc2/DAPI (purple) colocalization, decreasing PSMC proliferation (%PCNA) and increasing apoptosis (%TUNEL).

A *Pim1* inhibition reverses MCT-PAH



B *Pim1* inhibition decreases NFATc2 activation, proliferation and promotes apoptosis in distal PAs of MCT-PAH



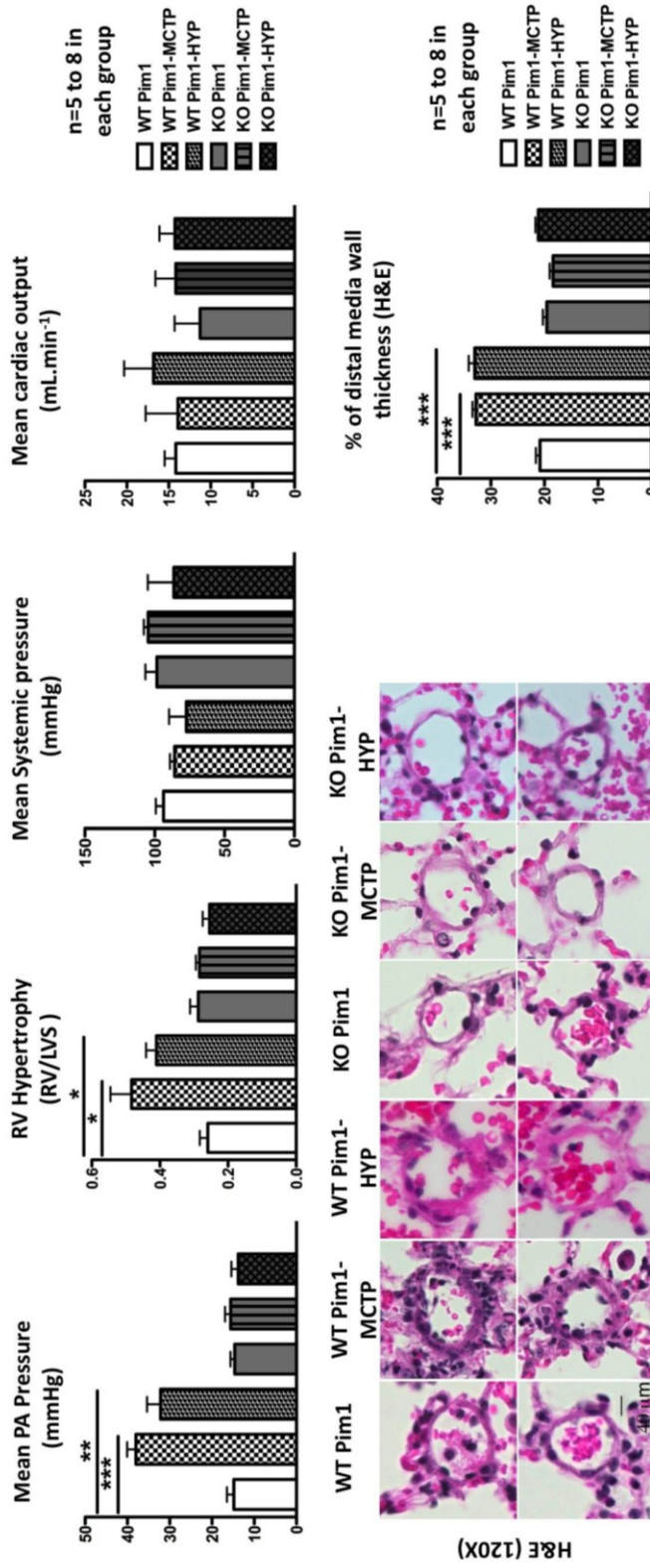
As in rats, the development of PAH in MCTP-WT and CH-WT mice is associated with the STAT3/Pim1 dependent activation of NFATc2. Interestingly, both STAT3 activation and NFATc2 mRNA levels were also increased in MCTP and CH Pim1-KO mice. Nonetheless in the absence of Pim1, they were not sufficient to trigger PAH. This result suggests that the implication of STAT3 in PAH-development is mainly Pim1 dependent and that STAT3 activation alone cannot induce PAH. Therefore, Pim1 represent the primary therapeutic target of the STAT3/Pim1 axis.

Figure 2- 6: Pim1 knock out mice are resistant to MCTP and CH-PAH.

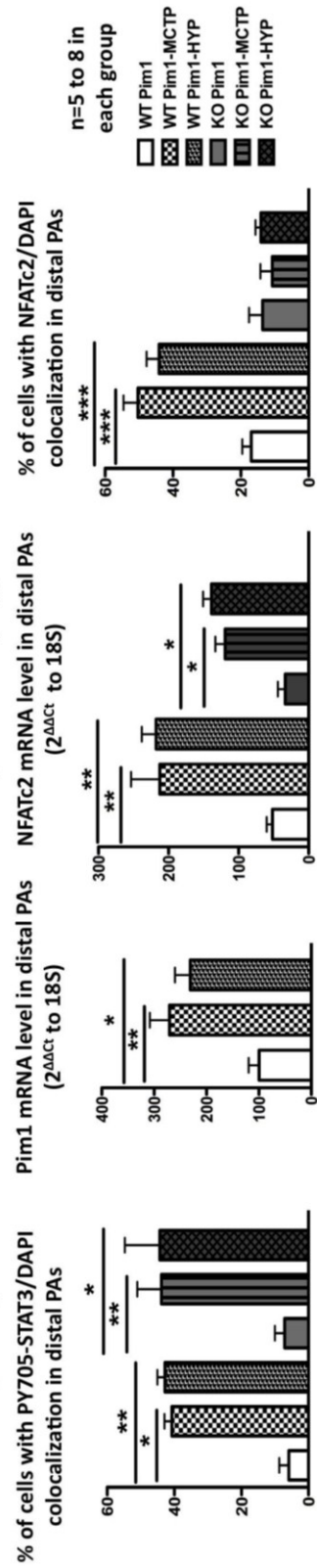
(A) Compare to Pim1 K.O mice (n=5), MCTP and CH-WT mice (n=8) developed PAH (increased PA pressure, RV hypertrophy, PA wall thickness) without detrimental effects on both systemic pressure and cardiac output.

(B) PAH development in MCTP-WT and CH-WT mice is due to the STAT3/Pim1 dependent activation of NFATc2. Both STAT3 activation (nuclear translocation assay) and NFATc2 mRNA levels (qRT-PCR) are increased in both WT and KO MCTP and CH mice but, in the absence of Pim1, were not sufficient to trigger PAH.

A *Pim1* KO mice are resistant to MCTP and Chronic Hypoxia-induced pulmonary hypertension



B *STAT3/Pim1/NFATc2* axis is activated in mice with pulmonary hypertension



2.4. Discussion:

Here we show that STAT3/Pim1/NFAT axis is etiologically associated with the development of PAH, and believe have opened a new avenue of investigation for PAH treatment. Pim1 expression is increased in human and experimental PAH and relies on STAT3 activation (Figure 2-3). Interestingly Pim1 expression parallels NFAT activation, PA remodeling and pressure and correlates with PAH severity (Figure 2-1&4).

In opposite to STAT3 and NFAT, which are constitutively expressed in several tissues including normal PAs, Pim1 affects PASMCs phenotype only in PAH, thus constitutes an interesting therapeutic target for PAH. Notably, inhibition of endogenous Pim1 significantly improves PA pressure, PA medial hypertrophy, and right ventricle hypertrophy without affecting systemic pressure and cardiac output (Figure 2-5&6). We provide direct *in vitro* and *in vivo* evidence that the mechanisms by which Pim1 inhibition reverses PAH, involve 1) the inhibition of PASMC proliferation within the remodeled PAs (Figure 2-5), and 2) the depolarization of PASMC mitochondria by promoting Bad activation (Figure 2-2) and decreasing Bcl-2, both of which will increase apoptosis. We believe these effects are sustained by the Pim1-dependent activation of NFAT, a transcription factor which regulates both PASMC proliferation and resistance to apoptosis²⁴². Because, our goal was to identify a new way of reversing establish PAH, we focused our research on PASMC and not of endothelial cells, which are affected at the onset of PAH and are downregulated in establish PAH. Nonetheless, because previous studies reported that Pim1 is implicated in embryonic stem cells differentiation into endothelial cells³⁹⁸ Pim1 might be also implicated in endothelial-related vascular lesions like plexiform lesions, which are seen in patients with PAH⁴⁰⁹.

Our study suggests that circulating vasoactive factor like Angiotensin, ET-1; PDGF or cytokines, which are elevated in both human and experimental PAH activates STAT3. Once activated, STAT3 increases NFATc2 and Pim1 expression (Figure 2-7). Cross talk between STAT3 and NFAT is currently a hot topic as both signaling pathways are involved in the pathogenesis of cancer and cardiovascular diseases^{410, 411}. In the present study, we demonstrate for the first time in the pulmonary vasculature, that STAT3 regulates NFATc2 expression and indirectly (via Pim1) NFATc2 activity. Indeed, we showed that STAT3

inhibition decreases NFATc2 expression in human PAH, while in experimental PAH, STAT3 activation precede NFAT expression. Moreover, we showed that both STAT3 and Pim1 inhibition similarly inhibit NFAT activation and that in experimental PAH, Pim1 expression parallels NFAT expression and activation. Although further experiments are required to determine whether STAT3 directly regulates Pim1 and NFAT, these findings nonetheless demonstrate the implication of the STAT3/Pim1 axis in the regulation of both NFAT expression and activation in PAH. This findings might not be limited to pulmonary vasculature as ChIP-seq studies in several cell lines demonstrated the presence of several STATs response element within the NFATc1, c2 and c3 promoters region³⁸⁹.

Although, STAT3 is an accepted Pim1 activator⁴¹², the Akt pathway has been demonstrating as the main Pim1 activator in cardiomyocytes⁴⁰⁴. Nonetheless, in our study the Akt pathway was not activated in PAH-PASMC (Supplemental Figure 2-3A), suggesting that in our model Pim1 activation is Akt independent and relies on STAT3. Once activated, Pim1 is able to interact with NFAT triggering its activation independently of the calcium/calcineurin axis and without affecting its nuclear localization^{364, 365}. Once activated NFAT regulates multiple genes that might positively reinforce its activation. For example, the down-regulation of Kv1.5 will lead to PASMC depolarization, opening of L-type Ca⁺⁺ channels and sustain the increase in [Ca⁺⁺]_i, and thus calcineurin-dependent NFAT activation. Therefore, once activated the system will remain functional explaining why only PAH-PASMC have activated NFAT and why this activation is sustained in culture condition.

We demonstrated that STAT3 activation in PAH accounts for a Pim1-dependent activation of NFAT sustaining PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis (Figure 2-7). Interestingly, since Pim1 activation remains high despite NFAT being activated suggests that its role in PAH might not be limited to NFAT activation. In fact, we demonstrated that by inhibiting Bad it decreases mitochondrial dependent apoptosis. In addition, by phosphorylating Cdc25 and its associated kinase C-TAK1 and by downregulating p27kip1, Pim1 enhances cell cycle progression at the G2/M phase⁴¹³⁻⁴¹⁵. Thus Pim1 is implicated in several mechanisms promoting cell proliferation and survival that might be implicated in PAH-pathogenesis.

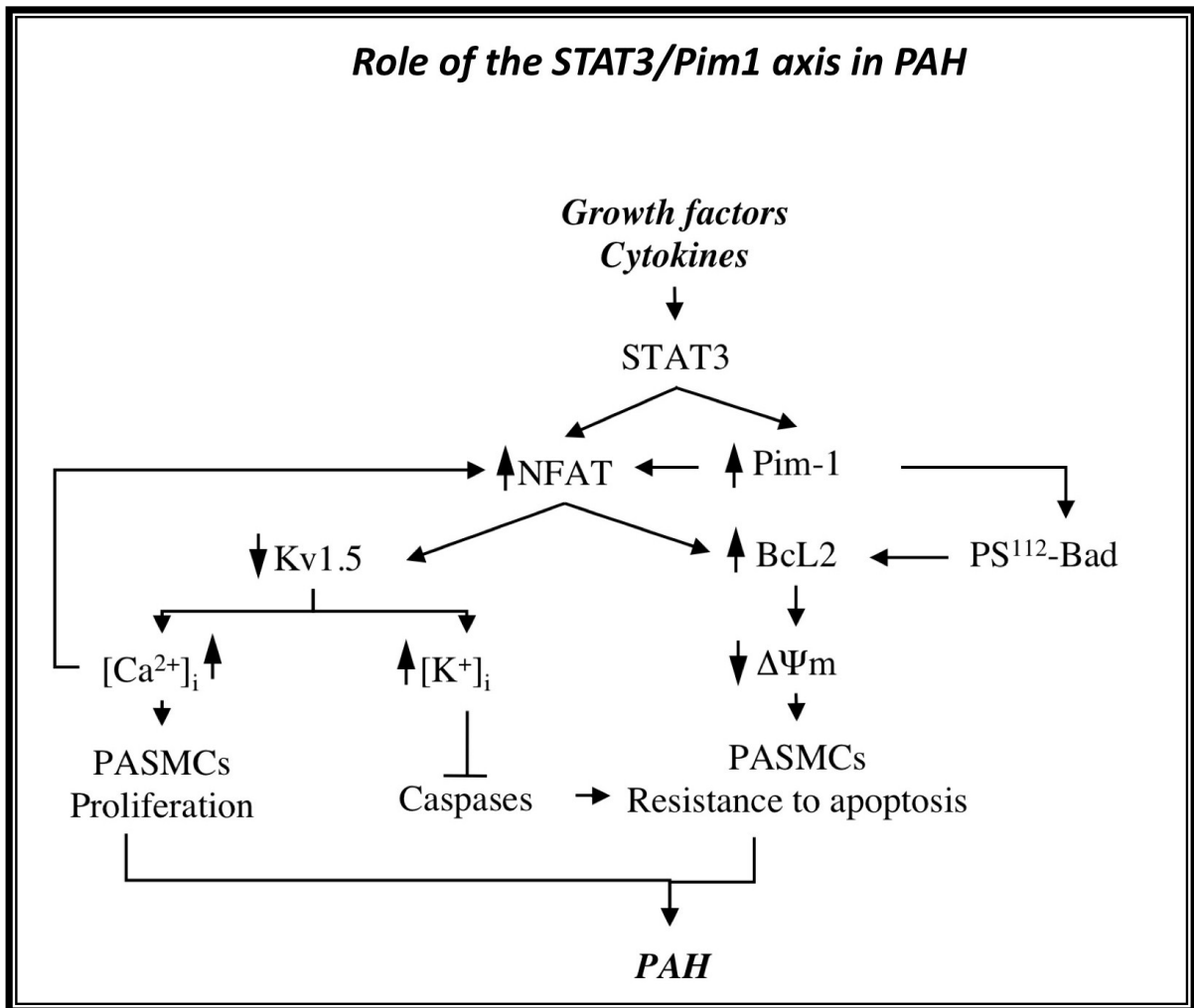


Figure 2- 7: Proposed mechanism on the role of the STAT3/Pim1 axis in PAH.

Schematic representation STAT3/Pim1 implication in PAH pathogenesis. Increased circulating growth factors, agonists and cytokines trigger STAT3 activation resulting in: 1) increased NFATc2 expression; 2) increased Pim1 activation. Once activated, Pim1 trigger NFATc2 activation (nuclear translocation), promoting $[Ca^{2+}]_i$ dependent PASM cell proliferation and inhibiting mitochondrial dependent apoptosis through a Bcl2 dependent mechanism. The NFATc2 dependent effect on Bcl2 will be reinforced by Pim1 dependent inhibition of Bad.

Among the 3 components of the STAT3/Pim1/NFAT axis, we believe that Pim1 inhibition might represent a unique, specific and novel way of reversing PAH without affecting physiological processes in which both STAT3 and NFAT are involved like the immune response. This is reinforced by our findings in Pim1 KO mice that showed that the implication of STAT3 in the etiology of PAH mainly relies on Pim1 activation, as STAT3

activation in Pim1 KO mice is not sufficient to induce PAH (Figure 2-6). Although this interesting findings will require to be confirmed in several other models including human PASMC, which will be the purpose of a further study.

Finally, the fact that the pulmonary circulation is selectively diseased in human PAH is a major therapeutic challenge. The majority of drugs targeting the vasculature will, if given systemically, affect the healthy normal circulation as well, thereby limiting efficacy. Discovery of factors selectively expressed in the PAs, in addition to methods of delivering treatment selectively to the pulmonary circulation (such as inhaled delivery of drugs or genes), is critical. The airway administration of a Pim1 siRNA satisfies both requirements to ensure selective targeting of the diseased circulation. The concept, that inducing apoptosis to remove the excess of cells obstructing the PAs is beneficial in PAH is supported by other studies showing that serine-elastase inhibitors⁴¹⁶ and Rho-kinase inhibitors⁴¹⁷ cause regression of established PAH by inducing PASMC apoptosis. The novelty of our findings is that our therapeutic intervention is localized within the remodeled PAs and affects only the proliferative PASMC expressing Pim1; quiescent PASMCs and surrounding cells are not affected. Because Pim1 is poorly expressed in healthy blood vessels and as limited and non-lethal implication in physiological processes (Pim1 KO mice are healthy and fertile, only erythrocytes microcytosis was reported⁴¹⁸), it represents an ideal therapeutic target. Therefore, (and as suggested by our findings), Pim1 inhibition will have limited toxicity, in opposite to STAT3 and NFAT inhibitors for example. Finally, in addition of being an interesting therapeutic targets, we also demonstrated that Pim1 could indeed be an interesting and specific PAH biomarker in humans. Elevated Pim1 expression in the buffy coat seems to be specific to PAH, as Pim1 is not elevated in other inflammatory diseases alone like scleroderma (which is a common cause of PAH). Because of their close relationship with Pim1 both STAT3 and NFAT could be considered as putative biomarker as well. Nonetheless, due to their expression in several other tissues and under multiple conditions, their activations are not specific to PAH⁴¹⁹.

2.5. Conclusion

Pulmonary arterial hypertension is a rapidly lethal disease for which treatments are limited. We believe that our findings will open the door to new avenues of investigation and potentially future therapies for PAH. It will also lead to a better understanding of the regulation of apoptosis and proliferation by STAT3 and Pim1, which will benefit many other human diseases like cancer. Therefore, we described Pim1 as a novel and specific therapeutic target and potential biomarker for PAH.

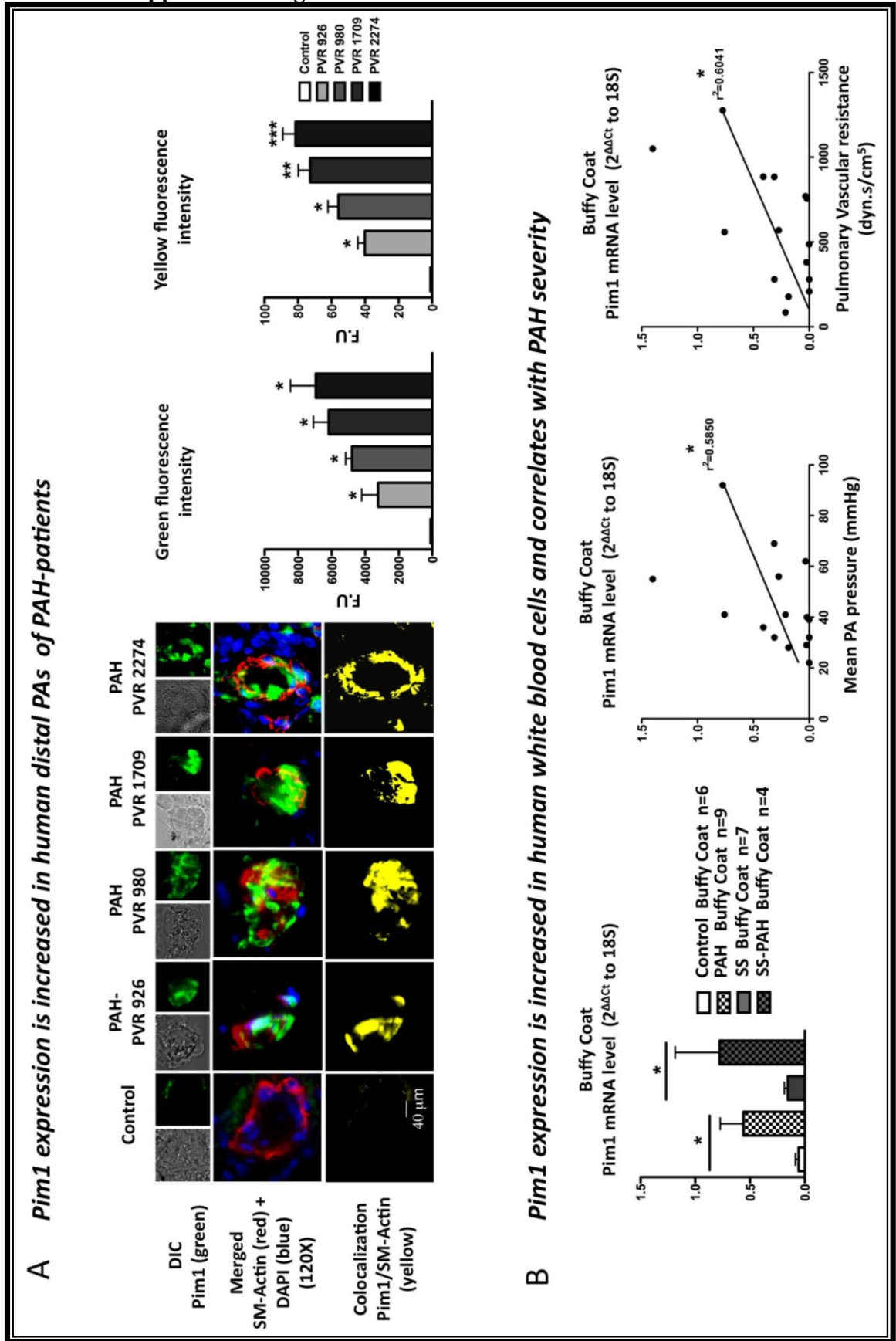
2.6. Acknowledgments:

Pim1 knockout mice were provided by A. Berns from The Netherlands Cancer Institute, Amsterdam. We appreciate the contribution of Jacques Huot, Josée Lavoie and Eric Paquet. The authors wish to thank Christine Racine and Sabrina Biardel from IUCPQ “Institut Universitaire de Cardiologie et Pneumologie de Québec”, Laval Hospital, for providing the patient’s lung tissue, serum and buffy coats.

2.7. Funding sources/Disclosure:

This work was supported by Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), Canadian Institute for Health Research (CIHR) and Canadian Research Chair (CRC) to SB. No conflicts to disclose.

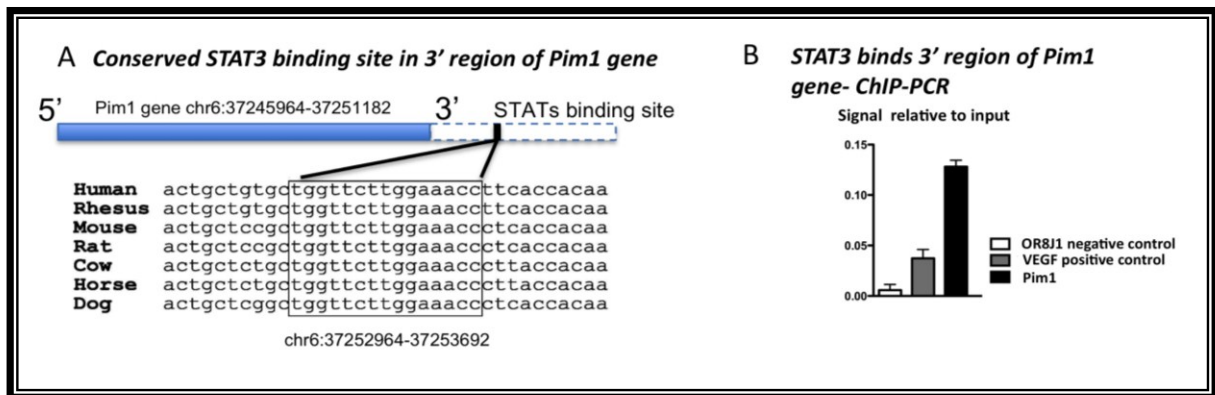
2.8. Supplemental Figures



Supplemental Figure 2- 1: Pim1 expression correlates with PAH severity in humans PAs and buffy coat.

(A) Pim1 protein expression was measured by immunofluorescence in human distal PAs of patients with various degrees of PAH (measured by PVR). As shown the greater is the PVR the greater is Pim1 expression (green $p < 0.05$). Finally in PAs Pim1 co-localized with SM-actin (red) giving a yellow staining, confirming that Pim1 expression in PAs is mainly localized within PSMCs. As predicted by the amount of Pim1 (green), the amount of yellow was also proportional to PAH severity ($p < 0.05$ compared to control group).

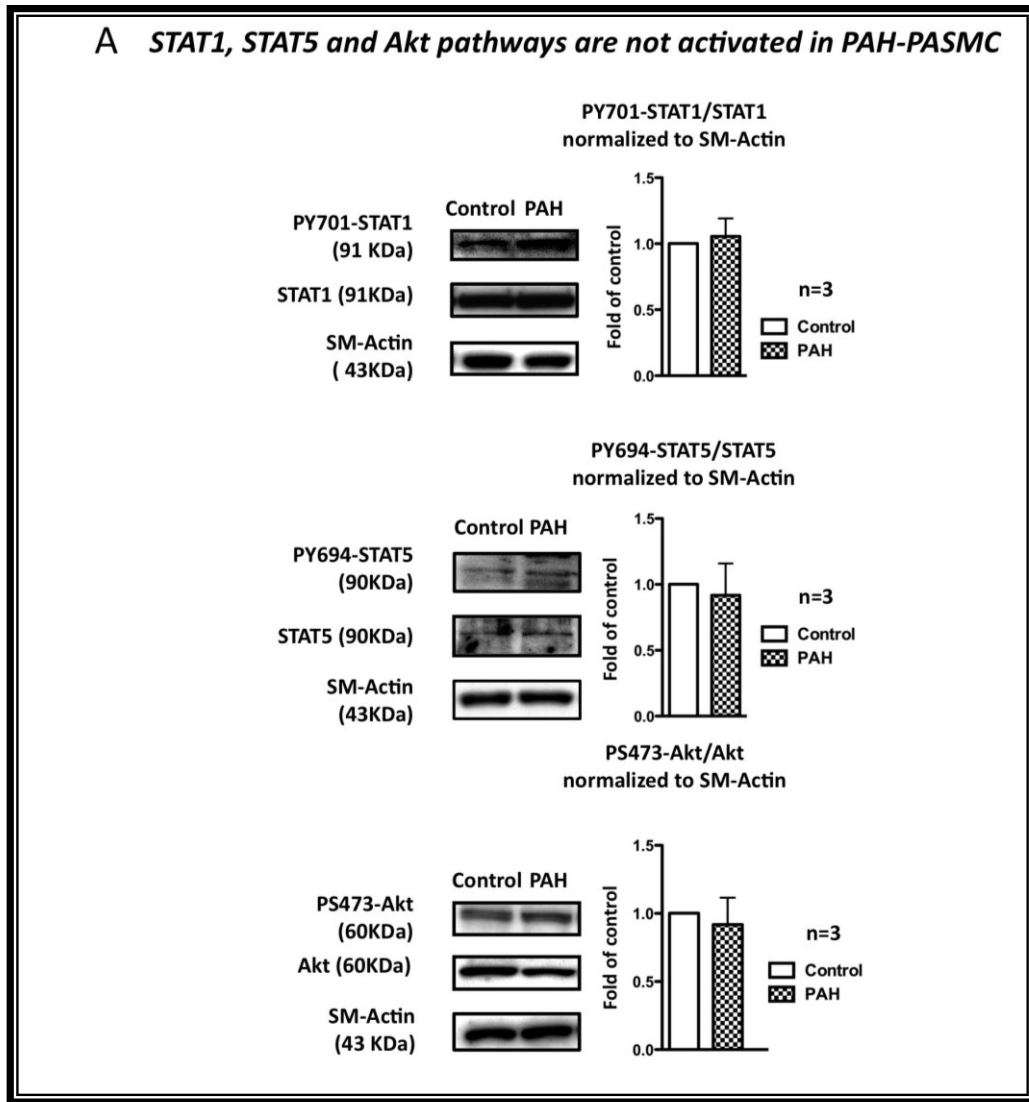
(B) Similarly to human PAs, Pim1 mRNA expression is increased in buffy coat of PAH patients and correlates with PAH severity (assessed by PVR and mean PA pressure). We demonstrated that the increase in Pim1 is specific to PAH as patients with scleroderma only showed significantly ($p < 0.05$) less Pim1 mRNA compared to both patients with PAH associated or not with scleroderma.



Supplemental Figure 2- 2: STAT3 binds to the 3' region of Pim1 gene.

(A) In silico analysis using ENCODE Chip-Seq database confirmed the presence of highly conserved (among several species) STAT binding site in the 3' of Pim1 gene.

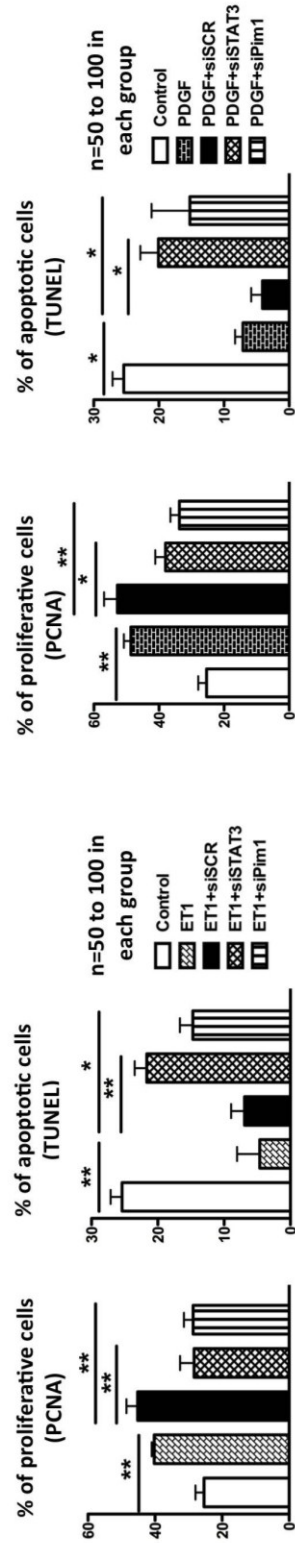
(B) STAT3 binding in 3' of Pim1 gene was confirmed in ET-1 stimulated PSMCs by ChIP-PCR (n=3 ChIP/patient in 3 patients). Compared to both VEGF (positive control) and OR8J1 (negative control) STAT3 binding was increased in 3' region of Pim1 gene.



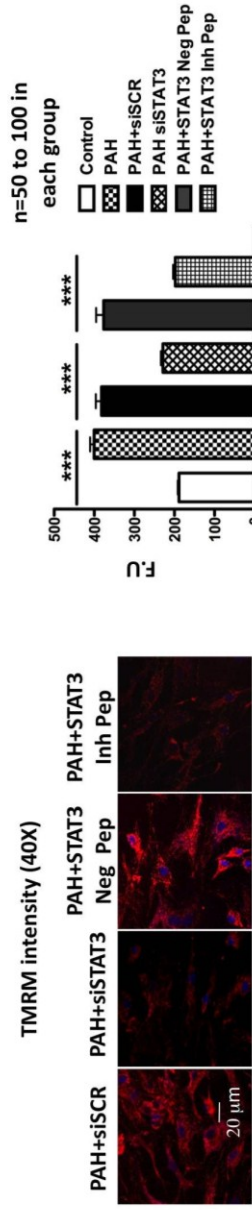
Supplemental Figure 2- 3: Role of the STAT and Akt pathways in human PAH.

(A) STAT1 and STAT5, the 2 other STAT isoforms implicated in cardiovascular diseases are not activated in human PAH-PASMC. Immunoblots showed that compare to control-PASMC PY701-STAT1/STAT1 and PY694-STAT5/STAT5 ratios were not significantly changed in PAH-PASMC (n=3 western blot/patients in 3 PAH and 3 control patients). In addition to the STAT pathway, Akt has been implicated in Pim1 activation. Nonetheless, Akt pathway is not activated in PAH-PASMC (no significant increase in PS473-Akt/Akt ratio).

A Pim1 inhibition reverses PDGF and endothelin-induced proliferation and resistance to apoptosis



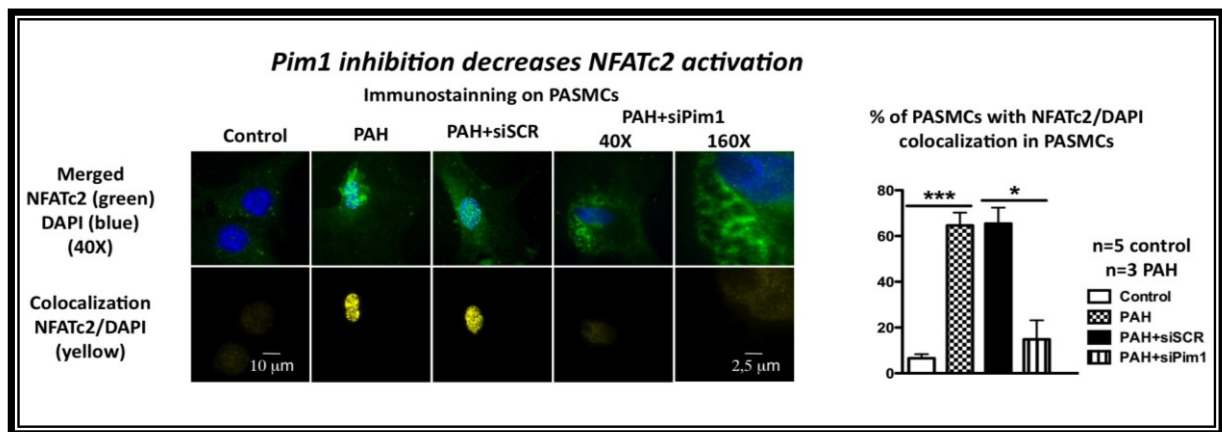
B Similarly to Pim1 inhibition, STAT3 inhibition restores mitochondrial functions by depolarizing $\Delta\Psi_m$ in PAH-PASMC



Supplemental Figure 2- 4: Role of STAT3/Pim1 in PASC proliferation and apoptosis.

(A) Pim1 inhibition reverses ET-1 and PDGF induced PASC proliferation and resistance to apoptosis. ET-1 and PDGF treatment for 48h in control PASC promotes ($p < 0.01$) PASC proliferation (%PCNA) and resistance ($p < 0.01$) to serum starvation induced apoptosis (%TUNEL) as seen in PAH-PASC. Similarly to STAT3 inhibition (siRNA) Pim1 inhibition reverses this phenotype ($n = 50$ to 100 cells/patient in 5 control patients; $p < 0.05$).

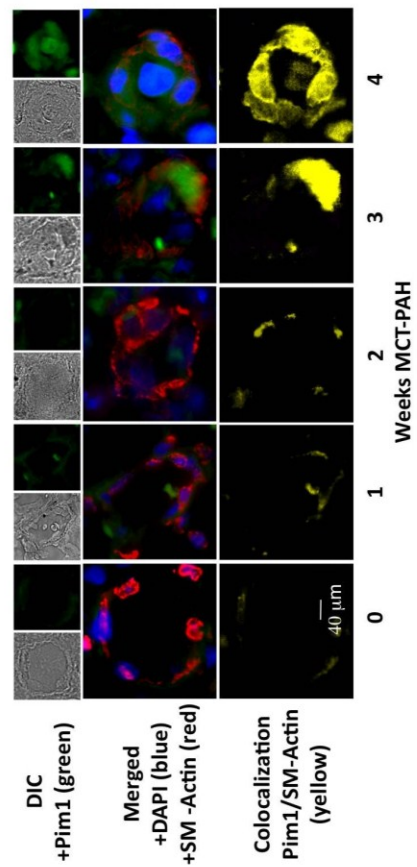
(B) STAT3 inhibition by either siRNAs or inhibitor peptide restores mitochondrial membrane potential measured by TMRM ($p < 0.05$; $n = 50$ to 100 cells/patient in 3 PAH patients) in PAH-PASCs.



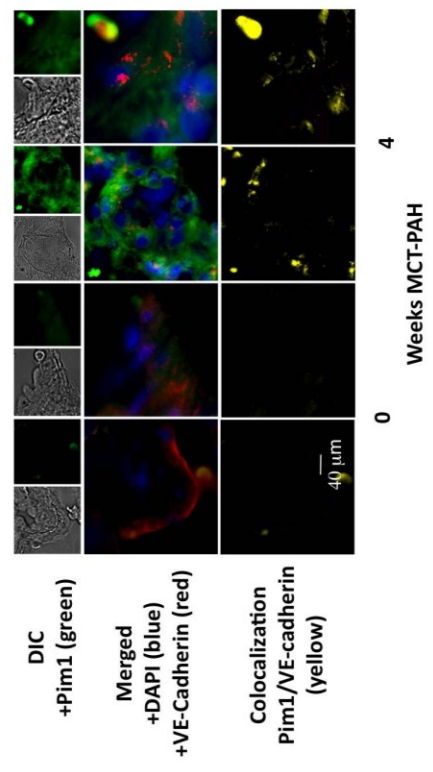
Supplemental Figure 2- 5: Pim1 inhibition decreases NFATc2 activation in PAH-PASCs.

(A) Pim1 inhibition using siRNAs decreases NFATc2 (green) nuclear translocation (DAPI blue) giving less yellow staining, in 10 to 20 cells /patient in 3 PAH and 5 control patients.

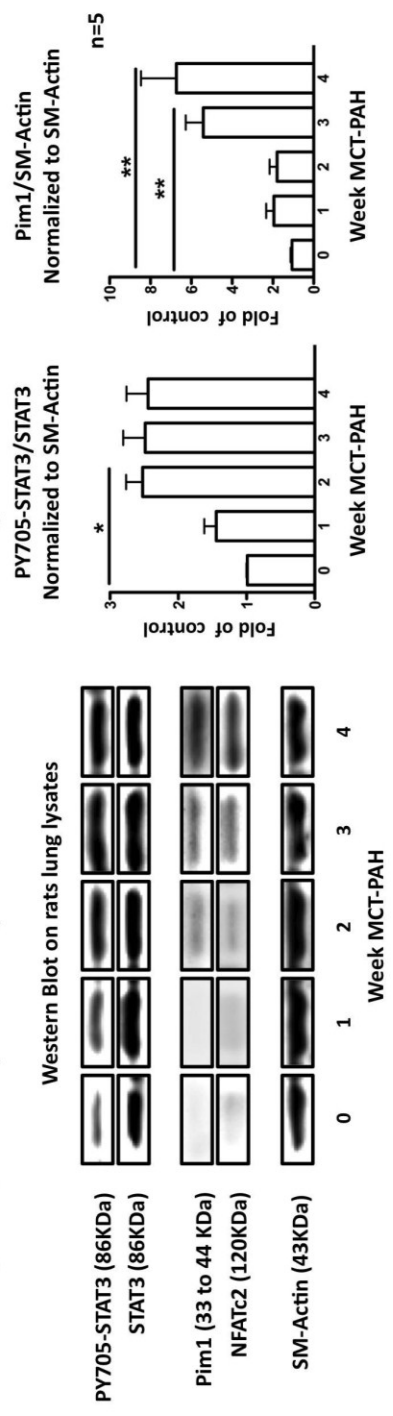
A *Pim1* expression increases with PAH development in MCT-PAH rat model.



B *Pim1* is not expressed in endothelial cells of PA from MCT-PAH rat model.



C *STAT3/Pim1/NFATc2* protein expression in MCT-PAH rats lungs



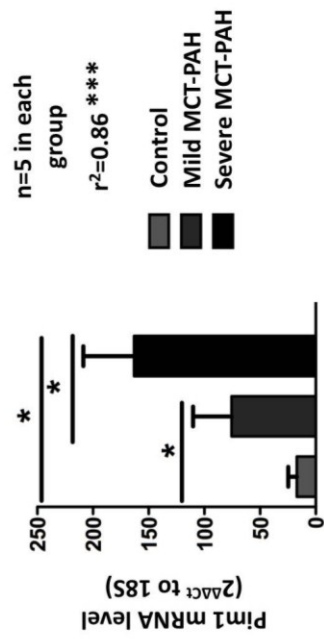
Supplemental Figure 2- 6: Pim1 expression is increase in MCT-induced PAH in rat and is confined to the PSMCs.

(A) Pim1 expression was measured by immunofluorescence in distal PAs in lungs biopsies of both control and MCT-injected rats. Pim1 expression (green) increases with the development of PAH (i.e there is an increase in Pim1 expression (more green fluorescence) two weeks post MCT injection). Moreover, colocalization experiments between SM-Actin (red) and Pim1 (green) showed that the increased in Pim1 expression is mostly confined to PSMCs giving a greater yellow staining 2 weeks and beyond MCT-injection.

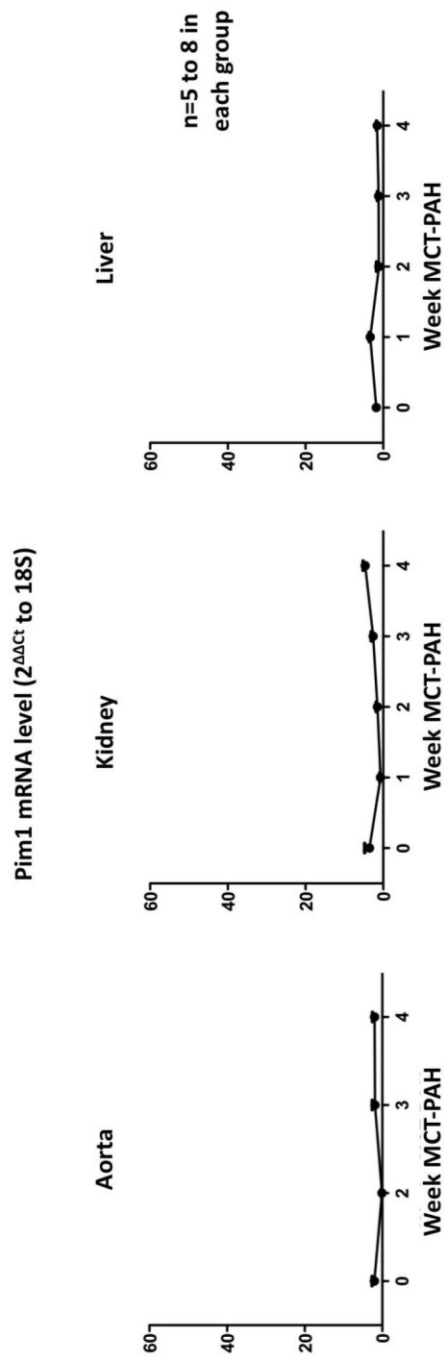
(B) Double staining technique with VE-cadherin a marker of endothelial cells, showed limited colocalization between Pim1 (green) and VE-cadherin (red), suggesting that Pim1 is primarily expressed in PSMCs and less in PA endothelial cells.

(C) As in human, the increase in Pim1 expression is precede by a significant activation of STAT3 ($p < 0.05$) (measured by the P-STAT3/STAT3 ratio using immunoblots) between 1 and 2 weeks post MCT injection. Similarly, NFATc2 protein expression follows the same expression pattern than Pim1.

A *Pim1* expression is increased in rats white blood cells and correlates with MCT-PAH severity



B *Pim1* mRNA tissue specific expression in MCT-PAH

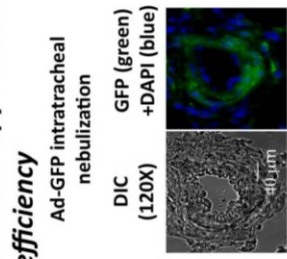


Supplemental Figure 2- 7: Pim1 expression in rat Buffy coat and tissues.

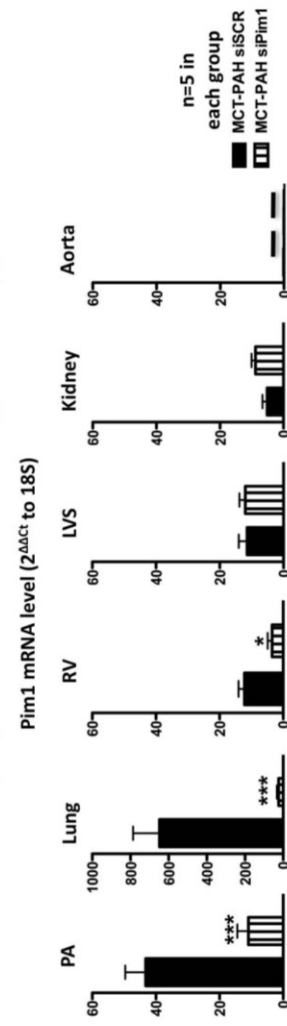
(A) Pim1 expression is increased in rats white blood cells and correlates with MCT-PAH severity. Pim1 mRNA levels were measured in buffy coat from control rats (mean PAP <15mmHg); and rats with MCT-induced mild-PAH (mean PAP <30mmHg) and sever PAH (mean PAP greater than 30mmHg). As shown, Pim1 mRNA levels are significantly increase in both mild and sever-PAH rats compare to control. In addition a significant correlation was found between Pim1 mRNA levels and PAH severity (n=5 to 8 rats per group).

(B) Pim1 expression in various tissues. Pim1 mRNA levels were measured in several tissues including aorta; kidney and liver by qRT-PCR. As shown, Pim1 is poorly expressed at mRNA level in the tested tissues, and is not affected by development of PAH.

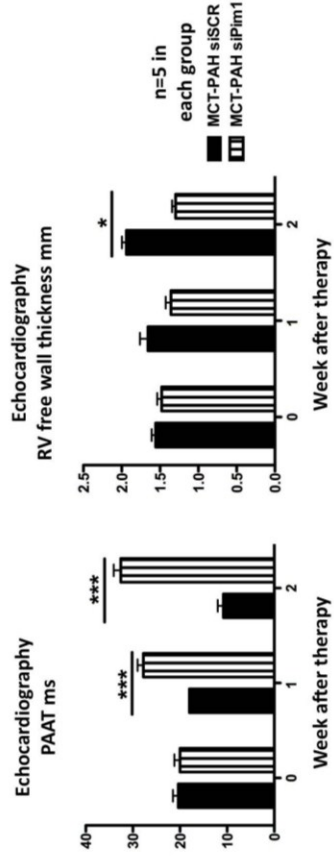
A Gene therapy method efficiency



B Pim1 tissue specific inhibition in MCT-PAH gene therapy



C Pim1 inhibition improves MCT-PAH



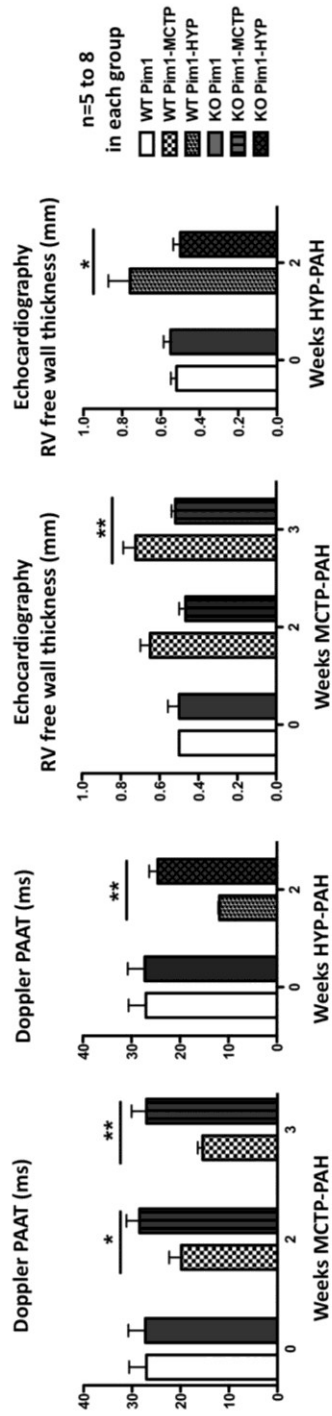
Supplemental Figure 2- 8: Pim1 inhibition affects only the pulmonary arteries reversing PAH.

(A) To verify the tissue distribution of our treatment we also nebulized an adenovirus carrying GFP. We observed the expression of GFP using immunofluorescence staining on lung sections. Diffuse GFP immunofluorescence in the PAs confirmed the tissue specificity of our nebulization technique. This experiment doesn't show that our method of silencing is effective but allows verifying the instrumentation and that nebulization occurred.

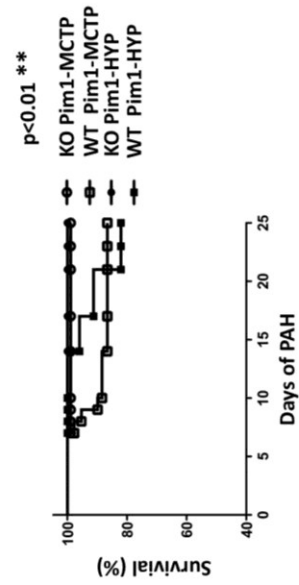
(B) In order to study the selectivity and safety of our gene silencing delivery method, we measured Pim1 expression in several tissues. We showed that siRNA treated rats had decreased Pim1 mRNA levels in lung, PAs and RV but not in other systemic vessels such as aorta, while rats treated with scrambled siRNA showed no modification in Pim1 levels. Note that Pim1 levels were very low in all other tested organs and their levels were similar in the siRNA and scrambled treated rats showing the tissue specificity of our therapeutic intervention.

(C) Longitudinal studies using echography and Doppler showed that Pim1 inhibition significantly increases PAAT ($p < 0,001$) and decreases RV hypertrophy ($p < 0,05$).

A *Pim1* KO mice are resistant to MCTP and Chronic hypoxia-induced PAH



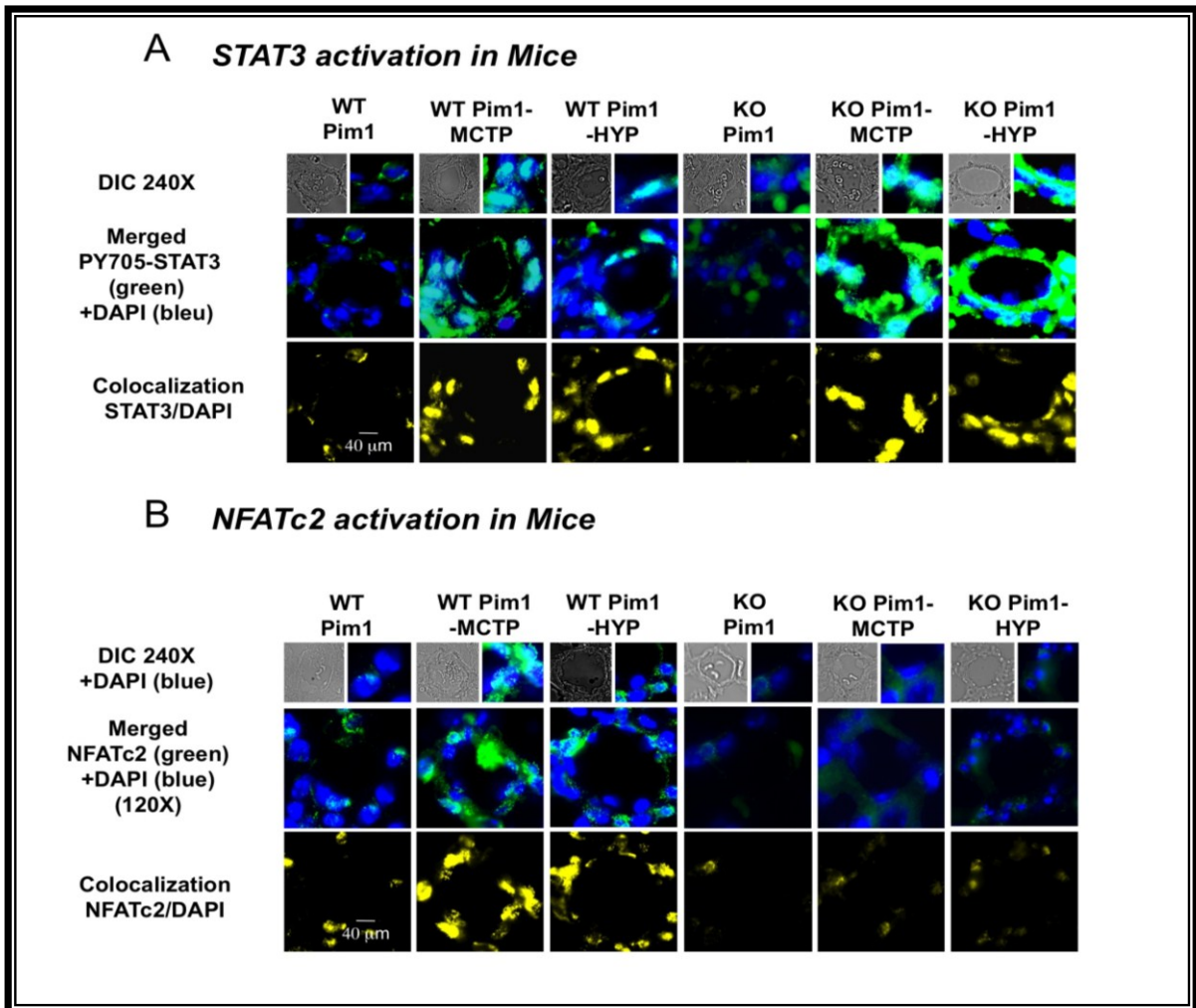
B *Pim1* KO mice have improved survival



Supplemental Figure 2- 9: Pim1 K.O mice are resistant to PAH.

(A) Longitudinal studies using echocardiography and Doppler showed that Pim1 K.O mice are resistant to both MCTP and chronic hypoxia induced PAH, as no changes in PAAT and RV hypertrophy were observed, while like in rats wild type mice injected with MCTP or exposed to CH had a significant ($p<0.05$) decrease in PAAT and significant increase in RVH.

(B) Pim1 K.O mice have improved survival over 25 days period post MCTP injection or CH exposure ($p<0.01$).

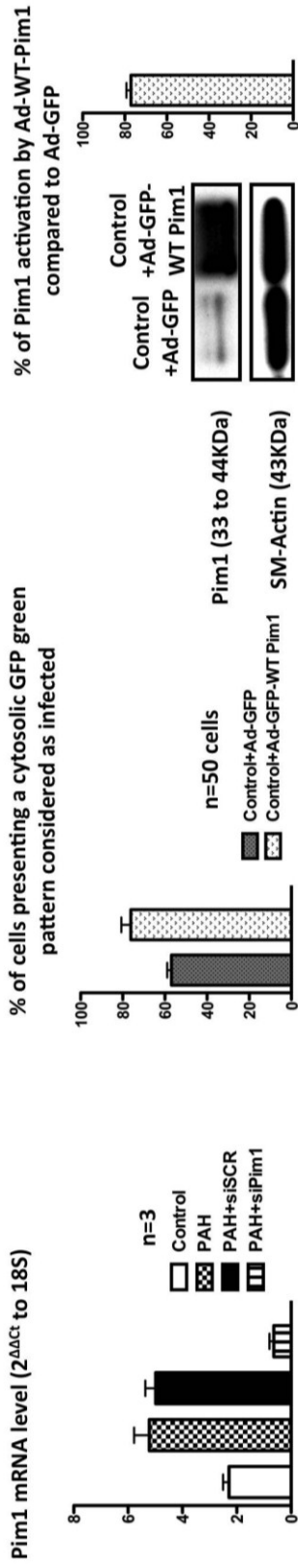


Supplemental Figure 2- 10: STAT3 and NFATc2 activation in Pim1 K.O.

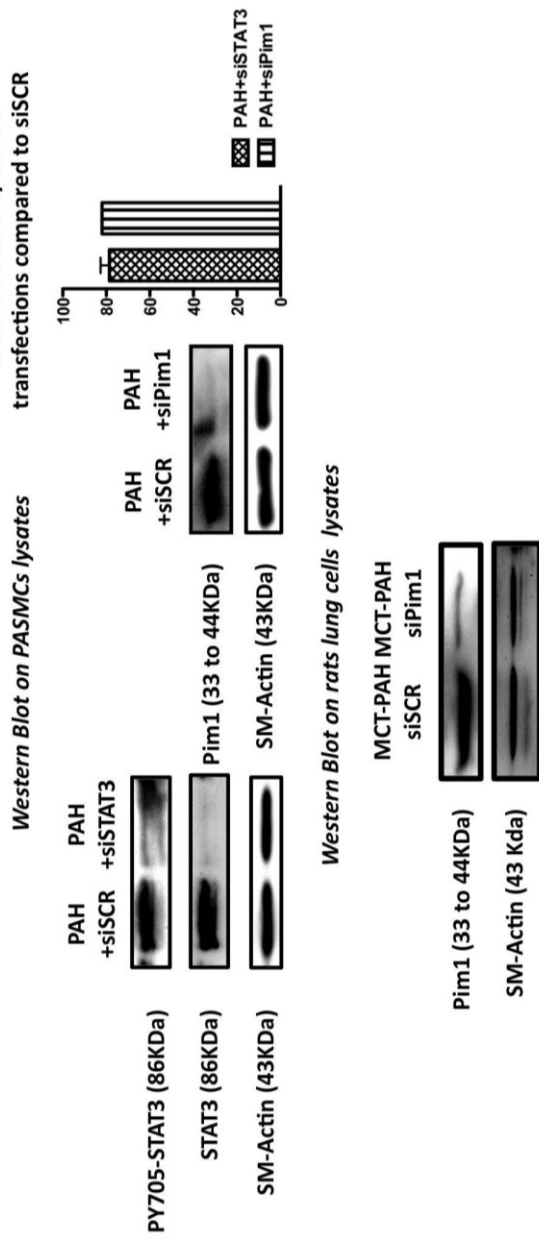
(A) As in rats STAT3 activation (PY705-STAT3 in green nuclear translocation) is increased in both WT and Pim1 KO mice injected with MCTP or exposed to chronic hypoxia giving a greater yellow staining.

(B) NFATc2 activation measure by NFATc2 (green) nuclear translocation, is increased only in WT animals injected with MCTP or exposed to CH (increased yellow staining). As predicted lack of Pim1 in KO animals prevented NFATc2 activation. This finding suggests that STAT3 activation is not sufficient to activate NFAT and to promote PAH.

A siRNA transfection efficiency B Adenoviruses infections efficiency



C siRNA efficiency on protein expression



Supplemental Figure 2- 11: Efficiency of Pim1 siRNA, adenoviruses, STAT3 siRNA and antibody immunofluorescence specificity.

(A) Using qRT-PCR we demonstrated that our concentration of Pim1 siRNAs block over 80% of Pim1 mRNA expression in PAH-PASMCs, while the same concentration of scrambled siRNA has no effect.

(B) Adenoviruses infection at 1.10^7 PFU induce an infection rate of 60 to 80% in healthy PASMCs exposed to 48h. Wild type Pim1 adenovirus infection in healthy-PASMC promotes Pim1 expression by 80%.

(C) Immunoblots performed in human PAH-PASMCs showed that both siSTAT3 and siPim1 blocks 80% of STAT3 and Pim1 the protein expression respectively. Similar results were found in the lungs of MCT-PAH rats nebulized with siPim1.

(D) Staining with only the same secondary antibody (green signal) used for Pim1, NFATc2 and Bcl2 immunofluorescence showed no unspecific staining in human distal PA.

CHAPITRE 3:

L'INHIBITION EN AMONT DE STAT3:

La plateforme signalétique FAK (Focal Adhesion Kinase) est impliquée dans la PAH et son inhibition est bénéfique.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

Parallèlement à l'étude réalisée sur l'axe STAT3/Pim1 précédemment présentée, le laboratoire a également réalisé une étude sur les miRNAs impliqués dans la pathogénèse de la PAH. Parmi les 377 miRNAs pour lesquels l'expression a été mesurée, miR-204 a été identifié comme le seul miRNA dont l'expression est significativement diminuée dans les PAH-PASMCs en comparaison des PASMCs contrôles. miR-204 est localisé dans l'intron du gène codant pour TRPM3 (Transient receptor potential melastatin 3) et nous avons démontré que tous deux sont sujets à une régulation négative infligée par STAT3. Nous avons aussi décrit Src comme à l'origine de l'activation inappropriée de STAT3 dans la PAH. SHP2 (Src homology domain-containing phosphatase 2) une tyrosine phosphatase cytoplasmique impliquée dans l'activation de Src^{420, 421}, a été identifiée comme la cible directe réprimée par miR-204. Par une diminution de miR-204, STAT3 abolit la répression exercée sur SHP2, renforce l'activation de Src et finalement maintient sa propre activation par cette boucle de rétrocontrôle positif³⁴².

La découverte de l'activation de Src dans la PAH nous a amené à porter notre attention sur un de ses principaux interactants : la kinase des points focaux d'adhésion FAK. FAK et Src sont des protéines tyrosine kinase non récepteur (PTK), activées indépendamment par autophosphorylation après intégration des signaux provenant de 4 sources : de l'interaction entre les intégrines et la ECM aux points d'adhésion focaux⁴²², des RTKs^{423, 424}, des GPCR⁴²⁵ et du cytosquelette^{426, 427}. Src et FAK forment alors un complexe, menant à une phosphorylation de FAK dépendante de Src sur des sites additionnels et transmettant le signal à de nombreuses voies de signalisation, comme STAT3⁴²⁸, ERK/MAPK, RhoGTPase⁴²⁹, Paxilin⁴³⁰ or PI3K.

Etant donné qu'une grande partie des signaux intégrés par FAK est augmentée dans la PAH et que de nombreuses voies régulées par FAK, comme STAT3, sont dysfonctionnelles dans la PAH, nous avons émis l'hypothèse que la plateforme signalétique FAK est activée dans la PAH et que son inhibition est bénéfique pour diminuer le phénotype cancéreux des PASMCs.

3. The signaling hub Focal Adhesion Kinase (FAK) is implicated in Human Pulmonary Hypertension and its inhibition is beneficial.

Roxane Paulin^{*}, Jolyane Meloche^{*}, Audrey Courboulin^{*}, Caroline Lambert^{*},

Alois Haromy[#], Evangelos Michelakis[#] and Sébastien Bonnet^{*}.

^{}Department of Medicine, Laval University,*

Centre de Recherche du CHUQ, Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, QC, CANADA.

[#]Department of Medicine, University of Alberta, Edmonton, AB, CANADA

Corresponding author:

Dr Sébastien Bonnet

Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec

10 rue McMahon, Québec, QC, G1R 2J6, Canada

Phone: 418 525 4444 ext 16350

Fax: 418-691-5562

sebastien.bonnet@crhdq.ulaval.ca

RESUME

INTRODUCTION : L'hypertension artérielle pulmonaire (PAH) est une maladie vasculaire obstructive caractérisée par une augmentation de la prolifération, de la migration et de la survie des cellules musculaires lisses vasculaires de l'artère pulmonaire (PASMCs). Nous avons également décrit l'axe Src/STAT3/NFAT comme activé de façon aberrante dans la pathologie et responsable du maintien dans le temps de ce phénotype. Dans le cancer, Src intègre de nombreux signaux (qui entraînent la phosphorylation du résidu Y418) et forme un complexe avec la kinase des adhésions focales FAK. Cette coopération entraîne la phosphorylation de FAK par Src sur divers sites déclenchant l'activation de voies de signalisation prolifératives, pro-survie, et augmentant la motilité cellulaire.

Nous avons donc émis l'hypothèse que FAK est un important partenaire de Src dans la PAH et que son inhibition est bénéfique pour diminuer la prolifération la survie et la migration des PASMCs.

METHODES/RESULTATS: Nous avons montré par immunoblots (n=3 p<0.05) dans des PAH-PASMCs humaines que FAK est activée (phosphorylée sur les résidus Y397 and Y576) et que Src est responsable de la phosphorylation de FAK sur la Y576, puisqu'elle est inhibée par l'inhibiteur spécifique de Src PP2. De plus, l'inhibition de FAK par siRNA diminue l'activation de STAT3. Nous avons montré que l'inhibition de FAK par siRNA et PP2 dans les PAH-PASMCs 1) Dépolarise le $\Delta\Psi_m$ (TMRM n=150 p<0.05), augmente l'apoptose de 25% (n=150 p<0.05 TUNEL) 2) Diminue la prolifération de 30% (PCNA & Ki67) 3) Diminue la migration de 25% (transwell assay, n=3 p<0.05) et inhibe l'invasion (Wound Healing, n=5 p<0.05). Pour terminer, l'inhalation *in vivo* de siRNA dirigés contre FAK dans le modèle de rats monocrotaline-PAH (n=10 p<0.05) montre un effet thérapeutique important caractérisé par une diminution des PAPs, de l'épaisseur du mur vasculaire, de l'hypertrophie ventriculaire droite (Echo & cathérisation) une augmentation de l'apoptose, une diminution de la prolifération et une diminution de l'activation de STAT3 dans PAS distales.

CONCLUSION : Nous avons démontré que l'inhibition de FAK est bénéfique dans le traitement de la PAH.

ABSTRACT

BACKGROUND: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a vasculopathy characterized by enhanced pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) proliferation, migration and suppressed apoptosis. The sustainability of this phenotype is attributed in part to the constitutive activation of c-Src leading to STAT3/NFAT pathway activation. In cancer, Src receives several signals (ie phosphorylation on Y419) and forms a complex with the Focal Adhesion Kinase (FAK, phosphorylated on Y397) at focal adhesion points. This cooperation lead to a Src-dependant phosphorylation of FAK on several site leading to pro-proliferative and pro-survival signals transduction and increasing the turnover of focal adhesions and cell motility.

We hypothesized that FAK is an important partner of Src in PAH and that its inhibition could be beneficial by decreasing proliferation, survival, migration and invasion of PASMCs.

METHODS/RESULTS: We showed by immunoblots (n=3 p<0.05) in human PAH-PASMCs that c-Src and FAK are activated (phosphorylated on Y419 and Y397 respectively) and that Src imply FAK phosphorylation on Y576, which is inhibited by Src inhibitor PP2. Moreover, FAK inhibition by siRNA decreases activation of the Src target STAT3. We demonstrated that both FAK (siRNA and PF-228) and Src (PP2) inhibition in PAH-PASMCs 1) Depolarizes $\Delta\Psi_m$ (TMRM n=150 p<0.05), increasing apoptosis by 25% (n=150 p<0.05 TUNEL) 2) Decreases proliferation by 30% (PCNA & Ki67) 3) Decreases cell migration by 25% (transwell assay, n=3 p<0.05) and inhibits invasion (Wound Healing, n=5 p<0.05). Finally, in vivo experiments with inhalation of FAK-siRNA in rats monocrotaline-PAH (n=10 p<0.05) support a putative therapeutic effect of FAK inhibition characterized by decreased PA pressure, wall thickness, right ventricular hypertrophy (Echo & catheterization), increased apoptosis, decreased proliferation and decreased STAT3 activation in distal PAs.

CONCLUSION: We demonstrated that the inhibition of FAK in human and experimental PAH is beneficial to reverse PAH.

3.1. INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a proliferative remodeling disease characterized by an accumulation of pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) and extracellular matrix (ECM) proteins in small vessel lumen. This lead to an abnormal remodeling/ thickening of vessel wall and to increased pulmonary vascular resistance. In response to increased afterload, the right ventricle RV hypertrophies, but without treatment, this compensatory response becomes quickly insufficient and the RV fails.

The pathogenesis of PAH is enigmatic, multifactorial and has fundamental similarities with cancer as PASMCs adopt a pro-proliferative, pro-survival, invasive quasi angiogenic phenotype^{245, 307, 431}. In some patients, there is a major genetic predisposition in the form of heterozygous mutations in the bone morphogenetic type II receptor (BMPR-II) leading to an impaired function of SMAD (mothers against decapentaplegic homolog) pathways^{248, 249} and an increased of the p38/MAPK (Mitogen-activated protein kinase) activation^{250, 251}. Furthermore, p53³³⁰, p21³³¹ and p27^{328, 329} are other tumor suppressor/oncogenic proteins that have been implicated in PAH. In addition, we recently showed the critical role of the c-Src/STAT3/Pim1 axis, accounting for increased expression and activation^{432, 433} of the transcription factor NFAT (nuclear factor of activated T-cells) and leading to several cancer features of PAH-PASMCs including: 1) the downregulation of voltage-gated K⁺ channels (Kv1.5), (depolarizing PASMCs and thus increasing [Ca²⁺]_i, which promotes proliferation), 2) the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m) hyperpolarization and the inhibition of ROS generation (both of which suppresses apoptosis)²⁴². Moreover, we demonstrated that STAT3 sustains its own activation trough a positive feedback loop applied on Src and involving the microRNA miR-204.

Focal adhesion kinase (FAK) and Src, are cytoplasmic non-receptor protein tyrosine kinases that have been highlighted for their contribution in cancer. Part of this interest originates from the complexity of the signaling events involving these kinases and from their description at the intersection of multiple pathways. Indeed, FAK and Src both integrate signals coming from four sources: extracellular matrix/integrins interactions⁴²², growth factor signaling^{423, 424}, G-protein coupled receptor signaling⁴²⁵ and signal coming from cytoskeleton^{426, 427}. This leads to FAK and Src autophosphorylation and subsequent

interaction permitting a Src-dependant and specific FAK activation by phosphorylation on additional sites. Hence, FAK functions as a signaling hub and is involved to some degree in every signal transduction processes that orchestrate cell differentiation, growth, survival, adhesion, spreading, invasion and migration as STAT3⁴²⁸, ERK/MAPK, RhoGTPase⁴²⁹, Paxilin⁴³⁰ or PI3K.

Since FAK is a Src partner, that can be activated by most of the signals increased in PAH and able to enhance activation of several pathways that are deregulated in PAH, STAT3 included, we hypothesized that FAK is implicated in PAH pathogenesis. Inhibition of the inappropriate activation of this axis could restore the normal phenotype. We believe that FAK inhibition could be a good therapeutic approach, with a specific effect and with little detrimental effects.

3.2. MATERIALS AND METHODS

All the experiments were performed with the approval of the Laval University Ethic and Biosafety Committee. The investigation conforms the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the principles outlined in the Declaration of Helsinki⁴³⁴.

3.2.1. Cell culture:

PAH-PASMCs were isolated from <1,500 µm–diameter small pulmonary arteries from 2 males with iPAH (31 and 48 years old) and 1 female with PAH group 1 (lupus; 54 years old) from lung explants²⁸⁰. All patients had right catheterization that confirmed pulmonary hypertension (mean PAP greater than 25mmHg at rest). Age and sex matched control PASMCs (3 males 45; 21; 64 years old and 2 females 17 and 35 years old) were purchased (Cell Application group USA). PASMCs (less than passage 6) were grown in high-glucose DMEM media supplemented with 10% FBS (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 1% antibiotic/antimytotic (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)²⁴⁰. All cells were used until the fifth passage.

3.2.2. Cell treatments:

siRNA (from AMBION, Austin, TX, USA) were transfected at 20nmol.L⁻¹ final concentration with CaCl₂⁴³². After 24h, media was changed and experiments were performed 48h after the beginning of the transfection. PP2 and PP3 were dissolved in DMSO applied for 48h at final concentration of 10 μM.

3.2.3. Measurement of the $\Delta\Psi_m$

Experiments in live PASMCS (37°C) were performed using a FV1000 confocal microscope equipped with a live cell apparatus (Olympus, Center Valley, PA).

Mitochondrial membrane potential was determined using 10nM tetramethylrhodamine methyl-ester perchlorate (TMRM, Invitrogen Branchburg, NJ, USA). Nuclei were stained using 50nM Hoechst 33342 (Invitrogen Branchburg, NJ, USA). Between 100 and 150 cells were measured by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 control- and 3 PAH-PASMCS cell lines.

3.2.4. Proliferation and apoptosis measurements:

Apoptosis rates were measured using Apoptag apoptosis detection kit (TUNEL; Millipore, Temecula, CA). Proliferation rates were measured by the proliferating cell nuclear antigen PCNA antibody from (1/400, DAKO, Carpinteria, CA) and Ki67 antibody (1/400, Millipore) according to the manufacturer's instructions^{241, 242}. The percentage of positive PASMCS for TUNEL or Ki67 was determined by the number of cell showing the presence of a nuclear staining over the total number of cell. The percentage of PCNA positive cell was determined using a threshold based on the intensity obtained in control-PASMCS. This threshold was applied in all the other groups and cells showing a nuclear fluorescent intensity superior to the threshold were considered as positive. Between 100 and 150 cells were measured by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 control- and 3 PA-PASMCS cell lines.

3.2.5. Nuclear translocation assay:

In PASMCS, protein nuclear localizations were measured in at least 100 to 150 cells by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 control- and 3 PAH-PASMCS cell lines. Intensity of nuclear staining was determined and plotted.

3.2.6. Cell migration assays

Experiments were performed using the QCM™ 24-Well Insert Colorimetric Cell Migration Assay kit from Millipore following manufacturer instructions. Cells were transfected with siRNA or treated with PP2 (or the inactive analogue PP3), 48 hours before performing the assay. Then, cells were trypsinized and $2 \cdot 10^5$ cells were plated in each insert in absence of FBS. 10% FBS in the lower chamber was used as chemoattractant. Plates were incubated 24h at 37°C, 4-6% CO₂. After 24h, media was removed and inserts were then placed in a staining solution. Inserts were washed and non-migratory cells layers from the interior of inserts were removed using a cotton-tipped swab. The stain was extracted from the underside by gently tilting inserts back and forth several times in an extraction buffer during 15 min. Optical densities of the stained solutions were measured at 560nm and are relative to the number of cells on the underside, i.e having migrated.

3.2.7. Wound healing assay by scratch test:

Cells were plated ($2 \cdot 10^5$ cells by well) in a 24 well plate and transfected with siRNA or treated with PP2 (or the inactive analogue PP3), 48 hours before performing the assay. Cell monolayer were wounded using a 10uL pipette tip. Wells were photographed just after scraping and 24h after. Pictures were analyzed using ImageJ software to define the number of invasive cell over the wound area.

3.2.8. Immunoblots

Protein expression of PY705-STAT3, STAT3, PY419-Src, PY576-FAK, PY397-FAK, FAK (1/1000 in BSA fraction V heat shock treated, Cell Signaling), c-Src (1/1000, Santa Cruz) were quantified and normalized to smooth muscle actin (1/500, Santa Cruz). Phosphorylated forms were obtained from the same membrane than total forms after 30min stripping at 50 degrees.

3.2.9. In vivo experiments:

250–350 g Sprague-Dawley rats were injected s.c. with $60\text{mg} \cdot \text{Kg}^{-1}$ of MCT (n=20). Intra-tracheal nebulization of siSCR (AMBION, 1nmol, n=5 rats) and siFAK (AMBION, 1nmol, n=5 rats) were given on day 18, once pulmonary hypertension being established.

3.2.10. Hemodynamic measurements:

Rats were initially anesthetized with 3–4% isoflurane and maintained with 2% during procedures. All rats underwent hemodynamic and echocardiography studies as previously described^{242, 243}. Right catheterizations (closed chest) were performed using SciScience catheters to directly measure PA pressures. Longitudinal and non-invasive evaluations of PAH was performed by echocardiography (using Vevo 2100 VisualSonics equipment) as previously described^{242 243}. Euthanasia was performed by exsanguinations.

3.2.11. Histology measurements:

Percentage media wall thickness was assessed as previously described²⁴². Briefly, lungs slides were colored with H&E, distal PAs <100µm wall thickness was measured using image Proplus software (Media Cybernetics, Inc USA). 2 measurements / artery in at least in 5 to 10 distal arteries per rats in 5 rats were performed.

3.2.12. Statistics:

Averaged data are means±SEM. For comparison between 2 means we used a paired T-test. For comparison between more than two means we used a One-way ANOVA followed by a Tukey post-test. Significance p<0.05 is indicated by *, p<0.01 by ** and p<0.001 by ***.

3.3. RESULTS

3.3.1. FAK is activated in PAH-PASMCs.

In order to determine whether FAK is activated in PAH, we performed Western Blot on Control and PAH-PASMCs. We studied FAK phosphorylation on the residue tyrosine 397 (PY397-FAK), reflecting on FAK autophosphorylation and on its ability to interact with Src^{435, 436}; and on the residue tyrosine 576 (PY576-FAK), located in the kinase domain and informing on FAK full kinase activity⁴³⁷. We found that both residues are phosphorylated with a two-fold increase in PAH-PASMCs compared to Control-PASMCs (Figure 3-1A).

3.3.2. FAK activation is dependant on Src kinase activity.

To verify the hypothesis on which FAK interacts with Src and that PY576-FAK depends on Src kinase activity, we treated PAH-PASMCs with the Src inhibitor PP2 or with the inactive analogue PP3. Src inhibition by PP2 (i.e decreased phosphorylation on tyrosine 416, PY416-Src) is associated with decreased PY576-FAK but not PY397-FAK compared to PP3, showing that only PY576-FAK depends on Src activation. PY397-FAK depends on primary signal and is not affected by Src inhibition in PAH-PASMCs (Figure 3-1B, western blot and graph left panel). We previously described that Src inhibition is associated with STAT3 inhibition (i.e decreased phosphorylation on tyrosine 705, PY705-STAT3). In order to study if FAK play a role in the Src-dependant STAT3 activation, we used a silencer RNA directed against FAK and studied STAT3 pattern of phosphorylation. Efficiency of FAK inhibition is seen as total FAK, PY397-FAK and PY576-FAK are reduced. PY705-STAT3 is affected by FAK inhibition, the ratio PY705-STAT3/STAT3 being decreased compared to PAH-PASMCs transfected with the scrambled silencer RNA (Figure 3-1B, western blot and graph right panel). FAK-dependent STAT3 inhibition was confirmed by nuclear translocation assay showing that transfection of siRNA directed against FAK in PAH-PASMCs decreases nuclear PY705-STAT3 intensity compared to siSCR treated PAH-PASMCs (Figure 3-1C). PY416-Src is decreased as well by FAK inhibition (Figure 3-1B, western blot and graph left panel). This could be explained directly by FAK inhibition or by a FAK-dependant STAT3 inhibition. Indeed, FAK was shown to be important in Src activation, sustaining its open and active conformation, and we also

previously described that STAT3 maintains Src activated by a positive feedback loop involving miR-204⁴³³.

3.3.3. FAK inhibition decreases PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis.

Since FAK activation was previously associated with increased proliferation and resistance to apoptosis rates in SMCs^{438, 439}, we studied the potential of FAK inhibition in reversing PASMCs hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype. PASMCs were grown in media supplemented with 10% FBS, a condition known to promote proliferation^{240, 242}. We found that FAK inhibition by either siRNA or a PP2-dependant Src inhibition in PAH-PASMCs decreases by 2.5-fold the % of Ki67 positive cells and by 2-fold the % of PCNA positive cells (Figure 3-2A) compared to appropriate control, leading PAH-PASMCs back to control proliferation rates.

As we previously described that PAH-PASMCs are resistant to mitochondria induced apoptosis, we studied effect of FAK inhibition on the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) (which is an index of the threshold for mitochondrial-dependent apoptosis), using tetramethylrhodamine methyl-ester (TMRM) in live PAH-PASMCs transfected with FAK siRNA, siSCR or treated with PP2 or PP3. FAK inhibition by siRNA or PP2 treatment caused a significant $\Delta\Psi_m$ depolarization compared to scrambled- or PP3-treated PAH-PASMCs respectively (Figure 3-2B). Apoptosis rates were studied using TUNEL assays. PAH-PASMCs are resistant to starvation (0.1% FBS media) induced apoptosis (decreased % of TUNEL positive cells compared to control-PASMCs Figure 3-2B). FAK inhibition by siRNA in “starved” PAH-PASMCs increases apoptosis by 5-fold and PP2 by 4-fold.

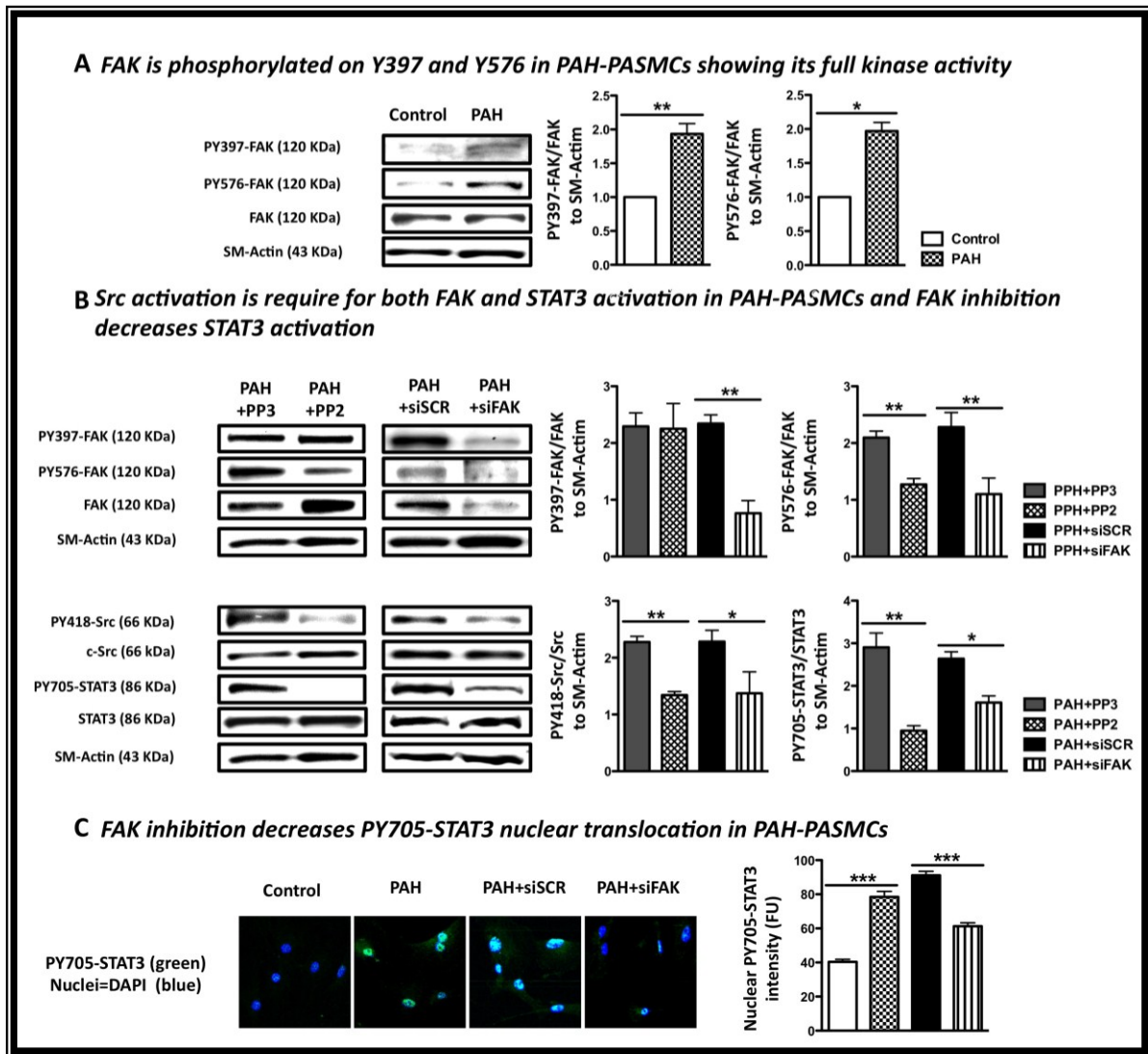


Figure 3- 1: FAK is activated in PAH-PASMCs.

A) FAK is phosphorylated on Y397 and Y576 in PAH-PASMCs showing its full kinase activity.

FAK activation was evaluated by immunoblots in triplicates (ratio PY397- or PY576-FAK/FAK normalized to Actin) between control-PASMCs (n=5 cell lines) and PAH-PASMCs (n=3 cell lines). Representative pictures and mean data were presented. In PAH-PASMCs both sites phosphorylation are increased by 2 times.

B) Src activation is required for both FAK and STAT3 activation in PAH-PASMCs and FAK inhibition decreases STAT3 activation

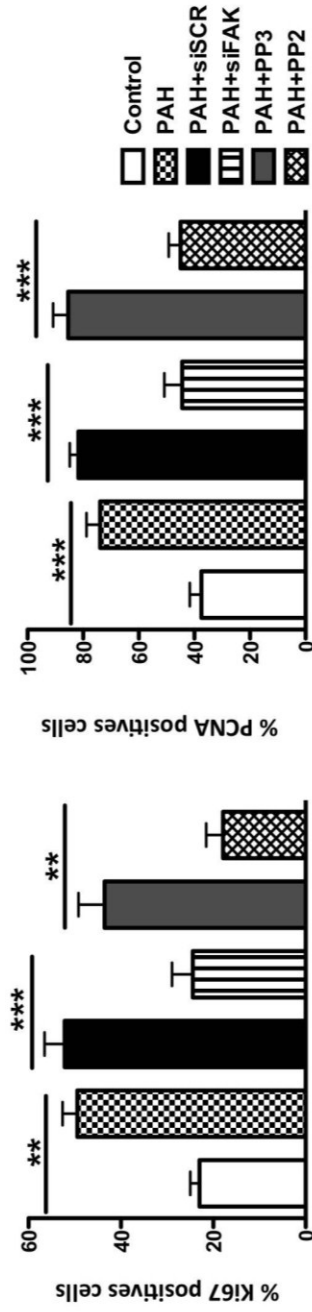
FAK activation was evaluated under Src inhibition by PP2. Representative gels and mean data show that an effective Src inhibition (decreased PY418-Src) in PAH-PASMCs is associated with decreased activation of FAK on PY576 compared to PAH-PASMCs treated with the appropriate control PP3. PP2 did not affected PY397 but decreases STAT3 activation as well.

and nuclear translocation assay measuring the amount of P-STAT3 (% of P-STAT3 positive cells) in green in the nucleus in blue (DAPI) and the colocalization in yellow. Note that the greater is the yellow intensity more P-STAT3 is activated. DHEA was dissolved in methanol and used at final concentration of $100\mu\text{mol.L}^{-1}$ (methanol final concentration $\leq 0.1\%$) for 48h. (n=100 to 150 cells by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 controls and 3 PAH-PASMCs cell lines, $p < 0.05$).

C) FAK inhibition decreases PY705-STAT3 nuclear translocation in PAH-PASMCs.

STAT3 activation was further evaluated by nuclear translocation assay measuring the amount of P-STAT3 (% of P-STAT3 positive cells) in green in the nucleus in blue (DAPI).

A FAK inhibition decreases PAH-PASMCs proliferation



B FAK inhibition increases PAH-PASMCs mitochondrial dependent apoptosis

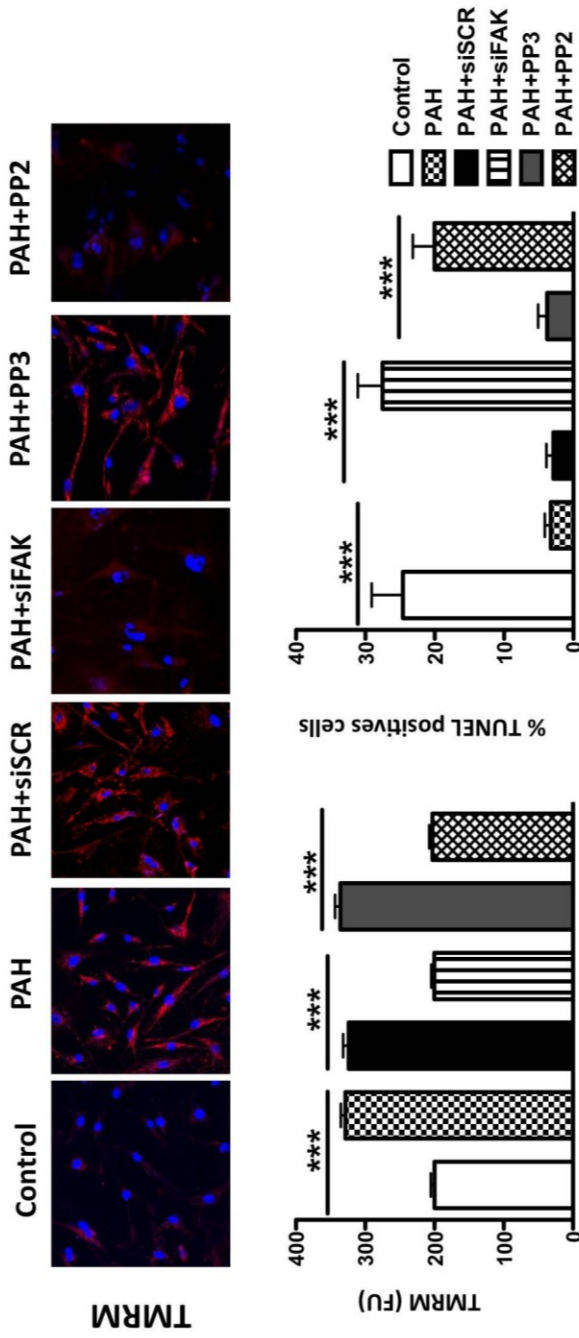


Figure 3- 2: FAK inhibition decreases proliferation and enhances apoptosis.

A) FAK inhibition decreases PAH-PASMCs proliferation.

PAH-PASMCs had increased proliferation rates measured by the % of PCNA and Ki67 positive cells, compared to healthy PASMCs. Both FAK siRNA and PP2 significantly decrease PAH-PASMC proliferation compared to appropriate controls siSCR and PP3 (n=100 to 150 cells by experiment, in at least 3 experiments by cell line in 5 controls and 3 PAH-patients PASMCs, p<0.05).

B) FAK inhibition increases PAH-PASMCs mitochondrial-dependent apoptosis

FAK inhibition by both siRNA and PP2 in PAH-PASMC reverses $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization (TMRM) and decreases apoptosis (%TUNEL) compared to siSCR and PP3.

3.3.4. FAK inhibition decreases PAH-PASMCs motility.

PASMCs motility was analyzed using modified Boyden chambers experiment with 24-well inserts containing an 8 μ m pore size polycarbonate membrane (Figure 3-3A). Cells were plated in inserts, on the bottom of the membrane and in serum-free media. Motility was stimulated by 10% serum media placed in the lower chamber. Migrating cells were stained, the stain was extracted and optical density was measured at 560nm. PAH-PASMCs have an increased motility (optical density around 3, Figure 3-3A) compared to control-PASMCs (optical density around 2, Figure 3-3A). As expected, FAK inhibition in PAH-PASMCs is associated with decreased migration, as the measured optical density is of 2.2 versus 2.8 for scramble-transfected cells (Figure 3-3A). These results show that FAK is required for enhanced pathological PAH-PASMCs motility.

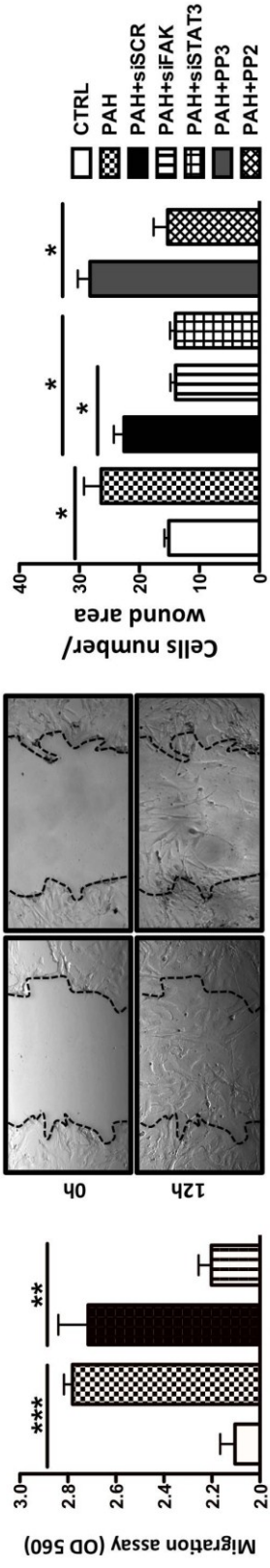
3.3.5. Src/FAK and STAT3 inhibitions decrease Wound Healing response in PAH-PASMCs.

We investigated the effect of Src/FAK inhibition on PASMCs migration, by *in vitro* wound healing assays (Figure 3-3A). As STAT3 was previously described to be implicated in SMCs invasion^{440, 441}, we also performed this experiment in presence of STAT3 silencer RNA.

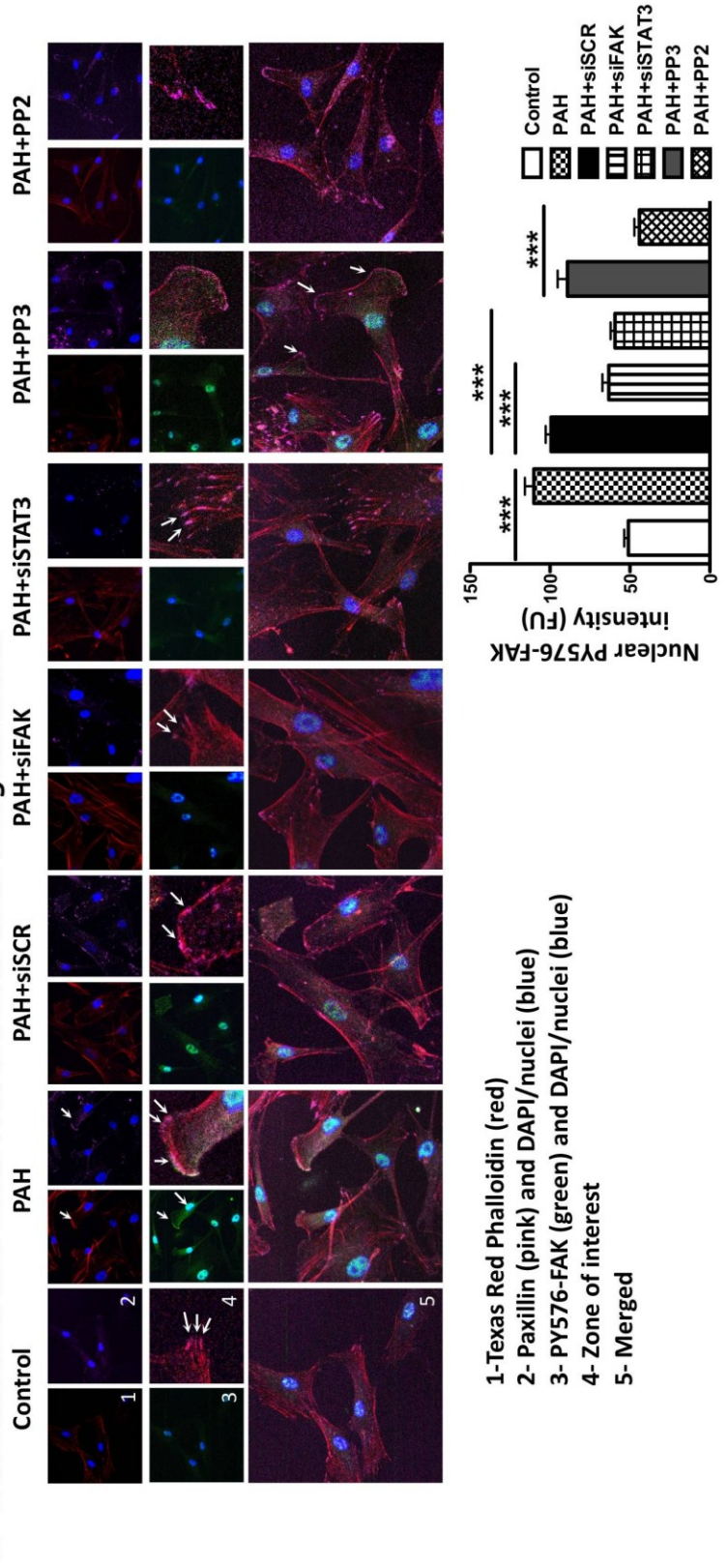
After 24h, PAH-PASMCs exhibited a better cell reorientation response along the wounded edge margin than control PASMCs. Moreover, PAH-PASMCs have migrated into the wounded area and completely filled it as shown by the number of cell in the wound area is increased by 2 times compared to control-PASMCs (Figure 3-3A). PAH-PASMCs transfected with FAK siRNA exhibited only limited cell reorientation responses along the wounded edge margin and did not efficiently repopulate the open space compared to

scrambled treated cells, with a 2-fold decrease in the number of cell in the wound area compared to siSCR (Figure 3-3A). Similar results were obtained with wound healing assays using PP2 compared to PP3 and STAT3 siRNA. These results demonstrate the critical role of the signaling hub Src/FAK in enhanced wound healing response seen in PAH-PASMCs and that Src/FAK inhibition restores a normal response to wound similarly to control cells. Interestingly, STAT3 also decreases PAH-PASMCs motility, suggesting strong cooperation between the 3 proteins in enhancing PAH-PASMCs motility.

A FAK inhibition decreases PAH-PASMCs migration and wound healing.



B FAK inhibition decreases PAH-PASMCs actin reorganization.



- 1- Texas Red Phalloidin (red)
- 2- Paxillin (pink) and DAPI/nuclei (blue)
- 3- PY576-FAK (green) and DAPI/nuclei (blue)
- 4- Zone of interest
- 5- Merged

Figure 3- 3: FAK inhibition decreases PAH-PASMCs motility.

A) FAK inhibition decreases PAH-PASMCs migration and wound healing. PASMCs motility was measured using a modified Boyden chamber experiments and 10% serum media as chemoattractant in the lower chamber. Migrating cells were stained, the stain was extracted and optical density was measured at 560nm. FAK inhibition in PAH-PASMCs is associated with decreased migration (n=3 experiments in duplicates, p<0.05).

In vitro wound healing assays were also performed in PAH-PASMCs with FAK inhibition. Cell motility in this case, was assessed by the number of cell that invaded the wound, over the wound area. FAK inhibition (siRNA and Src-dependent inhibition by PP2) as well as STAT3 inhibition (siRNA) decreases the PAH-PASMCs pathological response to wound healing (n=3 experiments p<0.05).

B) FAK inhibition decreases PAH-PASMCs actin reorganization.

F-actin reorganization was stained using Texas Red Phalloidin (1)(INVITROGEN) and focal adhesion dots were visualized using Paxillin(2) staining in far red (pink). PY576-FAK(3) was stained in green and nucleus by DAPI in blue. Representative pictures of typical formations observed in each group are presented (4 and 5). As PY576-FAK is present in the nucleus, nuclear PY576-FAK intensity mean data are presented in the graph on the left.

PAH-PASMCs are characterized by reorganization of the actin cytoskeleton with the formation of motile structures such as lamellipodia whereas control PASMCs only arbor small actin protrusions (arrows). FAK, Src and STAT3 inhibition decrease the presence of lamalipodia in PAH-PASMCs and decrease the amount of nuclear PY576-FAK.

3.3.6. PY576-FAK is localized in focal adhesion points and in the nucleus, and is associated with actin reorganization.

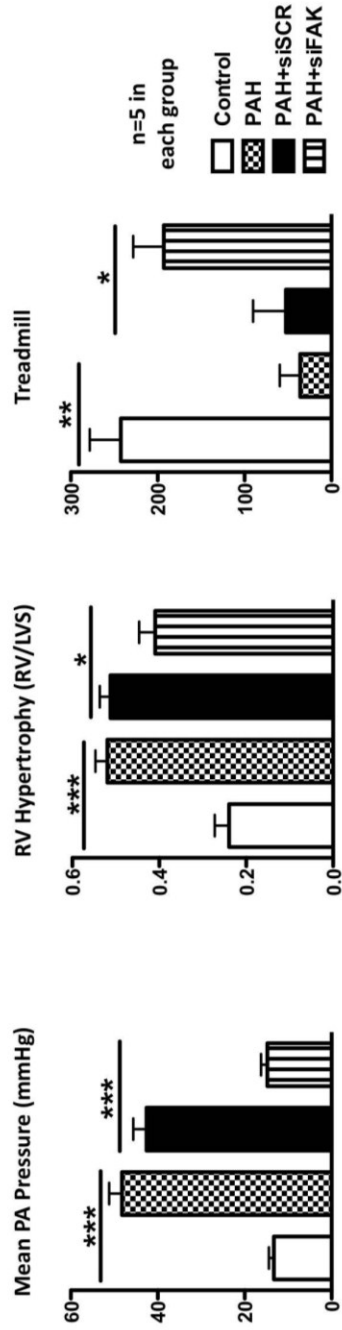
Src/FAK/STAT3 ability to decrease PAH-PASMCs aberrant motility was further studied using immunofluorescence. FAK localized in focal adhesions regulates focal adhesion turnover required for efficient cell movement⁴⁴² by enhancing paxillin phosphorylation and subsequent actin fiber formation⁴⁴³. Focal complexes formed at the leading edge of the cell provide new adhesive contacts and direction for cell movement⁴⁴⁴. Actin polymerization at the leading edge provides the protrusive force required for the extension of lamellipodia and the formation of focal complexes⁴⁴⁵. F-actin reorganization was visualized using Texas Red Phalloidin (INVITROGEN) and Paxillin was used to visualize focal adhesion points. Moreover, we also stained PY576-FAK, in order to confirm first that the amount is increased and to identify its localization during cell movements. PAH-PASMCs are characterized by reorganization of the actin cytoskeleton with the formation of motile structures such as lamellipodia (Figure 3-3B) whereas control PASMCs only arbor small F-actin protrusions (Figure 3-3B). PY576-FAK is increased in PAH-PASMCs, present to focal adhesion point, but surprisingly, we found that PY576-FAK is mainly localized in the nucleus. FAK inhibition by siRNA or Src-dependant inhibition by PP2 largely abolishes F-actin filament assembly and formation of typical focal adhesion plaques (less pink dots and less lamellipodia formation), although small F-actin protrusions were observable. Nuclear intensity level of PY576-FAK is decreased by siFAK, siSTAT3 and PP2 compared to appropriate controls siSCR and PP3, confirming a strong cooperation between Src, STAT3 and FAK. Nonetheless, the exact function of nuclear PY576-FAK in PAH is unknown. This feature will be discussed and will be the goal of further experiments.

3.3.7. FAK inhibition in vivo reverses monocrotaline-induced PAH.

Rats were sc-injected with monocrotaline (MCT-PAH) (60mg.Kg⁻¹) and disease progression was followed using non-invasive measurements (Doppler and Echocardiography) and exercise capacity on treadmill. After established-PAH (decreased PA acceleration time PAAT at day 18), FAK and scramble siRNA (1nmol) were selectively delivered into the lung by intra-tracheal nebulization²⁴². Two weeks later, rats were

anesthetized and PA pressures were measured closed chest using a telemetric catheter inserted in the right jugular vein.

A *FAK inhibition reverses MCT-PAH*



B *FAK inhibition decreases wall thickening by enhancing apoptosis and decreasing proliferation in PAs MCT-PAH*

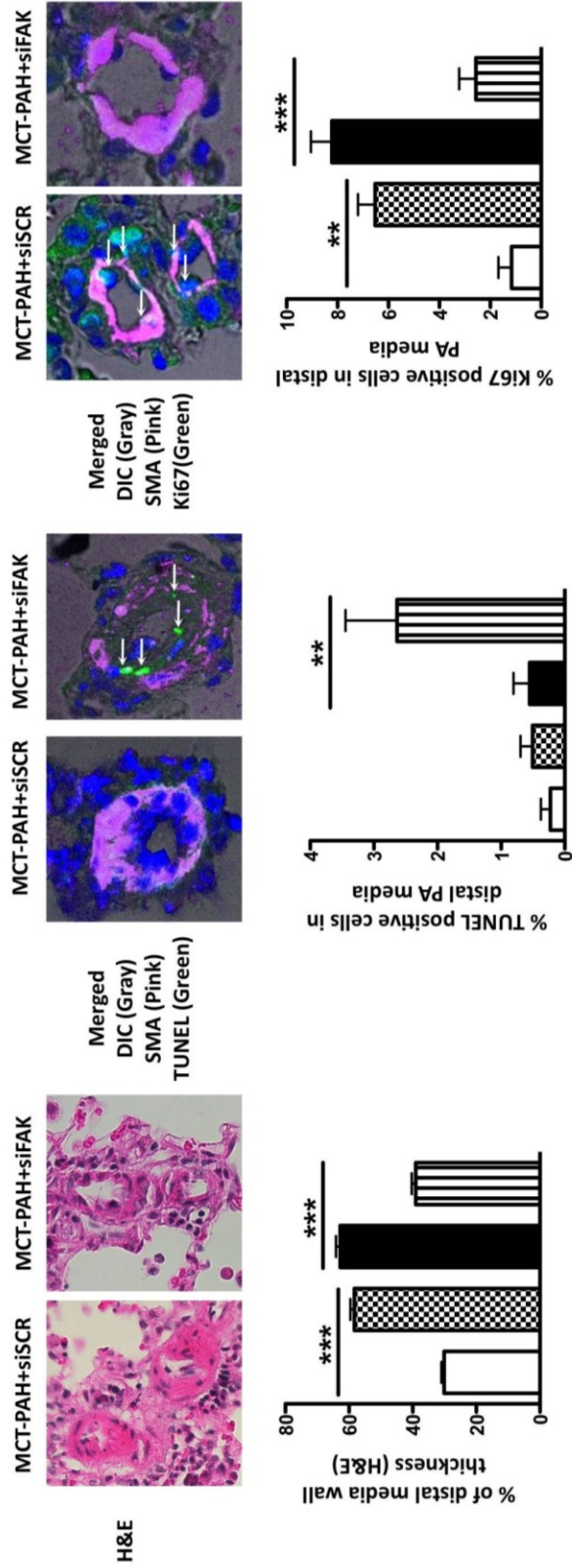


Figure 3- 4: Nebulized silencer RNA directed against FAK reverses MCT-PAH.

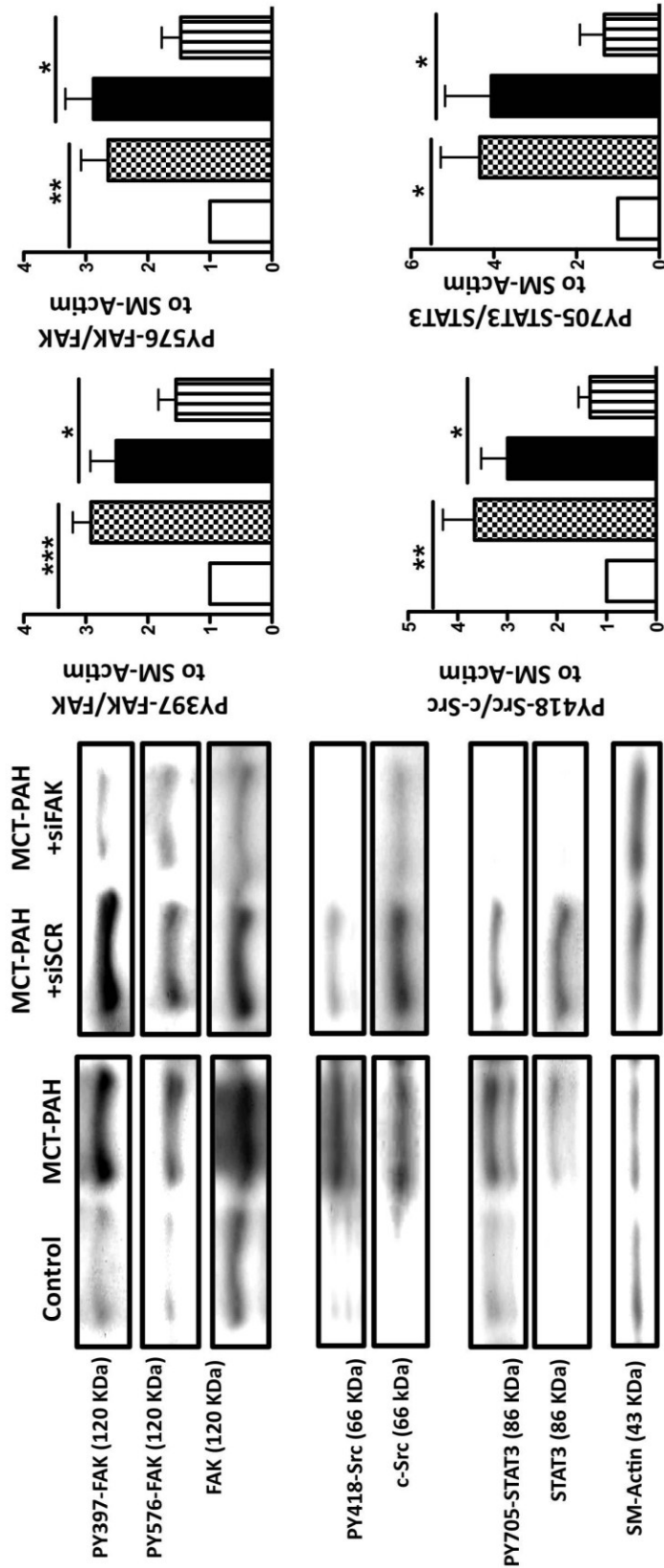
FAK inhibition (1 nebulization of 1nmol) 18 days after MCT injection decreased **A**) mean PA pressure (n=5 rats/group), RV hypertrophy (n=5 rats/group) and improved exercise capacity (n=5 rats/group). This is associated with decreased distal PA wall thickness (H&E, n=5 to 10 PA/rat with 5 rats/group) through enhanced apoptosis (% of TUNEL (green) positive cells) and decreased proliferation (% Ki67 (green) positive cells).

As expected, FAK inhibition is associated with decreased PA pressures (mean 20mmHg, n=5, p<0.05) compared to siSCR treated rats (mean 40mmHg, n=5, p<0.05, Figure 3-5A). Hearts were harvested and the measure of RV hypertrophy was assessed by the ratio of RV weigh/LVS weigh. RV hypertrophy is decreased by 20% in siFAK compared to siSCR-treated rats (n=5 in each group, p<0.05, Figure 3-5A). We studied PA wall remodeling on paraffin embedded lung section using Hematoxylin&Eosin staining (Figure 3-5B). Decreased PA wall thickness is seen in siFAK treated rats compared to siSCR treated ones, explaining the decrease in PA pressure and the decrease in afterload dependant RV hypertrophy (Figure 3-5B). By TUNEL and Ki67 staining on lung section, we determined that increased apoptosis rates and decreased proliferation levels are associated with FAK inhibition by nebulization, explaining the decrease in PA wall thickness in those rats.

3.3.8. FAK inhibition decreases in vivo Src/STAT3 activation.

In order to identify the efficiency of our treatments we performed Western Blots on PA's protein extracts. We demonstrated that total FAK is still strongly decreased 2 weeks after nebulization of siRNA directed against FAK, resulting in low levels of PY397 and PY576 phosphorylation. This treatment is also associated with decreased Src and STAT3 activation. The latest was further confirmed by immunofluorescence and nuclear translocation assay for PY705-STAT3 in distal PAs on paraffin embedded lung sections.

A FAK inhibition efficiency *in vivo* and subsequent decrease in Src/STAT3 activation.



B FAK inhibition is associated with decreased STAT3 translocation in the nucleus in MCT-PAH rat distal PAs.

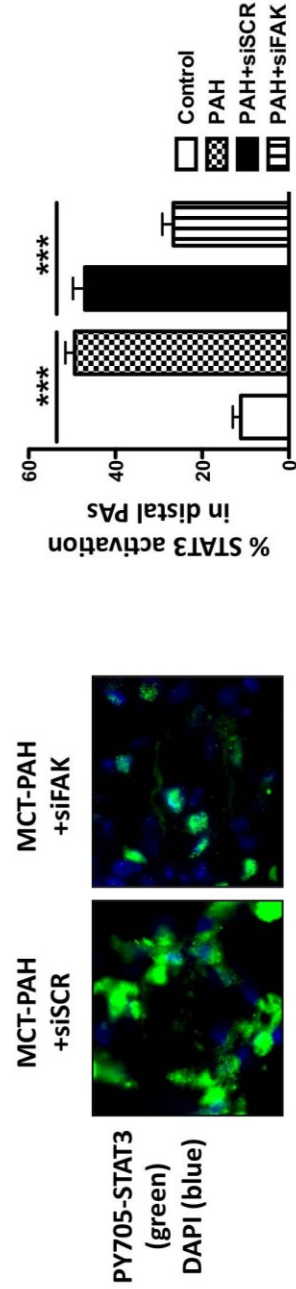


Figure 3- 5: Efficient FAK inhibition is associated with Src/STAT3 inhibition.

A) FAK inhibition efficiency *in vivo* and subsequent decrease in Src/STAT3 activation

FAK, Src and STAT3 activation were evaluated by immunoblots performed in triplicate on rats lungs with the ratios phosphorylated forms/total forms and PY705-STAT3/STAT3 normalized to SM-Actin (n=5 rats in each groups). FAK inhibition was confirmed *in vivo* and associated as well with Src/STAT3 inhibition.

B) FAK inhibition is associated with decreased STAT3 translocation in the nucleus in MCT-PAH rat distal PAs

STAT3 inhibition by the therapeutical intervention was further confirmed by nuclear translocation assay, showing a decrease in PY705-STAT3/nuclei colocalization (yellow) (n=5 to 10 arteries per rats in 5 rats in each groups).

3.4. DISCUSSION

In this study we demonstrated for the first time that FAK is phosphorylated on the residues 397 and 576 in PAH-PASMCs and that Src is implicated in FAK activation. We also demonstrated that FAK inhibition is associated with decreased proliferation, resistance to apoptosis and motility of PAH-PASMCs. We also found that STAT3 phosphorylation is affected by FAK inhibition and that STAT3 activation participates in PAH-PASMCs migration and wound healing. To the best of our knowledge, while STAT3 roles in cell motility were described several times in cancer, it's the first time that this is described in SMCs. STAT3 is well known as a cell motility regulator through its transcriptional functions⁴⁴⁶, but new evidence shows that STAT3 mediates cell migration by disrupting interactions between microtubules and one of its partners, stathmin. The association of STAT3, in a non-tyrosine-phosphorylated form and localized in the cytosol, with stathmin potentiates microtubule polymerization and cell movement⁴⁴⁷⁻⁴⁴⁹. In addition, phosphorylated STAT3 has also been found to localize to focal adhesions, interacting with focal adhesion proteins and contributing to ovarian cancer cell motility⁴⁵⁰. While, this was not particularly studied here, it confirms the implication of STAT3 in cell motility and its cooperation with Src/FAK complex.

We were particularly interested in PY576-FAK as it has been shown to reflect maximal FAK kinase activity⁴³⁷. Phosphorylation of this residue has been found to be enhanced by laminar shear stress⁴⁵¹. This is consistent with our model in which the increase in pressure levels create cyclic stretch and shear stress on the vessel wall^{452, 453}. Moreover, FAK activation seems to be activated by mechanical stress as Src/FAK axis activation has been described following an experimental 30mmHg increase in systemic pressure level⁴⁵⁴. The constant increase in pressure in PAH could be implicated in the maintenance and the amplification of FAK activation, leading to the worsening of PAH.

Interestingly we found that PY576-FAK is located in the nucleus. It has been demonstrated that p53 regulation, which is protective against PAH³³⁰, is dependent on FAK nuclear translocation. FAK inactivates p53 in a kinase-independent manner via its FERM domain, acting as a scaffold protein to enhance Mdm2-dependent p53 ubiquitination and degradation. These results support a biological role for nuclear FAK in promoting cell proliferation and survival by facilitating p53 turnover⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷ and could explain p53 regulation in PAH. Furthermore, in turn p53 is known to negatively regulates FAK expression by direct binding on the FAK promoter sequence and impairing its transcription, which could explain in part the p53 protective effect in PAH³³⁰. On the other side, it has been suggested that cellular migration and invasion are regulated by complex interplays between Src/STAT3 and p53/PTEN axes, which have two opposite forces, one enhancing invasion and one repressing it⁴⁴⁰. Their mutual antagonism seems to play a critical role in determining the outcome of Src-induced invasion and FAK could be one of the determinants in favor of the Src pathway.

Interestingly, it was recently show that miR-143 and 145 are implicated in the SMCs switch from contractile to synthetic phenotype^{458, 459}, that allows SMCs to migrate and proliferate. These miRNAs are organized in cluster whose regulation is dependant of Src and p53 pathways⁴⁶⁰. This further confirms that FAK/Src play a role in p53 regulation.

Previous findings have demonstrated the enhanced expression of two proteins implicated in actin polymerization, cofilin and profilin in PASMCs stimulated with PDGF and in PAs of MCT-PAH rats³⁵⁴. This is an agreement with our findings since we showed that FAK activation is associated with actin reorganization in PAH-PASMCs, and the

formation of motile structure like lamellipodia. Moreover, Rabinovitch and collaborators have described a Receptor for Advanced-glycation end-products (RAGE)-dependant PSMCs migration^{356, 357}. As we recently show that STAT3 is a downstream RAGE target in carotid artery SMCs stimulated by carboxymethyl lysine⁴⁶¹, it can be speculated that STAT3 also plays a role in RAGE-dependant PAH-PASMCs migration.

3.5. CONCLUSION

Here we provide evidences showing that targeting FAK in PAH could be beneficial. As several ATP-competitive FAK inhibitors are currently in clinical trial phase I and II for the treatment of several cancers, it is interesting to consider that these molecules could be applied for PAH therapies.

3.6. ACKNOWLEDGMENT:

We want to thanks the “Société Québécoise d’Hypertension Artérielle” for scholarships attributed to JM and RP.

3.7. FUNDING SOURCES/DISCLOSURES:

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Canadian Research Chair (CRC) to SB. No conflicts to disclose.

CHAPITRE 4:

L'INHIBITION DIRECTE DE STAT3 PAR LA DHEA.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

La Dehydroepiandrosterone (DHEA) est une hormone naturelle connue pour améliorer la PAH de par ses propriétés vasodilatatrices. En effet, en provoquant l'ouverture de canaux K^+ comme les Kv et les BKCa⁴⁶²⁻⁴⁶⁴, elle provoque une augmentation de la production de cGMP⁴⁶⁵ et entraîne la relaxation des VSMCs⁴⁶⁶. Néanmoins, les effets de la DHEA sur les voies de signalisations menant au remodelage vasculaire sont peu connus.

Nous avons démontré en 2009 dans un modèle *in vitro* de SMC de carotide et un modèle *in vivo* de lésion de la carotide, que la DHEA inhibe le remodelage vasculaire par inhibition de la voie Akt²⁴¹. Néanmoins, comme mentionné dans le chapitre 2, Akt n'est pas activé dans les PAH-PASMCs. C'est en découvrant qu'un traitement à la DHEA sur des hépatocytes est accompagné d'une diminution de l'activation de STAT3⁴⁶⁷ que nous avons émis l'hypothèse que la DHEA reverse la PAH également par inhibition de STAT3.

4. Dehydroepiandrosterone inhibits Src/STAT3 constitutive activation in Pulmonary Arterial Hypertension.

Roxane Paulin^{#*}; Jolyane Meloche^{#*}; Maria Helena Jacob*, Malik Bisserier^{\$},
Audrey Courboulin* and Sébastien Bonnet*

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2011 Nov;301(5):H1798-809. Epub 2011 Sep 2.

**Department of Medicine, Laval University,*

Centre de Recherche du CHUQ, Hôtel-Dieu de Québec, Québec City, QC, CANADA.

#RP and JM have equally contributed.

Corresponding author:

Dr Sébastien Bonnet

Centre de recherche de L'Hôtel-Dieu de Québec

10 rue McMahan, Québec, QC, G1R 2J6, Canada

Phone: 418 525 4444 ext 16350

Fax: 418-691-5562

sebastien.bonnet@crhdq.ulaval.ca

RESUME

INTRODUCTION : L'hypertension artérielle pulmonaire (PAH) est une maladie vasculaire obstructive caractérisée par une augmentation de la prolifération et de la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses vasculaires de l'artère pulmonaire (PASMCs). Nous avons récemment démontré que ce phénotype est associé avec une activation de l'axe STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription*) / Pim1 (*Provirus Integration site for Moloney murine leukemia virus*) / NFAT (Nuclear Factor of Activated T-cells). La dehydroépiandrosterone (DHEA) est une hormone stéroïdienne connue pour inhiber le remodelage vasculaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que la DHEA a un effet sur l'activation inappropriée de l'axe STAT3/Pim1/NFAT.

METHODES/RESULTATS: *In vitro*, sur des CMLV d'artères pulmonaires isolées de patients atteints d'une HTAP (n=3), nous avons démontré que la DHEA inhibe la phosphorylation de STAT3, et donc son activation (immunoblot et essai luciférase n=5 p<0.05). L'inhibition de STAT3 par la DHEA est associée à une diminution de l'expression et de l'activation de Pim1 et de NFATc2 (qRT-PCR, immunoblot, ChIP-PCR, n=3; p<0.05). L'inhibition de l'axe STAT3/Pim1/NFATc2 entraîne 1) une dépolarisation des membranes mitochondriales BAD/Bcl2 dépendante (TMRM, n=150 p<0.05), augmentant l'apoptose de 25% (TUNEL, annexin V; n=150 p<0.05); 2) une diminution du $[Ca^{2+}]_i$ (FLUO3AM, n=150, p<0.05), diminuant la prolifération d'environ 30% (PCNA, Ki-67, n=150, p<0.05). De plus, les résultats *in vivo* démontrent que la DHEA (10mg.kg⁻¹.j⁻¹ par gavage) reverse la PAH expérimentale (rats injectés à la monocrotaline) par une diminution de la pression dans l'artère pulmonaire et de l'hypertrophie ventriculaire droite. Ces effets sont secondaires à une inhibition de l'axe STAT3/Pim1/NFATc2.

CONCLUSION : Nous avons démontrés que la DHEA reverse la PAH par une inhibition de l'axe STAT3/Pim1/NFATc2.

ABSTRACT

BACKGROUND: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is an obstructive vasculopathy characterized by enhanced pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) proliferation and suppressed apoptosis. This phenotype is sustained by the activation of the Src/signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) axis, maintained by a positive feedback loop involving miR-204 and followed by an aberrant expression/activation of its downstream targets such as Pim1 and nuclear factor of activated T-cells (NFATc2). Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a steroid hormone shown to reverse vascular remodeling in systemic vessels. Since STAT3 has been described as modulated by DHEA, we hypothesized that DHEA reverses human pulmonary hypertension by inhibiting Src/STAT3 constitutive activation.

METHODS/RESULTS: Using PASMCs isolated from patients with PAH (n = 3), we demonstrated that DHEA decreases both Src and STAT3 activation (Western blot and nuclear translocation assay), resulting in a significant reduction of Pim1, NFATc2 expression/activation (quantitative RT-PCR and Western blot), as well as Survivin and upregulation of bone morphogenetic protein receptor 2 (BMP2) and miR-204. Src/STAT3 axis inhibition by DHEA is associated with 1) mitochondrial membrane potential (tetramethylrhodamine methyl-ester perchlorate; n = 150; P < 0.05) depolarization increasing apoptosis by 25% (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-mediated nick-end labeling; n = 150; P < 0.05); and 2) decreased intracellular Ca²⁺ concentration (fluo-3 AM; n = 150; P < 0.05) and proliferation by 30% (PCNA). Finally, in vivo similarly to STAT3 inhibition DHEA improves experimental PAH (monocrotaline rats) by decreasing mean PA pressure and right ventricle hypertrophy. These effects were associated with the inhibition of Src, STAT3, Pim1, NFATc2, and Survivin and the upregulation of BMP2 and miR-204.

CONCLUSION: We demonstrated that DHEA reverses pulmonary hypertension in part by inhibiting the Src/STAT3.

4.1. INTRODUCTION.

Pulmonary arterial hypertension (PAH, WHO Group1)) is a devastating disease of the pulmonary vascular network defined by an increase in pulmonary arterial pressure (PAP) due to a marked and sustained elevation of pulmonary vascular resistance (PVR). Progressively, patients develop a compensatory right ventricular hypertrophy, which becomes insufficient and leads to dilatation and failure⁸⁶.

At the cellular level, PAH is characterized by enhanced inflammation⁸³, proliferation and resistance to apoptosis⁸⁶ of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). The sustainability of this phenotype is due in part to the activation of neoplastic pathways involving the transcription factor STAT3 (Signal Transducer and activator of transcription 3)⁴³². The mechanism accounting for STAT3 activation in PAH-PASMCs exclusively relies on the Src pathway and is independent of the regular STAT3 activator Janus-activated kinase JAK2⁴³³. This suggests that Src/STAT3 inhibition could be of a great therapeutic interest for PAH. Similarly to cancer, Src/STAT3 activation in PAH has been associated with the upregulation of the oncogene Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus (Pim-1) promoting the activation of the transcription factor NFATc2 (Nuclear Factor of Activated T-cells). NFATc2 activation has been shown to account for both proliferation and resistance to apoptosis in cancer and PAH. Indeed, by downregulating K⁺ channels like Kv1.5, NFATc2 leads to cell depolarization, increasing [Ca²⁺]_i and promoting cell proliferation²⁴⁰⁻²⁴²; while by upregulating Bcl-2, NFATc2 activation leads to mitochondrial hyperpolarization and apoptosis resistance²⁴⁰⁻²⁴². Moreover, the Src/STAT3 axis is implicated in tumoral upregulation of Survivin, described as an important protein in the pathogenesis of PAH³⁰⁷. Finally, Src/STAT3 has been also associated with BMPR2 downregulation³³⁴, further promoting the pro-proliferative, anti-apoptotic PAH phenotype^{468, 469}.

The Src-dependant activation of STAT3 (i.e. phosphorylated P-STAT3 and translocated to the nucleus) is mediated by cytokines (such as Interleukin-6 (IL-6))³⁹³, growth factors (such as Platelet-derived growth factor (PDGF))³⁹³ or agonists (such as Endothelin-1 (ET1) and Angiotensin II (AngII))³⁹⁴, factors that all appear to be implicated in PAH^{273, 297, 299, 300}. Additionally, we provided evidence showing that STAT3 regulates a positive feedback loop sustaining its proper activation⁴³³. By downregulating miR-204 in

PAH, STAT3 activation leads to a constitutive c-Src activation maintaining STAT3 activated. For all these reasons, STAT3 can be considered as a major signaling hub of PAH and associated distal PA remodeling processes.

Dehydroepiandrosterone (DHEA) is a naturally and abundantly produced hormone, known to improve PAH through its vasodilator properties. Indeed, by opening K⁺ channel like Kv and BKCa⁴⁶²⁻⁴⁶⁴, increasing cGMP generation, and responsiveness to NO⁴⁶⁵, DHEA enhances VSMC relaxation⁴⁶⁶. Nonetheless, the effects of DHEA on vascular remodeling processes seen in PAH remain unknown. Several literature evidences have demonstrated the implication of the Src/STAT3 axis in both K⁺ channels modulation⁴⁷⁰ (enhancing vasoconstriction) along with NFATc2 activation^{432, 433} and BMPR2 downregulation^{256, 334} (promoting PSMCs proliferation and resistance to apoptosis). Since DHEA has been associated with decreased STAT3 activation in liver cells⁴⁶⁷, we hypothesized that DHEA could reverse PAH through the inhibition of the Src-dependent activation of STAT3. DHEA could potentiate its vasodilating effects by decreasing the NFAT-dependant proproliferative and antiapoptotic phenotype²⁴².

4.2. MATERIALS AND METHODS

All the experiments were performed with the approval of the Laval University Ethic and Biosafety Committee. The investigation conforms the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health (NIH Publication No. 85-23, revised 1996) and the principles outlined in the Declaration of Helsinki⁴³⁴.

4.2.1. Cell culture:

PAH-PASMCs were isolated from <1,500 μm–diameter small pulmonary arteries from 2 males with iPAH (31 and 48 years old) and 1 female with PAH group 1 (lupus; 54 years old) from lung explants²⁸⁰. All patients had right catheterization that confirmed pulmonary hypertension (mean PAP greater than 25mmHg at rest). Age and sex matched control PSMC (3 males 45; 21; 64 years old and 2 females 17 and 35 years old) were used.

Control PSMCs from 5 patients were purchased (Cell Application group USA). PSMCs (less than passage 6) were grown in high-glucose DMEM media supplemented

with 10% FBS (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and 1% antibiotic/antimycotic (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON, Canada)²⁴⁰. All cells were used until the fifth passage.

4.2.2. Cell treatments:

DHEA was dissolved in methanol and used at final concentration of 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (methanol final concentration $\leq 0.1\%$). IL-6 stimulations (100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$) were applied for 48h²⁴¹. siRNA (from AMBION, Austin, TX, USA) were transfected at a final concentration of 20 nmol.L^{-1} with CaCl_2 ⁴³². After 24h, medium was changed and experiments were performed 48h after the beginning of the transfection.

4.2.3. Measurement of the $\Delta\Psi_m$ and $[\text{Ca}^{2+}]_i$

Experiments were performed in live PASMCS (37°C) using a FV1000 confocal microscope equipped with a live cell apparatus (Olympus, Center Valley, PA).

Mitochondrial membrane potential was determined using 10nM tetramethylrhodamine methyl-ester perchlorate (TMRM, Invitrogen Branchburg, NJ, USA). $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was determined using 5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ Fluo-3AM (Invitrogen Branchburg, NJ, USA)²⁴¹.²⁴² Nuclei were stained using 50 nM of Hoechst 33342 (Invitrogen Branchburg, NJ, USA). Between 100 and 150 cells were measured by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 control- and 3 PAH-PASMCS cell lines.

4.2.4. Proliferation and apoptosis measurements:

PASMCS were exposed to 10% FBS (a condition known to promote proliferation)^{240, 242} or 0.1% FBS (a “starvation” condition which promotes apoptosis)^{240, 242}. Apoptosis rates were measured using Apoptag apoptosis detection kit (TUNEL; Millipore, Temecula, CA). Proliferation rates were measured by the proliferating cell nuclear antigen PCNA antibody from (1/400, DAKO, Carpinteria, CA) and Ki67 antibody (1/400, Millipore) according to the manufacturer’s instructions^{241, 242}. The percentage of positive PASMCS for TUNEL or Ki67 was determined by the number of cell showing the presence of a nuclear staining over the total number of cell. The percentage of PCNA positive cell was determined using a threshold based on the intensity obtained in control-PASMCS. This threshold was applied in all the other groups and cells showing a nuclear fluorescent intensity superior to the threshold were considered as positive. Between 100

and 150 cells were measured by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 control- and 3 PA-PASMCs cell lines.

4.2.5. Nuclear translocation assay:

In PASMCs, STAT3 and NFATc2 activation were measured in at least 100 to 150 cells were measured by experiment, in 3 experiment by cell line, in 5 control- and 3 PA-PASMCs cell lines.

Briefly, PY705-STAT3 (1/250, Cell Signaling) and NFATc2 (1/250, ABCam) staining were performed as previously described²⁴². Secondary antibodies used were Alexa Fluor 488 or 594 (1/1000, Invitrogen, Branchburg, NJ, USA). The percentage of positive cell was determined using a threshold based on the intensity obtained in control-PASMCs. This threshold was applied in all the other groups and cells showing a nuclear fluorescent intensity superior to the threshold were considered as positive.

The same analysis was performed in rats, in 10 distal arteries (<100µm) /rat in 5 rats per groups. Colocalization between the targeted protein stained in green and the nucleus stained in blue with DAPI was further assessed using Volocity software from Perkin Elmer USA.

4.2.6. Quantitative RT-PCR and immunoblots

Experiments were performed as previously described^{241, 242} qRT-PCR $2\Delta Ct$ were calculated with 18S as housekeeping gene (Taqman Gene expression Assay, Applied Biosystem, Foster, CA, USA). For immunoblots, protein expression of PY705-STAT3, STAT3, PY419-Src (1/1000 Cell Signaling), c-Src (1/1000, Santa Cruz) were quantified. PY705-STAT3/STAT3, PS419-Src/c-Src ratios evaluations were obtained from the same membrane after 30min stripping at 50 degrees. The phosphorylated forms were reported on the total form of the protein, and normalized by the Amido Black as previously described²⁴².

4.2.7. In vivo experiments:

250–350 g Sprague-Dawley rats were injected s.c. with 60mg.Kg⁻¹ of monocrotaline MCT (n=20). Intra-tracheal nebulization (50µL) of siSCR (AMBION, 1nmol, n=5 rats) and siSTAT3 (AMBION, 1nmol in n=5 rats) were performed under anesthesia on day 18, once pulmonary hypertension was established. Freshly prepared DHEA (Sigma Aldrich, St Louis, MO, US) was administered by gavage (n=5 rats) once a day at the concentration of 10mg.Kg⁻¹.D⁻¹⁴⁷¹ during 2 weeks. Experiments were performed with the approval of the Laval University Animal Ethics Committee.

4.2.8. Hemodynamic measurements:

Rats were initially anesthetized with 3–4% isoflurane and maintained with 2% during procedures. All rats underwent hemodynamic and echocardiography studies as previously described^{242 243}. Right catheterizations (closed chest) were performed using SciScience catheters to directly measure PA pressures. Longitudinal and non-invasive evaluations of PAH was performed by echocardiography (using Vevo 2100 VisualSonics equipment) as previously described^{242 243}. Euthanasia was performed by exsanguinations.

4.2.9. Histology measurements:

Percent of media wall thickness was assessed as previously described²⁴². Briefly, lungs slides were colored with H&E, distal PAs <100µm wall thickness was measured using image Proplus software (Media Cybernetics, Inc USA). 2 measurements/ artery in 5 to 10 distal arteries per rat, in 5 rats per groups were performed.

4.2.10. Statistics:

We tested if the data sets we are using for statistical assessment are coming from a normal distribution using the Shapiro-Wilk test (Royston 1995). As all our data sets passed the test significantly (all $p > 0.05$) we were able to apply parametric analysis to our study and to present our results as mean \pm standard error (S.E.M.). For comparison between 2 means we used a Student's t test. For comparison between more than two means we used a One-way ANOVA followed by a Tukey–Kramer tests. Significance is indicated by (*). Probability values less than 0.001 (***), 0.01 (**), and 0.05 (*) were considered as statistically significant.

4.3. RESULTS

4.3.1. DHEA decreases Src/STAT3 activation in PAH-PASMCs.

Using Western Blot we showed an increase in the amount of phosphorylated STAT3 on tyrosine 705 (i.e. active form of STAT3) over total STAT3. STAT3 activation is increased by 3.4 fold in PAH-PASMCs compared to control (Figure 4-1A). By immunofluorescence, we evaluated the level of P-STAT3 translocated to the nucleus, which is associated with its transcriptional activity. The percentage of P-STAT3 positive cells (presenting an increased nuclear P-STAT3 intensity compared to control cells) is increased by 7 times in PAH-PASMCs compared to control-PASMCs (Figure 4-1A).

PAH-PASMCs treated with DHEA ($100\mu\text{mol.L}^{-1}$) for 48h showed a significant decrease in both P-STAT3/STAT3 ratio and nuclear translocation of P-STAT3 (Figure 4-1A), suggesting that DHEA inhibits the transcriptional activity of this protein.

4.3.2. DHEA and STAT3 inhibition reverses miR-204 downregulation in human PAH-PASMCs.

In addition to the circulating cytokines and growth factors accounting for STAT3 activation in PAH-PASMC, we recently demonstrated that the sustained STAT3 activation in these cells also depend on a STAT3-dependent downregulation of the microRNA miR-204⁴³³. This positive feedback loop mechanism relies on the binding of STAT3 on the host gene of miR-204 leading to its downregulation. This downregulation accounts for a sustained c-Src activation which is responsible of the constitutive STAT3 activation⁴³³. Since DHEA has the ability to decrease STAT3 activation⁴⁶⁷, we speculated that this positive feedback loop should be disrupted by DHEA. To this end, we first studied the effect of STAT3 inhibition on Src activation. PAH-PASMCs were transfected by either scramble RNA or RNA directed against STAT3. As expected, STAT3 inhibition is associated with decreased Src activation in PAH-PASMCs compared to scramble sample (Figure 4-1B). As miR-204 is one of the major players of this loop, miR-204 expression was measured in control-PASMCs, PAH-PASMCs and in PAH-PASMCs treated with STAT3 siRNA, scramble siRNA or DHEA. STAT3 dependent regulation of miR-204 was confirmed since STAT3 inhibition by siSTAT3 in PAH-PASMCs increases miR-204 expression to a level similar as the one seen in control PASMCs (Figure 4-1B). Similarly, DHEA significantly increase miR-204 expression in PAH-PASMCs. Finally, to confirm

our previous findings we studied whether c-Src activation (induced by miR-204 downregulation) is decreased by DHEA. Using Western Blot we showed that DHEA decreases c-Src activation (i.e. phosphorylated Src on tyrosine 418/total c-Src ratio) in PAH-PASMCs (Figure 4-1C), disrupting the STAT3-dependant positive feedback loop sustaining its proper activation.

Figure 4- 1: DHEA decreases Src/STAT3 activation in PAH-PASMCs.

A) DHEA decreases STAT3 activation in PAH-PASMCs. STAT3 activation was evaluated by immunoblots in triplicates (Ratio PY705-STAT3/STAT3 normalized to Amido Black) and nuclear translocation assay measuring the amount of P-STAT3 (% of P-STAT3 positive cells) in green in the nucleus in blue (DAPI) and the colocalization in yellow. Note that the greater is the yellow intensity the more P-STAT3 is activated. DHEA was dissolved in methanol and used at final concentration of $100\mu\text{mol.L}^{-1}$ (methanol final concentration $\leq 0.1\%$) for 48h (n=100-150 cells by experiment, in 3 experiments by cell line, in 5 controls and 3 PAH-PASMCs cell lines, $p<0.05$).

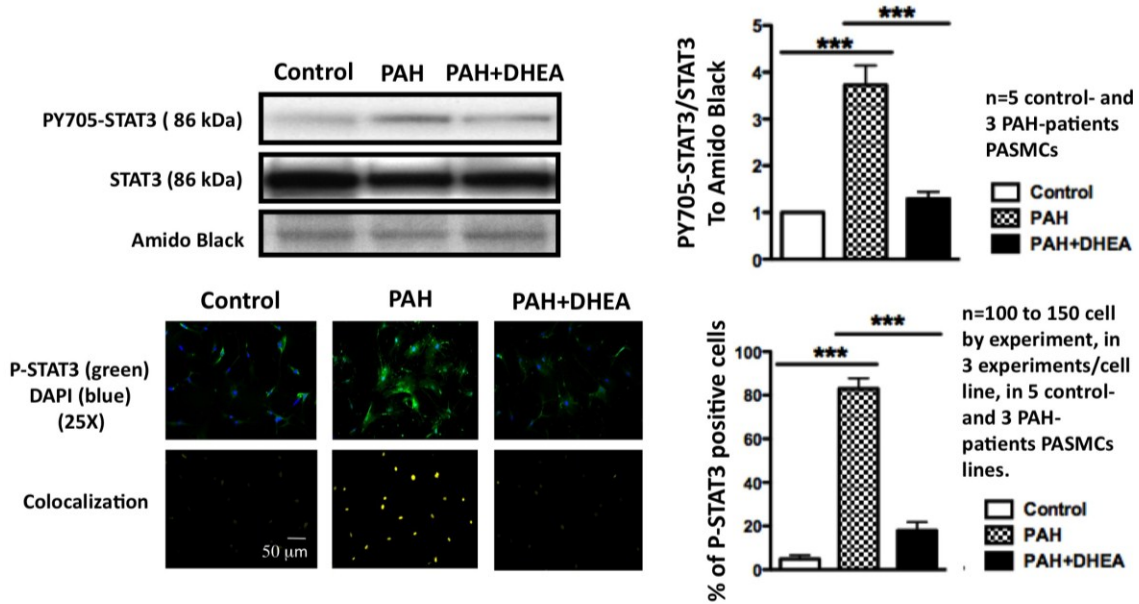
B) DHEA increases miR-204 level, disrupting the positive feedback loop.

Src activation was evaluated under STAT3 inhibition by silencer RNA. Representative gels and mean data show that an effective STAT3 inhibition in PAH-PASMCs by siRNA is associated with decreased activation of Src (P-Src/Src ratio normalized to Amido Black) compared to PAH-PASMCs treated with siSCR. miR-204 mRNA level was measured by qRT-PCR and normalized to U6 in control, PAH, PAH+DHEA, PAH+siSCR and PAH+siSTAT3 groups. (All the experiments were performed in triplicates using PASMCs from 5 controls and 3 PAH-patients, $p<0.05$)

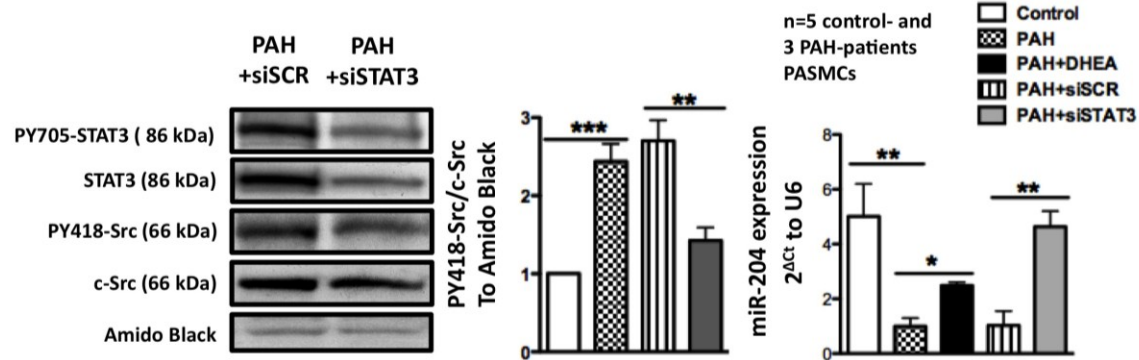
C) DHEA decreases Src activation.

Src activation was evaluated by immunoblots. Representative gels showing the amount of Src phosphorylated on tyrosine 419 compared to the total amount of Src. (All the experiments were performed in triplicates using PASMC from 5 controls and 3 PAH-patients, $p<0.05$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

A DHEA decreases STAT3 activation in PAH-PASMCs



B DHEA increases miR-204 level disrupting the positive feedback loop



C DHEA decreases Src activation in PAH-PASMCs

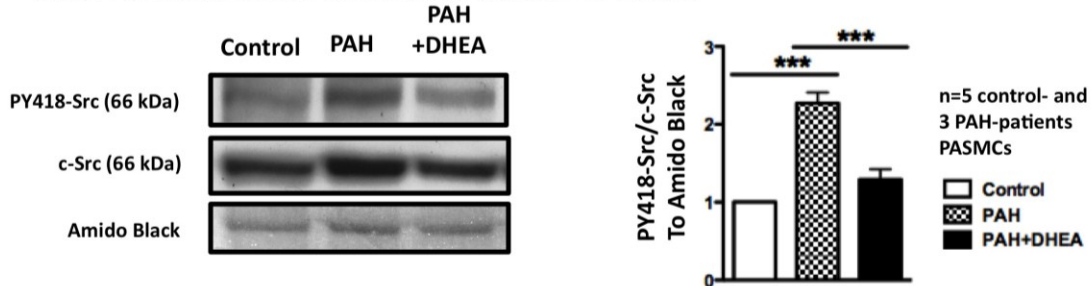


Figure 4- 2: DHEA effects on STAT3 downstream targets and proliferation/apoptosis rates.

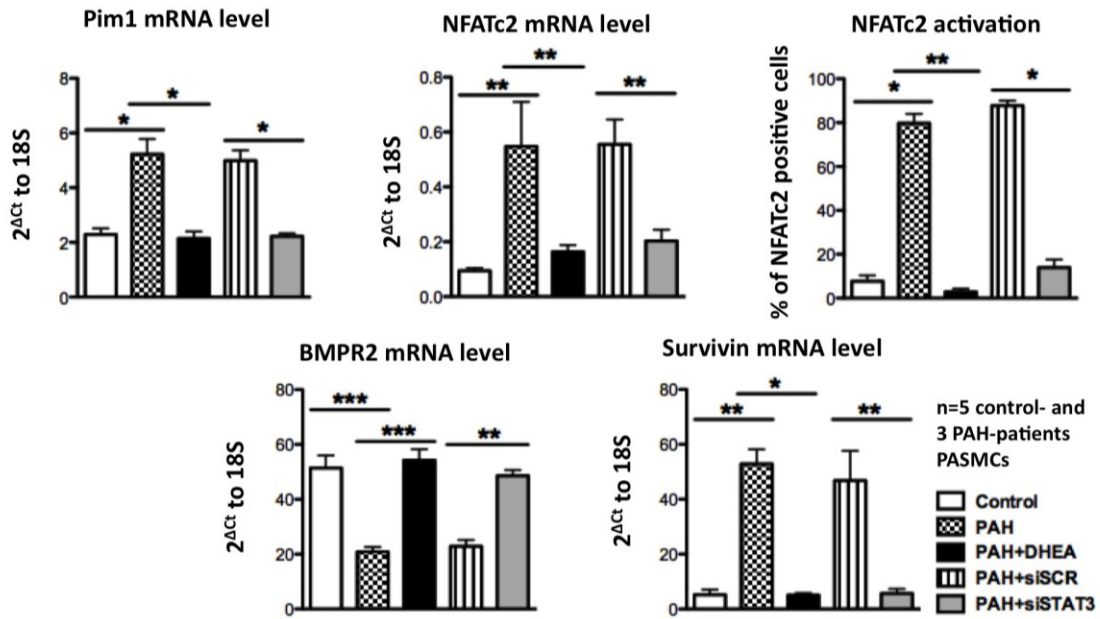
A) DHEA restores expression/activity of STAT3 downstream targets aberrantly expressed/activated in PAH.

Pim1, NFATc2, BMPR2 and Survivin mRNA levels were measured by qRT-PCR in triplicates and normalized to 18S in PASMCS from 5 control, 3 PAH and 3 PAH treated with DHEA, scramble silencer RNA (siSCR, 20mmol.L⁻¹) or STAT3 silencer RNA (siSTAT3, 20mmol.L⁻¹). Similarly to STAT3 inhibition by silencer RNA, DHEA impairs STAT3 signal transduction to downstream targets, resulting in Pim1, NFATc2 and Survivin decreased mRNA level, and increased BMPR2 mRNA level. NFATc2 activation measured by nuclear translocation assay and expressed as the percentage of nuclear NFATc2 positive cells. (n=100 to 150 cells by experiment, in at least 3 experiments by cell line in 5 controls and 3 PAH-patients PASMCS, p<0.05).

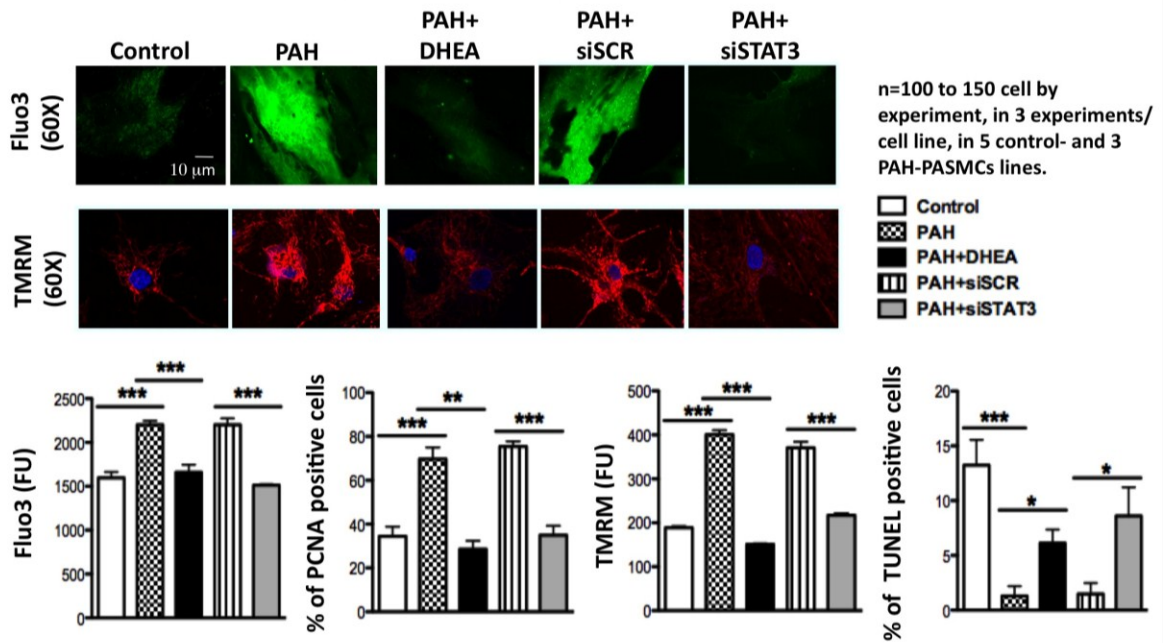
B) DHEA restores the proliferation/apoptosis balance.

PAH-PASMCS had increased [Ca²⁺]_i concentrations and proliferation rates (% PCNA) compared to healthy PASMCS. Both STAT3 siRNA and DHEA significantly decrease PAH-PASMC proliferation. DHEA in PAH-PASMC reverses ΔΨ_m hyperpolarization (TMRM) and decreases apoptosis (%TUNEL) (n=100 to 150 cells by experiment, in at least 3 experiments by cell line in 5 controls and 3 PAH-patients PASMCS, p<0.05). FU: fluorescence units. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

A *DHEA restores expression/activity of STAT3 downstream targets aberrantly expressed/activated in PAH.*



B *DHEA restore the proliferation/apoptosis balance*



4.3.3. DHEA-dependent inhibition of the Src/STAT3 decreases the oncogenic Pim-1/NFATc2/Survivin axis and promotes BMPR2 expression.

To determine whether DHEA-dependent STAT3 inhibition is transduced, we studied the effects of DHEA on the STAT3 downstream targets implicated in PAH including Pim-1; NFATc2; BMPR2 and Survivin^{432, 433, 468, 469}. Pim1 and NFATc2 mRNA levels were measured in PAH-PASMCs in presence or not of DHEA. As STAT3 molecular inhibition (siRNA), DHEA decreases Pim1 and NFATc2 mRNA expression in PAH-PASMCs (Figure 4-2A). Since Pim1 accounts for NFATc2 activation in PAH⁴³², we measured the effects of DHEA on NFATc2 activation by a nuclear translocation assay/immunostaining. We previously described that over 60% of PAH-PASMCs show NFATc2 activation whereas only 20% are positive for activated NFATc3 and less than 5% for NFATc4. For these reasons, we consider that NFATc2 is the predominant NFAT isoform in PAH-PASMCs²⁴². DHEA, as well as STAT3 siRNA, decreases NFATc2 activation by 7 fold compared to untreated or scrambled treated PAH-PASMCs (Figure 4-2A). These results show that through inhibition of STAT3 phosphorylation, DHEA has an inhibitory effect on Pim1/NFATc2 axis.

BMPR2 downregulation is recognized as an important marker of the pro-proliferative, anti-apoptotic PAH phenotype^{468, 469}. It has been recently suggested that STAT3 activation in PASCs could be associated with repression of BMPR2³³⁴. We thus speculated that DHEA, by inhibiting STAT3, could rescue BMPR2 levels. Indeed, both STAT3 inhibition by siRNA and DHEA enhance BMPR2 mRNA levels in PAH-PASMCs (Figure 4-2A).

STAT3 activation was also associated in cancer^{472, 473} and systemic vascular remodeling⁴⁶¹ with an up-regulation of Survivin mRNA levels. Survivin, a member of the inhibitor of apoptosis family of proteins, was described as a major player in PAH pathogenesis³⁰⁷. For these reasons, we studied whether STAT3 inhibition by siRNA or DHEA can decrease Survivin expression in PAH. We observed a 5-fold increase of Survivin expression in PAH-PASMCs compared to control PASMCs. Both, siSTAT3 and DHEA normalized Survivin mRNA level in PAH compared to siSCR and untreated PAH respectively (Figure 4-2A), showing for the first time that Survivin expression in PAH dependant at least in part of STAT3 activation. All these results offer for the first time a

putative mechanism explaining at the same time the activation of Pim-1/NFATc2/Survivin and the downregulation of BMPR2. The fact that STAT3 inhibition by DHEA reverses all these abnormalities and the fact that DHEA can also restore miR-204 expression place DHEA as an ideal candidate therapy for PAH⁴⁷⁴.

4.3.4. DHEA and STAT3 inhibition decreases proliferation and resistance to mitochondria-dependent apoptosis in PAH-PASMCs.

In PAH, NFATc2 activation downregulates important K⁺ channels, like Kv1.5, leading to PASMC depolarization, increasing [Ca²⁺]_i and promoting PASMC proliferation²⁴⁰⁻²⁴². Using Fluo3-AM we measured the effects of STAT3 inhibition in PASMC. PAH-PASMC had greater [Ca²⁺]_i compared to control PASMCs. STAT3 inhibition by siRNA or DHEA in PAH-PASMCs decreases [Ca²⁺]_i to a similar level as in control-PASMCs (n=200; p<0.05), (Figure 4-2B). PAH-PASMCs had increased proliferation rates (increased % of PCNA positive cells) and STAT3 inhibition by siRNA and DHEA in PAH-PASMCs (10% FBS) decreases proliferation by 2.3-fold (Figure 4-2B).

The mitochondria transition pore is voltage-dependent⁴⁰⁶ and the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) depolarization is an index of the threshold for mitochondrial-dependent apoptosis. In this way, apoptosis is associated with decreased $\Delta\Psi_m$. Since STAT3⁴⁷⁵ and its downstream targets Pim1^{404, 405}, NFATc²⁴⁰⁻²⁴² and Survivin³⁰⁷ are implicated in ($\Delta\Psi_m$) regulation we measured $\Delta\Psi_m$ in PAH-PASMCs transfected with STAT3 siRNA, siSCR or treated with DHEA, using tetramethylrhodamine methyl-ester (TMRM). STAT3 inhibition by siRNA or DHEA treatment caused a significant $\Delta\Psi_m$ depolarization, compared to scrambled-treated PAH-PASMCs and PAH-PASMCs respectively (Figure 4-2B). These data confirmed the role of STAT3 in $\Delta\Psi_m$ regulation and in mitochondrial-dependant apoptosis. Apoptosis rates were studied using TUNEL assay. PAH-PASMCs appeared to be resistant to starvation (0.1% FBS) induced apoptosis (decreased % of TUNEL positive cells compared to control-PASMCs, Figure 4-2B). Similarly to STAT3 inhibition, DHEA in “starved” PAH-PASMCs increased apoptosis by 5-fold.

4.3.5. DHEA decreases IL6-dependent Src/STAT3 activation, downstream target expression, reduces proliferation and increases apoptosis in control PSMCs stimulated by IL-6.

Since IL-6 is one of the major STAT3 activator⁴⁷⁶ and plays a critical role in PAH^{273, 334, 477}, we studied DHEA effect on control-PSMCs stimulated by IL-6 (100µmol.L-1, 48h). DHEA decreases IL-6-dependant Src/STAT3 activation measured by western Blot, as it can be seen in PAH-PSMCs (Figure 4-3A). This result is confirmed by nuclear translocation assay, showing that DHEA reduces the percentage of cell presenting nuclear P-STAT3 (Figure 4-3A). Moreover, DHEA decrease expression of STAT3 downstream targets Pim1, NFATc2, BMPR2 and Survivin in control-PSMCs stimulated by Il-6 (Figure 4-3B). Finally, in this model, DHEA treatments were associated with decreased $[Ca^{2+}]_i$ and proliferation rates; $\Delta\Psi_m$ depolarization and increased apoptosis rates (Figure 4-3B).

Figure 4- 3: DHEA inhibits IL-6-dependent STAT3 activation.

A) DHEA decreases IL-6-dependant Src/STAT3 activation in control PSMCs.

Stat3 activation was studied in control-PSMCs, stimulated by IL-6 and treated with DHEA. Amount of STAT3 phosphorylated on tyrosine 705 is increased by IL-6 stimulation and reversed by DHEA treatment. This was confirmed by immunostaining, showing the nuclear localization of PY705-STAT3 after Il6 stimulation, which is reversed by DHEA. Src activation was evaluated by immunoblots with the ratio PY419-Src/c-Src, in control PSMCs stimulated by IL-6. DHEA decreased significantly IL-6-dependant Src activation in control PSMCs.

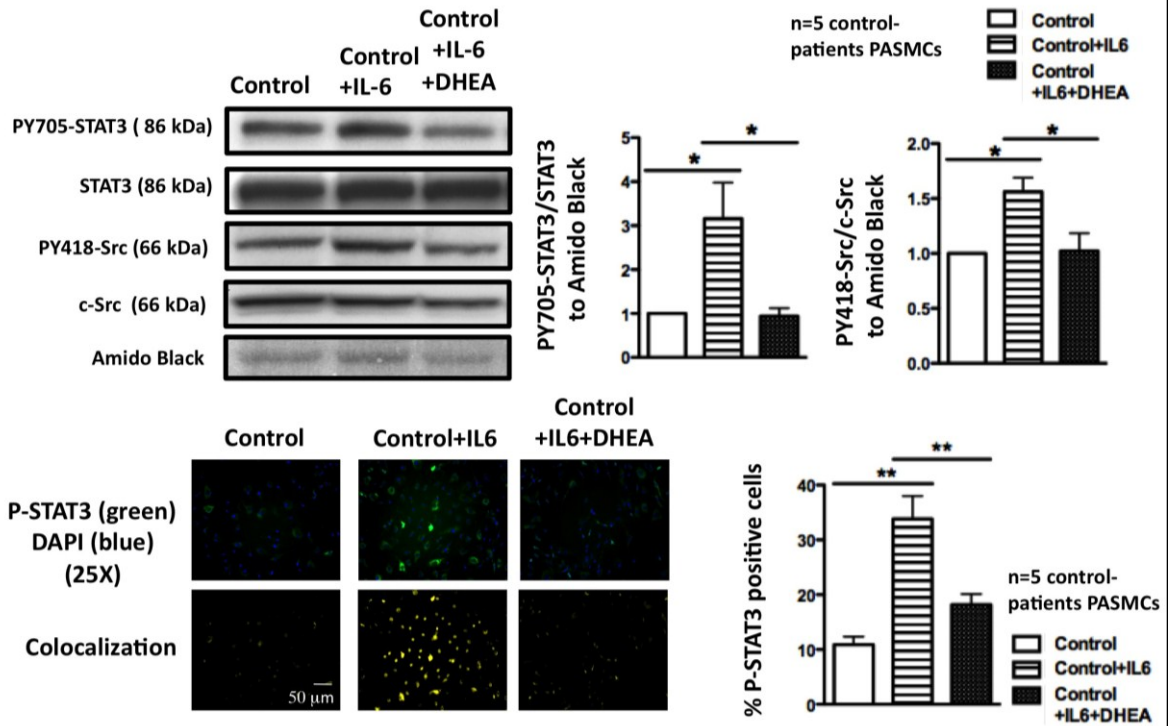
B) DHEA decreases IL-6-dependant STAT3 downstream targets expression.

Pim1, NFATc2, BMPR2 and Survivin mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized to 18S in PSMCs control stimulated by IL6.

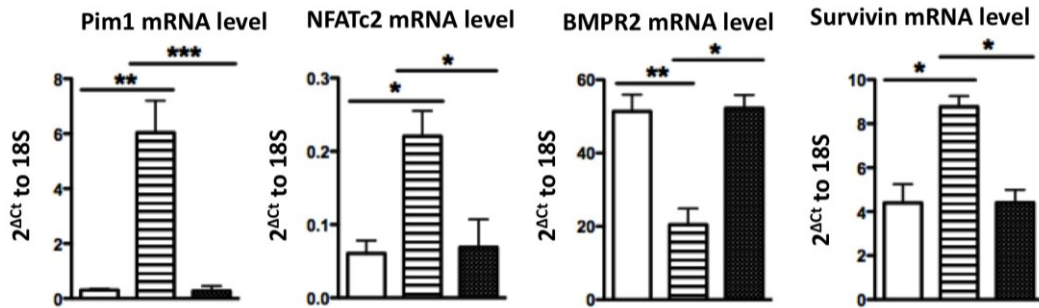
C) DHEA restores the proliferation/apoptosis balance

$[Ca^{2+}]_i$ concentrations and proliferation rates (% PCNA) as well as $\Delta\Psi_m$ hyperpolarization (TMRM) and decreases apoptosis (%TUNEL) were measured in healthy PSMCs stimulated with IL-6. (n=100 to 150 cells by experiment, in at least 3 experiments by cell line in 5 controls and 3 PAH-patients PSMCs, p<0.05). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

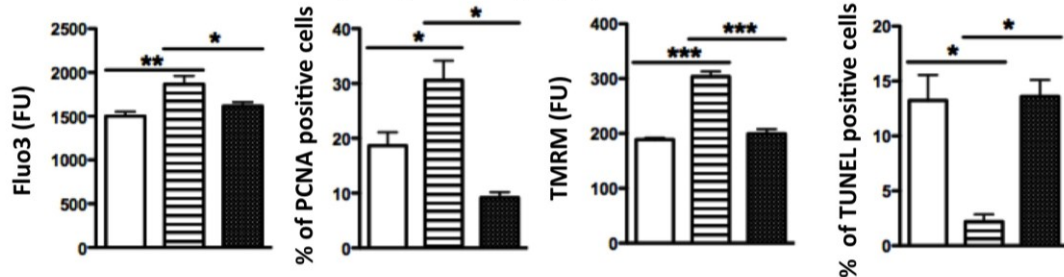
A *DHEA decreases IL6-dependant Src/STAT3 activation in control PSMCs*



B *DHEA decreases IL-6-dependant STAT3 downstream targets expression*



C *DHEA restores the proliferation/apoptosis balance*



4.3.6. DHEA and STAT3 inhibition reverses MCT-PAH.

To validate our *in vitro* findings, we performed *in vivo* studies using the monocrotaline rat model of PAH to determine whether DHEA reverses PAH through the inhibition of STAT3. Therapeutical interventions were assessed with DHEA as well as STAT3 silencer RNA.

Rats sc-injected with monocrotaline (MCT-PAH) (60mg.Kg^{-1}) and control rats were followed using non-invasive measurements (Doppler and Echocardiography) and exercise capacity on treadmill to evaluate disease development. After established-PAH (decreased PA acceleration time PAAT at day 18), treatments were started. Freshly prepared DHEA ($10\text{mg.Kg}^{-1}.\text{D}^{-1}$) was administered by gavage once a day and STAT3 siRNA (1nmol) was selectively delivered into the lung by intra-tracheal nebulization²⁴². MCT-PAH non-treated rats and nebulized scrambled siRNA rats were used as PAH control. We showed that DHEA and STAT3 inhibition decreases PA pressure, RV hypertrophy (RV/LVS) (Figure 4-4A), general cardiac functions (exercise capacity on treadmill) (Figure 4-4B) and PA wall remodeling (Figure 4-4C).

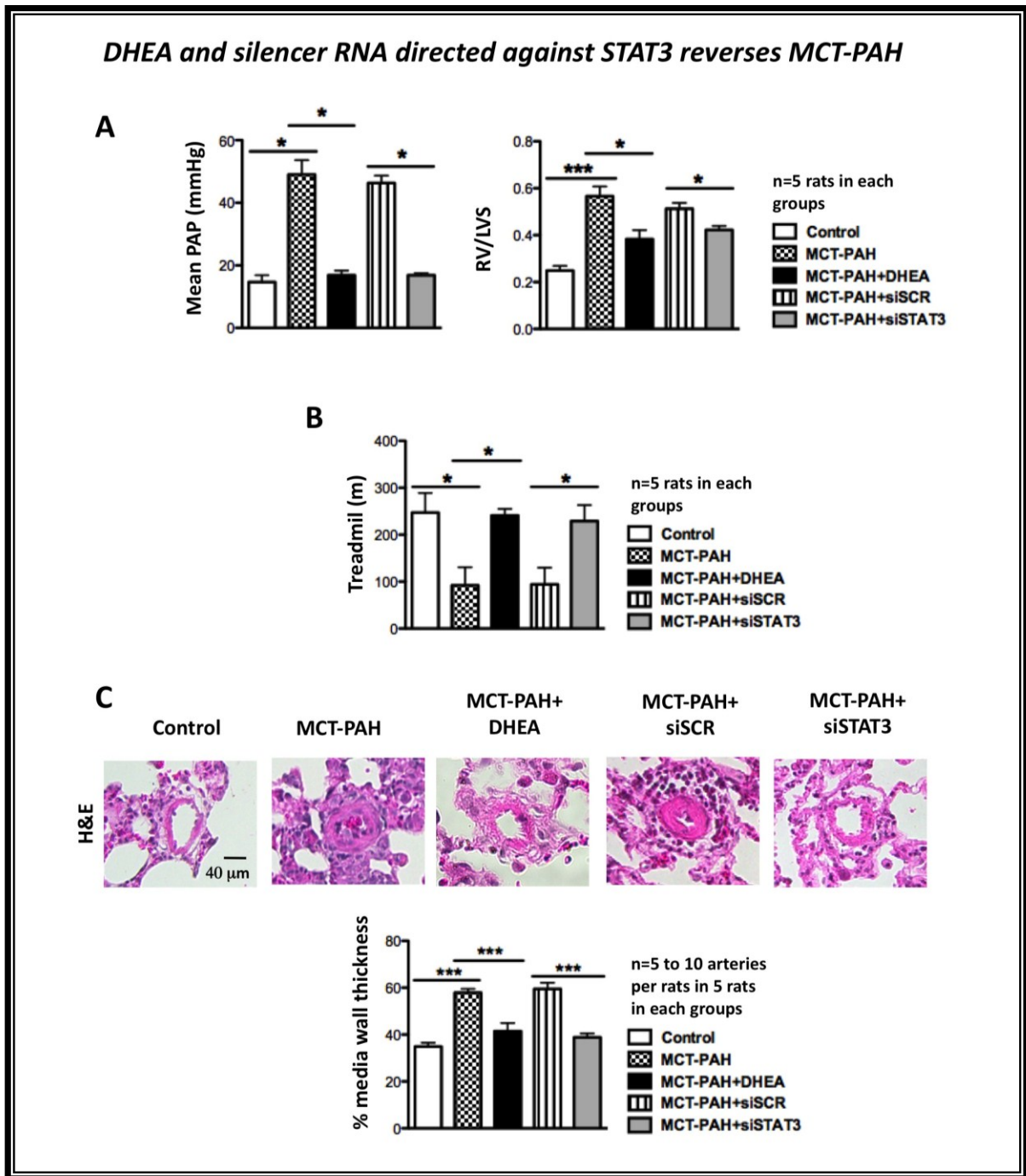


Figure 4- 4: DHEA and silencer RNA directed against STAT3 reverses MCT-PAH

DHEA ($10\text{mg}\cdot\text{Kg}^{-1}\cdot\text{D}^{-1}$) and STAT3 inhibition (1 nebulization of 1nmol) 18 days after MCT injection decreased **A**) mean PA pressure ($n=5$ rats/group), RV hypertrophy ($n=5$ rats/group), **B**) improved exercise capacity ($n=5$ rats/group) and **C**) diminished distal PA wall thickness ($n=5$ to 10 PA/rat with 5 rats/group). * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

These findings were associated with significant decrease in Src/STAT3 activation in lung (western Blot) (Figure 4-5A) and distal PA (decreased yellow staining) (Figure 4-5B) in rats treated with DHEA as those treated with siSTAT3. Since STAT3 transcriptional activity is decreased, STAT3 downstream targets expressions were studied. We showed that miR-204 expression is increased in lung of rats treated with DHEA and siSTAT3 (Figure 4-6A). Pim1 and NFATc2 mRNA levels are decreased in lungs, and NFATc2 activation is inhibited within distal PAs (Figure 4-6B&C). Survivin and BMPR2 mRNA levels are restored as well in lungs (Figure 4-6D&E).

To validate our therapeutical intervention, we studied proliferation and apoptosis rates within distal PAs. PSMCs proliferation (% PCNA and Ki67 positive cells) is inhibited by 50% within PAs in rats treated with DHEA and siSTAT3. Resistance to apoptosis is decreased as well, treatments increasing apoptosis in the vascular wall by 20% (% TUNEL positive cells) (Figure 4-7A).

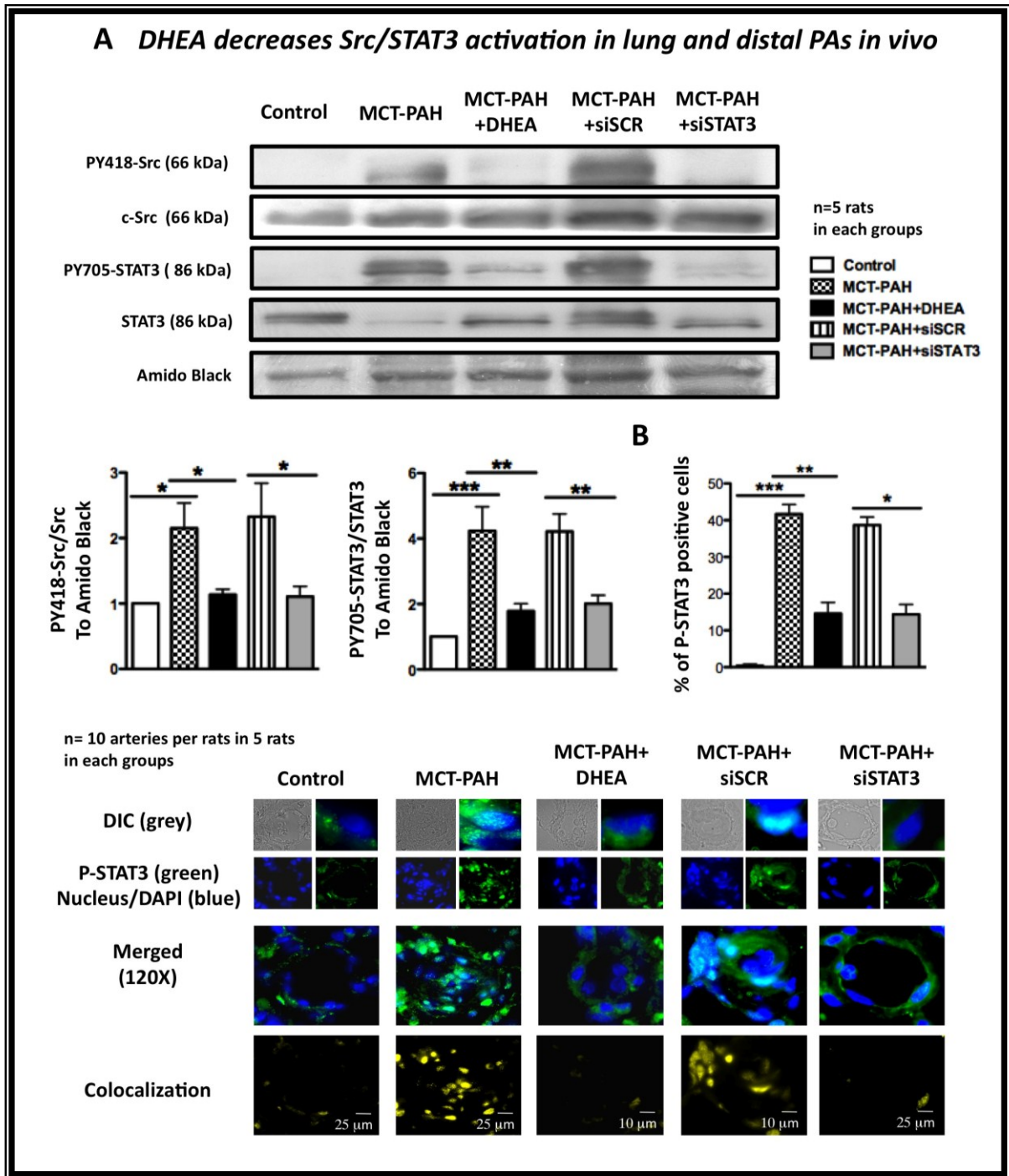


Figure 4- 5: DHEA decreases Src/STAT3 activation in lung and distal PA in vivo.

A) Src and STAT3 activation were evaluated by immunoblots performed in triplicate on rats lungs with the ratios PY419-Src/c-Src and PY705-STAT3/STAT3 normalized to Amido Black. As *in vitro*, DHEA effects *in vivo* were mediated by the inhibition of Src/STAT3 activation (n=5 rats in each group).

B) DHEA-dependent STAT3 inhibition was confirmed *in vivo* by nuclear translocation assay, showing a decrease in PY705-STAT3/nuclei colocalization (yellow) (n=5 to 10 arteries per rats in 5 rats in each group). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

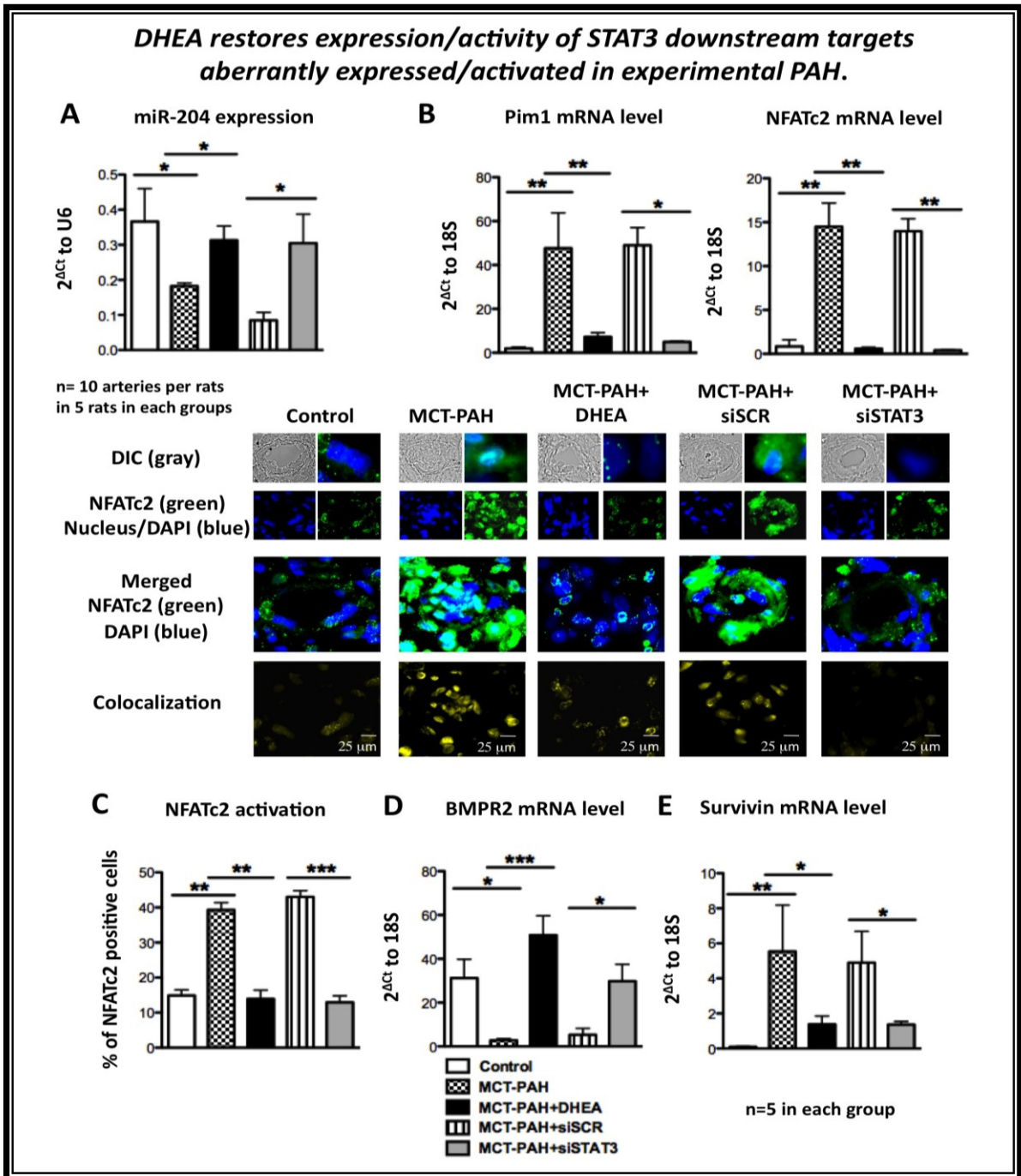


Figure 4- 6: DHEA restores expression/activity of STAT3 downstream targets aberrantly expressed/activated in experimental PAH.

A) miR-204 mRNA level was measured by qRT-PCR and normalized to U6 in distal PAs of rats in each group. Like STAT3 inhibition, DHEA enhances miR-204 expression (n=5 rats in each groups, p<0.005). Pim1, NFATc2 **B**), BMPR2 **D**) and Survivin **E**) mRNA levels were measured by qRT-PCR and normalized to 18S in distal PAs. Similarly to MCT-PAH siSTAT3 rats, DHEA treated rats have impaired STAT3 signal transduction to downstream targets, resulting in Pim1, NFATc2 and Survivin decreased mRNA level, and increased BMPR2 mRNA level. **C**) NFATc2 activation measured by nuclear translocation assay and expressed as the percentage of NFATc2 positive cells in distal PAs (<300mm) is decreased by DHEA treatment (n= 10 arteries per rats in 5 rats per groups, p<0.005). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

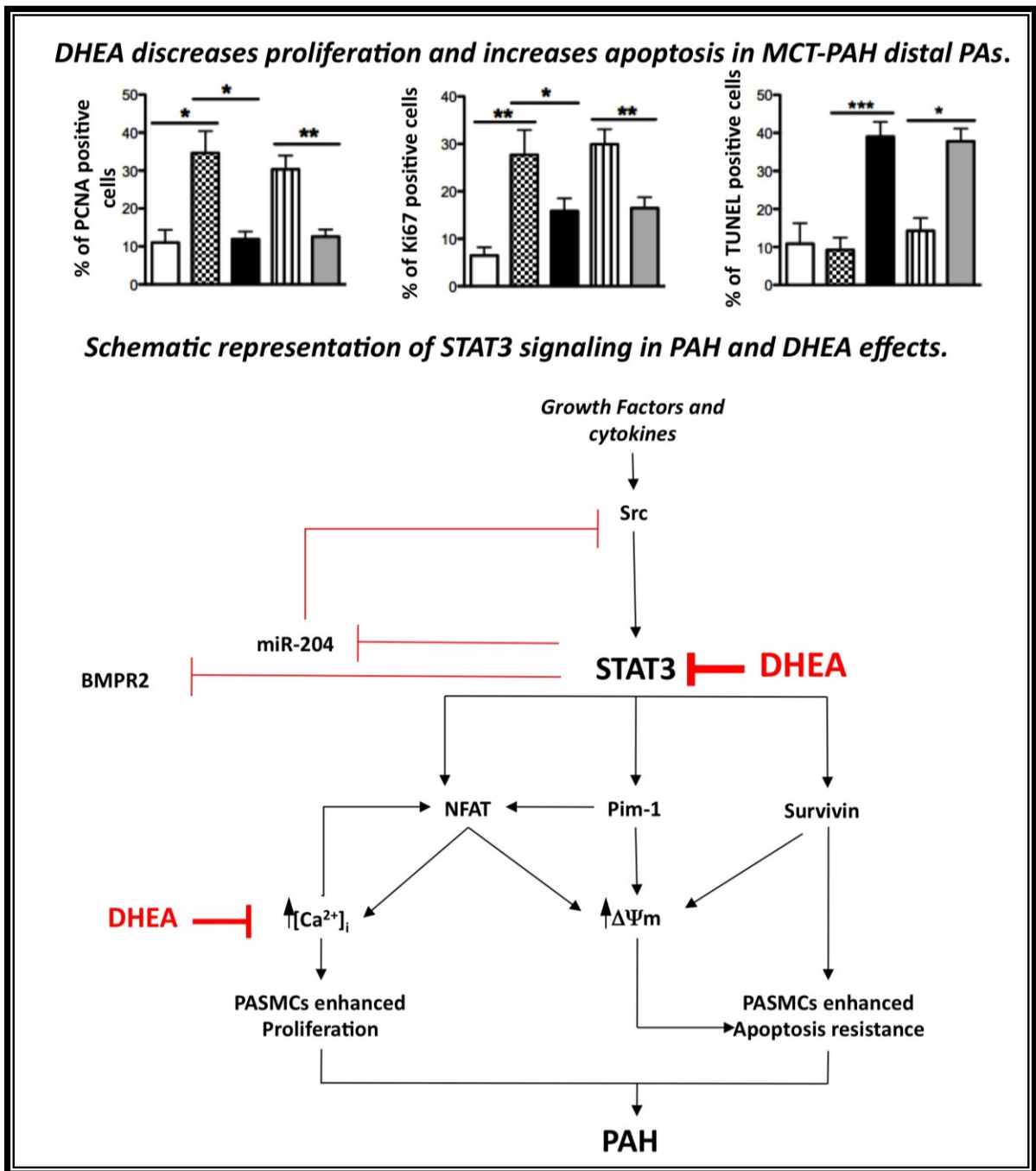


Figure 4- 7: DHEA decreases proliferation and increases apoptosis in MCT-PAH distal PAs.

Proliferation and apoptosis rates in distal PAs were measured by PCNA, Ki67 and TUNEL assays respectively in 5 to 10 arteries/rat in 5 rats/group $p < 0.05$).

Schematic representation of STAT3 signaling in PAH and DHEA effects.

Increased circulating growth factors, agonists and cytokines trigger STAT3 activation. DHEA, previously shown to decrease $[Ca^{2+}]_i$, by inhibiting STAT3 leads to 1) decreased NFATc2, Pim1 and Survivin expression 2) decreased $[Ca^{2+}]_i$ dependent PASMCS proliferation and enhancing mitochondrial-dependent apoptosis 3) enhanced BMPR2 and miR-204 levels leading to c-Src inhibition and disruption of the positive feedback loop sustaining STAT3 activated. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

4.4. DISCUSSION

Here we provide, for the first time, evidence showing that DHEA decreases the Src/STAT3 constitutive activation seen in PAH. We showed that DHEA act as pharmacological STAT3 inhibitor since their effects are similar to those obtains by molecular inhibition of STAT3 with siRNA. DHEA-dependant Src/STAT3 inhibition reverses PAH phenotype both *in vitro* and *in vivo*. Indeed, DHEA restores most of the molecular and cellular abnormalities seen in PAH-PASMCs, including decreased expression of the onco-proteins Pim1 and Survivin, decreased activation of NFATc2 and upregulation of BMPR2 and miR-204 (Figure 4-2A). All these findings contribute to the decrease in PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis seen in our human PASMC and to the decrease in distal PA remodeling seen in our *in vivo* model. These findings are supportive of our comprehensive mechanism proposed in Figure 4- 7.

These findings provide a better understanding of the mechanism by which DHEA reverses PAH. In the past, several groups including us have demonstrated the beneficial effects of DHEA in experimental model of PAH. Indeed, by opening BK_{Ca} DHEA can decrease⁴⁶²⁻⁴⁶⁴ [Ca²⁺]_i and vasodilating PASMCs. Since Src and STAT3 are known as K⁺ channels inhibitors/Ca²⁺ channel opener^{470, 478-481} their inhibition could explain how DHEA upregulates Kv and BKCa channels⁴⁶². Our present findings provide a comprehensive mechanism linking all the previous findings to the Src/STAT3 axis. Indeed, several studies have demonstrated the implication of the Src/STAT3 axis in the upregulation of the RhoA/ROCK pathway^{482, 483}, thus the Src/STAT3 axis inhibition by DHEA could be an explanation of how RhoA/ROCK are modulated by DHEA⁴⁸⁴. Although STAT3/Pim1 are recognized as the regulators for both NFATc2 expression and activation in PAH⁴³². Several new findings have proposed that RhoA/ROCK could also be implicated in NFATc activation in the vasculature^{485, 486}. Thus, whether the inhibition of RhoA⁴⁸⁴ by DHEA is independent of the Src/STAT3 axis, we propose it will affect similarly the NFAT pathway. Further studies are thus necessary for a better understanding of how DHEA affect RhoA.

Our findings are not restricted to the PASMC but could be extend to PAEC as well. Indeed, STAT3-induced proliferation and resistance to apoptosis in PAH is also present in proliferative PAH-endothelial cells (PAH-PAECs)^{487, 488} that constitute plexiform lesions.

Thus STAT3 inhibitory drugs like DHEA represent a putative ideal treatment for PAH (Figure 4-7B).

To this end we performed pre-clinical studies showing that indeed STAT3 inhibition reverses PAH in MCT induced PAH in rats. As in our human PAH-PASMC STAT3 inhibition was associated with decreased PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis. Although the MCT model has limitation, this model has largely contributed to the development of new therapeutics for PAH over the last decade. A variety of therapeutic strategies have been tested in MCT-based models, and were later shown to be effective in PAH patients; conversely, all clinically proven treatments also work in the MCT model. Nonetheless, the fact that STAT3 is activated in PAH-PAECs, it will be of a great clinical interest to determine whether or not STAT3 inhibition can reverse plexiform lesions. Thus, in a further study, we will measure the effects STAT3 inhibition in the Hypoxia/Sugen model of PAH, which has been recently described²²⁸.

Although we believe our findings are very promising, the translation to the clinic of STAT3 inhibition using nebulized STAT3 siRNA will be very challenging. Thus utilization of already clinically approved drug like DHEA is of a great interest. DHEA supplementation is an efficient way in reducing carotid stenosis in response to angioplasty²⁴¹. In fact we previously published that by inhibiting Akt DHEA increases glycogen synthase kinase 3 (GSK3) activation pushing NFAT out of the nucleus and thus limiting its transcriptional activity²⁴¹. We recently showed that Akt is not activated in PAH-PASMC⁴³² excluding the possibility that the present DHEA effects seen in PAH are Akt-mediated. Several studies have demonstrated the critical role of STAT3 in regulating Pim-1/NFAT axis in both cancer⁴⁰⁷ and cardiovascular diseases^{371, 404}, thus inhibition of STAT3 could account for DHEA effects seen in both our *in vitro* and *in vivo* models.

We provide evidence for the first time in vascular tissue that DHEA is an efficient STAT3 inhibitor confirming previous findings in the liver⁴⁶⁷. Compare to other drugs the fact that DHEA can disrupt the positive feedback loop involving miR-204 (which sustained Src/STAT3 activated independently of the activation of the tyrosine kinase receptor⁴³³) DHEA inhibitory effects on STAT3 is sustained over long period of time⁴⁷⁴, which is clinically appealing.

Limitations: Although we believe that our study provide for the first time evidence that DHEA is a good and efficient STAT3 inhibitor in human and rodent PASMC we have not elucidated the exact molecular mechanism by which DHEA decreases Src/STAT3 activation. This remain to be established and will constitute a further study. Nonetheless, we have evidence that DHEA effects in vascular tissue is likely mediated through a plasma membrane receptor coupled to G protein²⁴¹. Indeed, we previously showed in carotid smooth muscle cells that through a plasma membrane receptor DHEA could decrease NFAT activation and expression. As STAT3 regulates both expression and activation (through Pim-1) of NFAT, we believe that DHEA inhibitory effect on Src/STAT3 is also mediated by the plasma membrane DHEA receptor. Nonetheless, other mechanisms cannot be ruled out. For example, it has been demonstrated that activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR- γ), a member of the nuclear receptor family which is downregulated in PAH⁴⁸⁹, have an inhibitory effect on STAT3⁴⁹⁰⁻⁴⁹². A direct physical protein-protein interaction has been shown between PPAR- γ and activated STAT3, resulting in decreased transcriptional activity of STAT3. Moreover, treatment with PPAR- γ agonist ciglitazone in glioblastoma cell lines showed a decreased expression of phosphorylated form of STAT3 associated with an increased expression of STAT3 inhibitors like the Suppressor of cytokine signaling (SOCS) 3 and the protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3)⁴⁹³. As DHEA has been shown to increase PPAR- γ mRNA levels⁴⁹⁴, PPAR- γ could be implicated in the DHEA-dependant STAT3 inhibition. Considering that PPAR- γ agonists used in the treatment of PAH patients (rosiglitazone and pioglitazone) could be associated with adverse cardiovascular events⁴⁹⁵, DHEA could offers an alternative therapeutic approach. Although, the inhibitory effects of DHEA on the Src/STAT3 axis might link together all the previously published findings on DHEA in pulmonary hypertension other uncovered pathways might also be affected including FAK; Rac1 and others pathways implicated in cell migration which are also implicated in vascular lesion formation seen in pulmonary and are currently understudied. Finally, enlarging our findings to other pulmonary hypertension isoforms including PA secondary to COPD or left heart diseases could be beneficial to greater population.

4.5. CONCLUSION/PERSPECTIVES

In conclusion, our findings demonstrated for the first time that DHEA is an efficient inhibitor of the Src/STAT3 axis in humans PASMC. As described in our comprehensive schematic in Fig 7, we showed that in both humans and rodents this newly characterized effect of DHEA links together all the previously published findings on the therapeutic effects of DHEA seen in rodent pulmonary hypertension including K⁺ channels and RhoA/ROCK abnormalities. Moreover, we provide evidence for the first time in PAH that DHEA a non-toxic, safe and already available over the counter drugs can reverse vascular remodeling processes seen in PAH. Thus, with a single drug we could affect many features associated with pulmonary hypertension including vasoconstriction, and vascular remodeling. Moreover as Src/STAT3 are activated by many different signal including inflammation; growth factors; extracellular matrix; hypoxia (all of which can trigger pulmonary hypertension) we believe that DHEA might be efficient in many different PH isoforms, which is not the case of the presently used medicine.

This finding is of a great clinical interest as it offers us the perspective to enlarge the ongoing clinical trial NCT01273259 actually restricted to hypoxic pulmonary hypertension patients to PAH patients. Finally, our findings also offer new therapeutic perspective to clinician to treat diseases in which STAT3 is implicated including cancer.

4.6. ACKNOWLEDGMENT:

We want to thanks the “Société Québécoise d’Hypertension Artérielle” for scholarships attributed to JM and RP. Dr. Jacob was supported by CAPES (Brazilian Research Agency).

4.7. FUNDING SOURCES:/DISCLOSURES

This work was supported by the Heart and Stroke Foundation of Canada (HSFC), the Canadian Institute for Health Research (CIHR) and the Canadian Research Chair (CRC) to SB. No conflicts to disclose.

CHAPITRE 5 : DISCUSSION

5. Discussion

Durant ce doctorat j'ai pu mettre en évidence l'implication majeure de l'axe oncogénique Src/FAK/STAT3/Pim1 dans la pathogénèse de la PAH. Cet axe, activé de façon inappropriée, participe à l'apparition et au maintien de nombreuses dysfonctions caractéristiques de la PAH, comme une prolifération, une survie et une migration cellulaires excessives. J'ai pu démontrer qu'intervenir thérapeutiquement sur chacun des acteurs de cette voie abroge ces anomalies tant au niveau cellulaire que dans les modèles animaux expérimentaux. Quel que soit l'acteur de cette voie ciblé par l'intervention thérapeutique, les résultats sont équivalents avec une normalisation des taux de prolifération et de survie et une réversion de l'augmentation des pressions. Ceci suggère l'existence de nombreuses boucles de rétrocontrôle tout au long de la voie, permettant à chaque étape de maintenir le signal actif et de l'amplifier. Nous avons pu montrer par exemple que l'activation de Src/FAK est deux fois supérieure dans les PAH-PASMCs par rapport aux cellules contrôle, mais STAT3 semble être amplifié plus de 3 fois, tout comme l'expression de Pim1 et NFAT, résultant en une augmentation de la prolifération et la survie d'environ un facteur 4. Nous avons pu également démontrer la présence d'une boucle de rétrocontrôle impliquant le miRNA miR-204³⁴², régulé par STAT3 et maintenant sa propre activation via Src. Il est possible qu'une autre boucle implique également miR-17/92³³⁴, régulant BMPR2 en expression et ayant également une action sur l'activation de Src, néanmoins ce mécanisme reste à être démontré. De façon intéressante, choisir Pim1 comme cible thérapeutique, situé plus bas dans la voie, est également suffisant pour abroger la PAH. Nous pouvons donc nous demander quels avantages offrent chacun des acteurs de la voie en tant que cible thérapeutique.

5.1. Quels avantages peut-on trouver à cibler dans la voie un des acteurs plutôt qu'un autre ?

5.1.1. Avantages à cibler la plateforme signalétique SRC/FAK.

5.1.1.1. Activation très tôt dans la maladie.

Dans notre modèle animal de PAH, l'activation de Src apparaît très tôt, dès la première semaine après injection de monocrotaline³⁴², suggérant que Src/FAK joue un rôle prépondérant dans la transformation du phénotype des PSMCs. Intervenir thérapeutiquement sur Src ou FAK, suggère une action dans les phases précoces de la maladie, ce qui pourrait être d'un grand intérêt pour arrêter la progression de la maladie le plus tôt possible, lorsqu'elle est encore réversible (Figure 1- 8). Néanmoins, le diagnostic en général décèle la PAH par une augmentation des PAPs, autrement dit, le phénotype est malheureusement déjà bien installé.

5.1.1.2. Plateforme signalétique

Src/FAK apparaît comme une plateforme signalétique capable d'intégrer de nombreux signaux en amont, provenant de diverses sources, RTKs, GPCR, intégrines/ECM, cytosquelette, et de redistribuer ce signal de façon spécifique en aval sur diverses voies de signalisation comme STAT3, MAPK, PI3K, RhoA/ROCK. L'activation de cette plateforme dans la PAH pourrait expliquer, du moins en partie, pourquoi un certain nombre de thérapies actuelles pour la PAH, malgré qu'elles soient bénéfiques à court terme, ne permettent pas une amélioration à long terme de la survie des patients. En effet, ces interventions n'inhibent seulement qu'une partie du signal arrivant à Src/FAK. Aussi, cibler directement la plateforme Src/FAK pourrait avoir une action bien supérieure sur la survie et pourrait éviter l'utilisation de thérapies combinatoires.

5.1.1.3. Inhibiteurs disponibles en grands nombres

Durant les 25 dernières années, l'augmentation de l'expression/activation de Src a été décrite dans de nombreuses tumeurs, et particulièrement dans les cancers du sein et du colon^{496, 497}. L'intérêt de Src comme cible thérapeutique pour le cancer est maintenant considéré et des inhibiteurs de Src sont donc développés cliniquement avec engouement. Etant donné la forte homologie de séquence et de structure dans la forme active que partage les Src avec les autres PTKs que sont les Bcr/Abl (Breakpoint cluster region/Abelson virus

proteins), de nombreux inhibiteurs ATP compétitifs développés comme des inhibiteurs des Src, se sont avérés par la suite également puissants pour inhiber les Abl. L'Imatinib, en essai clinique pour la PAH, est d'ailleurs un inhibiteur des Abl. Le premier de ces doubles inhibiteurs qui a été développé est Dasatinib. Dasatinib, chimiquement sans relation avec Imatinib, est à peu près 325 fois plus puissant que Imatinib dans l'inhibition des Abl⁴⁹⁸, mais son activité reste préférentielle pour les Src. MAPK, Akt et STAT5 ont été montrés comme des voies de signalisation affectées par Dasatinib *in vitro*⁴⁹⁹. Après plusieurs études cellulaires et précliniques, Dasatinib a été testé sur des patients présentant différents stades de Leucémie Myéloïde Chronique (CML). A ce jour, plus de 45 essais cliniques en phases II et III pour l'utilisation de Dasatinib en monothérapie ou en combinaison dans le traitement de la CML sont en cours, ainsi que des phases cliniques I et II pour les traitements des lymphomes, tumeurs solides, glioblastomes, mélanomes, neuroblastomes, cancers de la prostate, du sein, du colon, du pancréas, du foie et du poumon. Dasatinib apparaît dans l'ensemble comme une drogue relativement bien tolérée. Étrangement, 4 patients traités avec Dasatinib pour une CML ont développé une PHT, qui s'est avérée totalement réversible par l'arrêt du traitement⁵⁰⁰⁻⁵⁰³. Malgré que ces cas représentent un faible pourcentage aux vues du nombre d'études en cours, ils apportent tout de même de nouvelles interrogations. Accéder à une meilleure connaissance de l'action exacte de ce composé pourrait aider à progresser dans la connaissance des voies de signalisation impliquées dans la PAH. D'autres molécules inhibitrices des Src ont été développées par la suite. Bosutinib est actuellement en phase clinique III pour le traitement de la CML et phase I/II pour de nombreux autres cancers à l'image de Dasatinib. Saracatinib est en phase clinique I/II pour des cancers du sein, de la prostate, du pancréas, de carcinomes des cellules squameuses. Aucun des ces deux autres composés n'a montré de cas de PHT, suggérant que cette réponse pourrait être unique à Dasatinib. Une étude *in vivo* sur un modèle de souris avec xénogreffe de cellules NSCLC (Non-small cell lung carcinoma), a montré que l'inhibition de Src par Dasatinib est associée à une augmentation compensatrice de la phosphorylation de STAT3 dépendante de JAK2⁵⁰⁴. Cette réponse pourrait expliquer les cas de PAH, chez des patients présentant peut-être une prédisposition. Saracatinib a été démontré comme inhibant Src activé de façon dépendante ou non de l'hypoxie et son action inhibitrice a été observée sur les voies de signalisation en aval impliquant FAK, paxilline et

STAT3^{505, 506}. Ce composé, du fait de son action sur FAK et STAT3, pourrait être très bien adapté pour le traitement de la PAH.

Beaucoup de données sur les inhibiteurs des Src sont disponibles à ce jour. Les cas de PHT suggèrent que ces composés demandent à être évalués très précautionneusement. Dasatinib est à proscrire dans le traitement de la PAH, néanmoins Saracatinib pourrait s'avérer intéressant. Des études précliniques devraient être très rapidement envisagées avec cette molécule.

LE SAVIEZ-VOUS

Src a été découvert en 1989 par J. Michael Bishop et Harold E. Varmus qui gagnèrent pour cette trouvaille le Prix Nobel de Physiologie ou Médecine. Ils identifièrent que le gène Src est très similaire au gène v-src du virus du Sarcome de Rous. Francis Peyton Rous fut en fait le premier à proposer que des virus pourraient être à l'origine du développement de cancers. Il prouva ses dires en 1911 et fut reconnu pour ses travaux en 1966 par le Prix Nobel. Src est donc à l'origine de 2 Prix Nobel !

Tout comme Src, FAK a émergé comme une cible thérapeutique pour lutter contre le cancer et des inhibiteurs de FAK ont été développés. Trois composés sont actuellement en phase clinique. PF-562271 est un inhibiteur compétitif pour l'ATP, inhibant spécifiquement FAK et son isoforme Pyk2 (Proline-rich tyrosine kinase 2) avec une sélectivité 100 fois supérieure par rapport aux autres kinases. Une phase I d'essai clinique a été menée sur 106 patients présentant des cancers squameux de la tête et du cou, du pancréas et de la prostate. Deux autres composés sont actuellement en phase I, GSK2256098 et PF-04554878, mais là encore, aucune donnée préliminaire n'est disponible. Ces composés sont encore jeunes et au début de leur développement pour la thérapie contre le cancer. Néanmoins, ils semblent présenter une très faible toxicité et être bien tolérés par les patients et pourraient s'avérer intéressant pour traiter la PAH.

5.1.2. Avantages de cibler STAT3

5.1.2.1. Diagnostic

STAT3 est activé dans de nombreux cancers^{507, 508} et corrèle assez souvent avec un faible taux de survie⁵⁰⁹⁻⁵¹². Une haute fréquence d'activation de STAT3 est observée dans les carcinomes des cellules rénales, notamment dans les cas métastatiques. Cette activation contribue au développement et à la progression de la maladie et apparaît comme un marqueur indépendant de pronostic⁵¹³. Néanmoins, l'utilisation de STAT3 comme biomarqueur requiert le plus souvent une biopsie, ce qui est faisable dans certains cancers mais pas vraiment applicable à la PAH. La force de STAT3 réside plutôt dans le fait que c'est un facteur de transcription.

5.1.2.2. Un facteur de transcription en puissance.

Un facteur de transcription joue un rôle critique de par sa présence à la jonction entre les voies de signalisation intracellulaires et la régulation des gènes qui vont déterminer la fonction cellulaire. Parce que STAT3 régule la transcription de gènes impliqués dans l'apoptose et le cycle cellulaire, un contrôle adéquat de son activité est critique pour éviter la transformation maligne des cellules. Néanmoins, dans de nombreux cas STAT3 présente la capacité d'entretenir sa propre activation. Ce phénomène est fréquent chez les TFs oncogéniques et fait souvent intervenir des miRNAs. La boucle de rétrocontrôle positif impliquant miR-204 que nous avons décrite n'est pas le premier exemple montrant que STAT3 agit sur Src. Il a notamment été démontré que STAT3 est requis pour la transformation des cellules dépendante de v-src⁵¹⁴⁻⁵¹⁶.

STAT3 semble de plus posséder un potentiel oncogénique intrinsèque, en absence d'évènements activateurs en amont⁵¹⁷. La construction génétique d'une molécule STAT3 constitutivement active, capable de dimérisation en absence de phosphorylation sur le résidu tyrosine, est capable de migrer vers le noyau, de lier le site de liaison et d'induire l'expression de gène, montrant que l'activation par phosphorylation n'est pas l'unique moyen d'induire une activité transcriptionnelle de STAT3. De plus, des fibroblastes exprimant cette construction se sont montrés capables de former des colonies sur agar mou, montrant la capacité de croissance sans adhérences, et d'induire des tumeurs chez la souris nude⁵¹⁷ montrant que cette activation constitutive de STAT3 permet l'induction d'un

programme de gènes suffisant pour la transformation et l'immortalisation en absence de signalisation en amont. De façon à continuer et affiner la comparaison entre les PAH-PASMCs et les cellules cancéreuses, il serait intéressant de voir le comportement des PAH-PASMCs sur agar mou. Puisqu'elles arborent une activation constitutive de STAT3, leur capacité de croissance sans adhérence à la matrice est peut être augmentée.

5.1.2.3. *Un facteur de transcription ? Pas seulement !*

De récentes données décrivent de possibles effets de STAT3 sur la génération mitochondriale d'énergie⁵¹⁸. La protéine mitochondriale GRIM-19 (Gene associated with retinoid interferon-induced mortality), un composant du complexe I de la ETC, est connue pour interagir avec STAT3 et inhiber son activité transcriptionnelle⁵¹⁹⁻⁵²². Cette interaction entre GRIM-19 et STAT3 est donc associée à une localisation mitochondriale de STAT3 et est nécessaire au bon fonctionnement de la ETC et à la production d'énergie par l'oxydation du glucose⁵¹⁸. Ce phénomène est indépendant du domaine de liaison de STAT3 à l'ADN, indépendant de la phosphorylation sur le résidu tyrosine 705 ou de la dimérisation de STAT3, mais dépendant de la phosphorylation sur le résidu serine 727.

De plus, dans de nombreuses tumeurs l'activation constitutive de STAT3 est associée à une augmentation de l'expression de STAT3 qui s'accumule alors sous une forme non phosphorylée U-STAT3 (unphosphorylated STAT3). U-STAT3 a été démontré comme capable de se lier à une forme non phosphorylée de NFκB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), U-NFκB (unphosphorylated NFκB) pour former un complexe s'accumulant dans le noyau et activant une sélection de gène⁵²³⁻⁵²⁵.

Ces découvertes étendent le spectre fonctionnel et biologique de STAT3 et montrent la portée que peut avoir la présence de l'activation de ce facteur de transcription dans la PAH.

LE SAVIEZ VOUS

STAT3 a d'abord été nommé APRF pour « Acute-phase response factor » en 1993, lorsque Wegenka et ses collègues observèrent son passage au noyau dans les minutes qui suivait une stimulation à l'IL-6 ou au LIF (Leukemia-inhibitory factor)⁵²⁶.

5.1.3. Avantage de cibler Pim1.

Pim1 apparaît plus tardivement dans la maladie mais son expression corrèle de façon importante avec l'augmentation des PVRs et des PAPs. Ceci suggère que Pim1 joue un rôle clé dans les processus de remodelage vasculaire et notamment dans la prolifération des PASMCs. Sa présence spécifique dans le réseau pulmonaire sous pression en fait une cible thérapeutique très intéressante, permettant d'entraîner uniquement l'apoptose des cellules malades sans toucher les cellules saines en place. De plus, son utilisation en temps que biomarqueur pourrait améliorer la détection de la maladie et la prédiction de la survie par rapport aux biomarqueurs actuellement utilisée.

5.1.3.1. Pim1 utilisé comme biomarqueur.

5.1.3.1.1. C'est le cas dans le cancer

Du fait de sa capacité d'auto-activation par autophosphorylation⁵²⁷, l'expression de Pim1 est le reflet direct de son activité kinase. Aussi, une expression détectable de Pim1 est directement associée à une activité serine/thréonine kinase sur ses différentes cibles, une augmentation de la prolifération, de la survie et de la tumorigénèse. Il n'est donc pas étonnant que l'activation inadéquate de Pim1 ait été associée dans de nombreux cancers, à un moyen de détection de la maladie, d'estimation de son agressivité et de prédiction du pronostic vital des patients⁵²⁸. L'expression de Pim1 a été identifiée dans les liposarcomes mixoïdes vs non mixoïdes, par immunofluorescence, avec une localisation spéciale et unique, soulignant les fines vacuoles lipidiques cytoplasmiques. Ces résultats montrent que Pim1 peut être utilisé comme marqueur de la différenciation tumorale adipocytaire. Pim1 pourrait également être une signature génomique (changement du nombre de copies, hétérozygotie, mutation (E135K)) permettant de diagnostiquer certains des cas les plus graves de leucémie myéloïde aiguë⁵²⁹. Pim1 a aussi été identifié comme biomarqueur dans les cancers colorectaux par la présence d'auto-anticorps dans les séra des patients⁵³⁰. Pim1 a été démontré comme étant un gène surexprimé dans les lymphomes des cellules du manteau (MCL) blastiques, cliniquement plus agressifs que les MCL normaux et présentant un taux mitotique très élevé^{531, 532}; et l'expression de Pim1 a été associée à un faible résultat vis à vis des traitements agressifs/chimiothérapeutiques⁵³³. Pim1 est surexprimé dans les lymphomes des cellules-B larges et diffuses vs les lymphomes des cellules-T périphériques et a été identifié comme un nouveau marqueur de ce groupe⁵³⁴. Pim1 joue un rôle

significatif dans le développement des cancers de la prostate et la détection de son expression peut aider pour le diagnostic, le traitement et le pronostic vital⁵³⁵. Pim1 a été montré comme surexprimé aux niveaux protéiques et des ARN messagers dans les adénocarcinomes ductaux pancréatiques⁵³⁶ par rapport aux tissus pancréatiques normaux. Les auteurs ont pu établir un système de grades par rapport à l'expression de Pim1 aux niveaux ARNm et protéiques, et ont évalué la relation entre l'expression de Pim1 et l'issue des patients.

5.1.3.1.2. L'expression de Pim1 dans la PAH corrèle avec les PAPs.

En accord avec les précédentes données publiées sur le cancer, montrant que l'expression de Pim1 corrèle fortement avec la sévérité de la maladie, nous avons pu déterminer que ceci est vrai également dans la PAH. En effet, le niveau d'expression de Pim1 mesurée dans la couche leucocytaire extraite du sang d'une trentaine de patients corrèle avec les valeurs de PAP et de RVP relevées au moment du prélèvement. Ceci est d'une grande importance car aucun biomarqueur utilisé aujourd'hui n'est capable de prédire l'atteinte pulmonaire du patient. Un tel biomarqueur pourrait éviter ou espacer les mesures invasives de PAP par cathétérisme droit et renseigner sur l'évolution de la maladie par simple prélèvement sanguin.

La détection de l'expression de Pim1 sur nos patients PAH a été mesurée dans la couche leucocytaire. Cette technique présente certaines limites du fait de la dégradation rapide des ARNs et de la faible quantité de matériel que donne la couche leucocytaire. Ceci exige donc un prélèvement, un stockage et une conservation adéquate des échantillons. Cette technique exige également une étape d'extraction d'ARN, une étape de transcription inverse en ADN complémentaire puis une mesure par PCR quantitative en temps réel. Une standardisation des procédures devra alors être établie pour chaque étape. Aussi, la présence de Pim1 en tant que molécule circulante, plus stable et mesurable dans le serum par un simple test ELISA serait bien plus avantageuse pour le diagnostic.

5.1.3.1.3. Auto-anticorps de Pim1.

Les auto-anticorps sont des anticorps dirigés contre des éléments de l'organisme qui les a fabriqués. Certains de ces auto-anticorps sont plus fréquemment retrouvés dans les maladies auto-immunes mais également dans des pathologies telles que le cancer. La sclérodermie, qui est associée à une PAH dans 10 à 15% des cas, est une maladie auto-immune. La présence d'auto-anticorps associées à la sclérodermie a été bien décrite et la présence d'une PAH est plus fréquente chez les patients possédant des anticorps anti-centromères⁵³⁷. En 2005, Tamby et al. ont décrit la présence d'auto-anticorps capables de réagir avec différentes structures des cellules endothéliales dans la PAH idiopathique, suggérant l'implication de l'immunité humorale dans la PAH²⁶⁸. L'existence d'auto-anticorps spécifiques est possible et ouvre de nouveaux horizons pour le diagnostic précoce de la PAH. Nous pensons que Pim1 est un candidat intéressant du fait de sa spécificité et de sa présence en tant qu'auto-anticorps dans le cancer.

5.1.3.2. Boucles de rétrocontrôle positif de Pim1 sur l'axe Src/FAK/STAT3 ?

En considérant le fait que l'inhibition de Pim1 dans la PAH est équivalente à une inhibition de STAT3, Src ou FAK, alors que c'est un acteur ayant un rôle plus bas dans la voie de signalisation, nous pensons que Pim1 pourrait être aussi à l'origine d'un rétrocontrôle positif sur l'axe Src/FAK/STAT3. Il a été récemment montré dans la lignée de cellules de cancer de la prostate DU-145 et pancréatique MiaPaCa2, exprimant une activation constitutive de STAT3, qu'une inhibition de Pim3 est associée à une diminution de PY705-STAT3⁵³⁸. Les auteurs ont montré que ce résultat n'est pas obtenu avec l'inhibition de Pim1 ou Pim2, ce qui est en accord avec le fait que nous n'ayons pas trouvé de diminution de PY705-STAT3 dans les souris Pim1 KO-MCTP ou HYP. Néanmoins, il est possible que Pim1 intervienne uniquement sur la propriété de transcription de STAT3, en inhibant par exemple un cofacteur.

De façon surprenante, Pim3 a été observé dans des cellules endothéliales de veine ombilicale HUVECs (umbilical vein endothelial cells), concentrée au niveau des formations lamellipodiales et colocalisant avec FAK⁵³⁹. De plus, l'inhibition de Pim3 par interférence à l'ARN diminue très significativement la migration, et la formation de structures tubulaires sur Matrigels. Ceci montre que la famille de protéine Pim présente un

large panel de fonctions et confirme qu'une inhibition de cette famille est associée à de nombreuses répercussions sur les fonctions cellulaires.

5.2. Potentielle implication de cofacteurs clés.

5.2.1. SOCS and PIAS

Dans le chapitre 4, nous avons émis l'hypothèse que la DHEA pourrait inhiber l'axe Src/STAT3 par une augmentation des inhibiteurs des STATs comme les SOCS et les PIAS3⁴⁹³.

Les PIAS ont effectivement été découverts pour leur potentiel d'inhibition des STATs⁵⁴⁰, plus tard ils ont été découverts comme étant à la fois des coactivateurs et des corépresseurs de la transcription, pouvant réguler l'activité de nombreux TFs. Il a été montré que PIAS3 active la réponse transcriptionnelle des SMAD au TGF- β ⁵⁴¹, faisant de PIAS un autre lien entre la signalisation SMAD et STAT3. Les PIAS sont aussi des protéines ligases des fonctions SUMO (Small ubiquitin-like modifier). La SUMOylation peut modifier l'activité d'un important nombre de protéines, principalement nucléaires⁵⁴². PIAS3 est connu pour catalyser la SUMOylation de différents facteurs de transcription, qui sont généralement en relation avec PIAS3 aussi par des mécanismes indépendants de la SUMOylation^{543, 544}. Les PIAS sont capables de réprimer l'activité transcriptionnelle de p53 et c-jun par SUMOylation⁵⁴⁴. PIAS1 est impliqué dans la régulation de FAK, manœuvrant une SUMOylation du résidu Lysine 152, qui est conservé entre les espèces. Par contre, cette SUMOylation semble augmenter dramatiquement les capacités d'autophosphorylation de FAK⁵⁴⁵ suggérant que PIAS1 et 3 auraient des fonctions bien distinctes et contraires sur une même voie de signalisation. Néanmoins, la famille de protéine PIAS pourrait avoir un rôle important dans la pathogénèse de la PAH puisqu'elle est capable de réguler un certain nombre de voies qui sont dysfonctionnelles dans la PAH.

Au moment de leur découverte, les SOCS ont été décrites comme des protéines ayant un mécanisme important pour la régulation négative de la voie de signalisation cytokine/JAK/STAT. SOCS1 et 3 sont classiquement exprimées suite à l'activation de leur transcription par les STATs et agissent par une boucle de rétrocontrôle négatif en inhibant les JAKs pour contrôler la longueur du signal⁵⁴⁶. Ensuite, les études ayant invalidé le gène chez la souris ont révélé des rôles additionnels aux SOCS, notamment dans les processus

immunologiques. Outre inhiber STAT3, SOCS1 et SOCS3 sont capable de lier FAK dans sa forme PY397 et d'inhiber son activité kinase in vitro. SOCS1 et 3 facilitent la polyubiquinylation de FAK et donc sa dégradation⁵⁴⁷.

5.2.2. MDM2/p53

Comme décrit dans l'introduction, p53 est une protéine suppresseur de tumeur décrite depuis peu comme ayant un rôle protecteur dans la PAH. p53 est un facteur de transcription dont la fonction est altérée dans 50% des cancers. Il est contrôlé par MDM2⁵⁴⁸, qui lie p53 et régule négativement son activité transcriptionnelle et sa stabilité^{549, 550}, notamment par ubiquinylation. De nombreuses tumeurs surexpriment MDM2 de manière à endommager la fonction suppresseur de tumeur de p53. De façon intéressante, Pim1 a été décrit comme un puissant régulateur de MDM2⁵⁵¹ en entraînant la phosphorylation de MDM2 sur les sérines 166 et 186. La fonction exacte associée à la phosphorylation de ces sites demeurent incertaine et plusieurs effets ont été reportés incluant la localisation nucléaire de MDM2, sa stabilisation, une augmentation de l'ubiquinylation et de la dégradation de p53, une diminution de l'association entre MDM2 et son inhibiteur ARF ou encore une augmentation de l'interaction entre MDM2 et p300⁵⁵²⁻⁵⁵⁹. Pim1 pourrait donc être impliqué dans la régulation négative de p53 dans la PAH. Comme précisé dans la discussion du chapitre 3, FAK entretient une relation étroite avec p53. Les deux protéines peuvent interagir à la fois dans le cytoplasme et le noyau. D'une part, p53 est capable d'inhiber FAK par action sur son promoteur et d'autre part FAK est capable d'inhiber l'activité transcriptionnelle de p53. De plus il a été démontré que FAK est capable d'inactiver p53 de manière indépendante de sa fonction kinase, via son domaine FERM, qui agirait comme une protéine d'échafaudage pour l'ubiquitinylation de p53 dépendante de MDM2⁴⁵⁵⁻⁴⁵⁷. Cette régulation de p53 par FAK fait intervenir la translocation de FAK au noyau, mais pas forcément sa SUMOylation (qui est un signal de localisation nucléaire pour FAK). FAK pourrait donc promouvoir la prolifération, à la fois d'une façon dépendante et indépendante de sa fonction kinase⁵⁶⁰.

5.2.3. CBP/p300.

Nous avons vu en introduction que Hif-1 α communique avec le suppresseur de tumeur p53. Une de ces communications réside dans le coactivateur CBP/p300 qui est nécessaire à HIF-1 α ⁵⁶¹⁻⁵⁶³ et p53⁵⁶⁴ pour initier leurs transcriptions respectives. Il est récemment suggéré que p53 et Hif-1 α soient en compétition pour la liaison à CBP/p300 et qu'en hypoxie, Hif-1 α soit le partenaire préférentiel de CBP/p300, inactivant de ce fait l'activité transcriptionnelle de p53⁵⁶⁵. Il a été également démontré qu'une activation hypoxique de Src est associée à une subséquente coopération de Hif-1 α et STAT3 avec CBP/p300 sur le promoteur du VEGF, et amenant à une transcription maximale du messenger VEGF⁵⁶⁶. De plus NFAT a aussi été décrit comme un interactant de CBP/p300^{567, 568}, suggérant que beaucoup de facteurs de transcription activés dans la PAH pourraient contribuer, de par leur fixation à son coactivateur CBP/p300, à une diminution de l'activité transcriptionnelle de p53 et à une aggravation de la pathologie.

5.3. Finalement, quelle différence il y a t'il entre une cellule cancéreuse et une PAH-PASMC ?

5.3.1. Les contraintes mécaniques :

L'augmentation des pressions dans la circulation pulmonaire crée une sur-distension des vaisseaux, appelée étirement cyclique (cyclic stretch), ainsi qu'une augmentation des forces de friction exercées par le flux sanguin contre la paroi vasculaire, appelées contraintes de cisaillement (shear stress). Ces contraintes mécaniques, appliquées de façon chroniques, sont perçues comme un signal de stress par le mur vasculaire. Les membranes cellulaires, les sites d'attachement des cellules et le cytosquelette sont directement touchés et servent de mécanosenseurs⁵⁶⁹. Ce signal est transmis à des mécanorécepteurs, tels que les cadhérines et les intégrines, qui vont activer de nombreuses voies de signalisations permettant l'adaptation et le remodelage du cytosquelette par prolifération, synthèse de collagène et fibronectine et qui contribuent à l'épaississement du mur vasculaire^{452, 453}. L'activation de FAK semble être dépendante justement d'une augmentation chronique de stress d'étirement. L'axe intégrines/FAK/Src a été montré comme activé par une augmentation de 30mmHg des pressions dans les vaisseaux systémiques (150mmHg)⁴⁵⁴. L'augmentation des pressions pourrait donc également intervenir dans le maintien de l'activation de FAK dans la PAH. L'implication de STAT3 dans les voies de signalisation

intervenant dans la réponse des VSMCs à l'étirement cyclique a été démontrée sur des SMCs embryonniques A7r5 dérivée d'aortes thoraciques de rats soumises à un stress (60 cycles/min d'aspiration entraînant une pression de 150mmHg avec 0.5s d'élongation alternées avec 0.5s de relaxation, pendant 2 heures)⁵⁷⁰. Ce mécanisme d'activation de STAT3 a été montré comme indépendant de JAK2, dépendant de Src pour la PY705-STAT3 et dépendant de p38/MAPK et ERK pour la phosphorylation de STAT3 sur le résidu Serine 727 (reflet de la pleine activité de STAT3). Très récemment, Pim1 a été décrit également comme possiblement activé par les contraintes de cisaillement sur un modèle de cellules souches mésenchymateuses⁵⁷¹. L'expression maximale de Pim1 a été décrite sous une contrainte de cisaillement de 30 dynes/cm et des inhibiteurs de p38/MAPK et ERK sont capables d'atténuer cette expression de Pim1.

5.3.2. Contraction et homéostasie calcique.

Les intégrines, en tant que mécanosenseurs, intègrent les signaux de stress et sont importantes dans le contrôle de la réponse à ce stress^{572, 573}. Les canaux potassiques et calciques jouent aussi un rôle capital dans cette réponse puisqu'ils interviennent dans la contraction et le tonus vasculaire nécessaire à la réponse. De nombreux travaux décrivent qu'il existe une régulation des canaux VOC de type L et des BKCa par les signaux provenant des intégrines⁵⁷⁴⁻⁵⁷⁷. Les GPCRs sont également à l'origine de cascades de signalisation contrôlant l'ouverture des canaux calciques et potassiques et un rôle de mécanorecepteurs a également été décrit dans les neutrophiles⁵⁷⁸. Comme Src et FAK sont tous deux capables d'intégrer les signaux provenant des intégrines et GPCRs, il n'est pas étonnant de trouver ces deux acteurs à l'origine des voies de signalisation régulant l'expression et l'ouverture de canaux potassiques ou calciques. En 1998, Hu et al. démontraient que l'axe Src/FAK régule l'ouverture des VOCs de type L ainsi qu'une association directe entre Src et le canal calcique⁴⁸¹ dans des SMC de lapin.

5.4. Quel rôle joue cette voie dans l'hypertrophie cardiaque.

Le stress mécanique produit par l'augmentation des pressions joue également un rôle majeur dans l'hypertrophie cardiaque et la réponse à l'augmentation de post-charge. De nouveau, les intégrines et la voie Src/FAK sont les initiateurs de la réponse hypertrophique.

5.4.1. Le rôle de Src/FAK dans l'hypertrophie cardiaque.

FAK est fortement exprimée dans les cardiomyocytes avec un niveau basal d'activité faible. FAK est activée par des stimulus mécaniques⁵⁷⁹⁻⁵⁸¹ ou des agonistes comme ET-1 et Ang-II^{582, 583}. Une étude menée sur le rat injecté à la monocrotaline a montré une augmentation de la phosphorylation de FAK dans le RV hypertrophié en comparaison des contrôles⁵⁸⁴. De façon intéressante, dans les cardiomyocytes sujet à un stress mécanique prolongé, FAK est également transloquée au noyau⁵⁸⁵⁻⁵⁸⁷. Le rôle de FAK dans le noyau des cardiomyocytes est encore peu clair mais est suspecté de jouer un rôle dans la régulation de la structure chromatinienne, la transcription, la maturation des mRNA et l'export nucléaire⁵⁸⁶. Ceci pourrait avoir un lien avec le rôle de FAK dans la régulation de p53 décrite précédemment dans les cellules non cardiaques, néanmoins les mécanismes restent à être éclaircis. Les modèles présentant une perte de fonction de FAK ont permis de montrer que FAK est requis pour la réponse hypertrophique du cœur mais qu'il n'est pas nécessaire à la maintenance basale de l'architecture du myocarde⁵⁸⁸⁻⁵⁹⁰. Néanmoins, FAK a un rôle important au niveau développemental, puisque son invalidation est associée à des défauts ventriculaires et notamment une défaillance ventriculaire droite⁵⁹¹.

Etant donné le rôle important du métabolisme mitochondrial dans la PAH et l'hypertrophie du RV, il est intéressant de noter que l'activation de FAK dans les cardiomyocytes en réponse à un stress mécanique a été associée à une biogénèse mitochondriale⁵⁹². Dans le contexte du métabolisme énergétique, l'inhibition de FAK a été associée à une réduction des niveaux d'ATP produits, ce qui n'est pas tout à fait en accord avec notre pensée qui suggère qu'une inhibition de FAK restore le fonctionnement mitochondrial et donc augmenterait la production d'ATP par reprise de l'oxydation du glucose. Néanmoins, trop peu de résultats sur ce point sont disponibles à ce jour pour tirer les conclusions adéquates.

Src a été décrite à plusieurs reprises aux côtés de FAK^{591, 593} au niveau des points focaux et comme recevant également le signal transmis par les intégrines suite à un stress mécanique. Néanmoins le plus souvent l'activation de Src a été associée à une activation des MAPK^{594, 595} et très peu associée à une activation subséquente de STAT3⁵⁹⁶.

5.4.2. Rôle de STAT3

De nombreuses évidences montrent que STAT3 joue un rôle prépondérant dans l'hypertrophie cardiaque en réponse à de nombreux stimuli comme l'augmentation des pressions, infarctus, ischémie, cytokines et neurohormones.

Tout d'abord, des souris présentant une surexpression de STAT3, spécifiquement au niveau des cardiomyocytes, développent spontanément une hypertrophie ventriculaire⁵⁹⁷ suggérant que STAT3 est importante pour la croissance des cardiomyocytes. L'effet cardioprotecteur de STAT3 a été associé à une augmentation de la transcription d'enzymes antioxydantes comme SOD-2, et à l'induction de protéines anti-apoptotiques et cytoprotectrices comme Bcl-xL and Hsp70⁵⁹⁸⁻⁶⁰¹. Les cardiomyocytes sont d'ailleurs plus résistants à une apoptose induite par H₂O₂ quand l'expression de STAT3 est élevée⁶⁰².

STAT3 intervient également dans la réponse aux stress mécaniques^{595, 603}. Dans un modèle de cœur de félin soumis à une augmentation des pressions, STAT3 a été montré comme activée dès 48h, de façon en partie dépendante de Src⁵⁹⁶.

5.4.3. Rôle de Pim1

Pim1 joue un rôle capital dans la croissance des cardiomyocytes. Par contre, Pim1 semble principalement activée dans le cœur par la voie Akt⁴⁰⁴, alors que l'implication de STAT3 dans l'activation de Pim1 dans le cœur n'a pas vraiment été étudiée.

Pim1 est exprimée dans les cardiomyocytes à la naissance et son expression décroît dans les semaines qui suivent⁴⁰⁴. L'induction de Pim1 est retrouvée dans le cœur adulte pathologique, avec une persistance de Pim1 dans les myocytes aux abords par exemple d'un infarctus. La surexpression spécifique de Pim1 dans le cœur a été montrée comme hautement protectrice en réponse à un infarctus, alors qu'une délétion de Pim1 rend les souris plus sensibles à un infarctus malgré une augmentation compensatrice significative de l'expression et l'activation d'Akt.

Pim1 serait responsable, en plus de ses rôles habituels, d'engendrer une réponse cardioprotectrice via les mitochondries. L'absence de Pim1 dans le myocarde entraîne une diminution des protéines mitochondriales protectrices après un infarctus. L'absence de

Pim1 dans les myocytes est associée à une dysfonction du pompage calcique et à la relaxation des sarcomères du fait d'une diminution des pompes SERCA de type 2a⁴⁰⁴.

5.5. Quel rôle joue cette voie dans l'endothélium ?

STAT3 est le seul acteur de notre voie qui a été identifié également dans les PAECs. Dans le rat MCT-PAH, la détérioration progressive de la membrane des cellules endothéliales est associée à une réduction de l'expression de la caveolin-1 et une activation réciproque de PY705-STAT3^{604, 605}.

Pim1 est impliquée dans la différenciation de nombreuses lignées cellulaires dont les cellules endothéliales. En effet, il a été démontré que la différenciation des cellules souches cardiaques Sca-1⁺ en cellules endothéliales (ECs) après induction par LIF fait intervenir une augmentation de l'expression de Pim1 dépendante de STAT3. Dans les Sca-1⁺ déficientes en STAT3 LIF n'est pas capable d'induire Pim1 et de provoquer la différenciation en EC⁶⁰⁶.

Dans les HUVECs, par des expériences avec interférence à l'ARN il a été montré que Pim1 est requise pour la migration et la prolifération induite par le VEGF-A³⁹⁸.

5.6. Interventions thérapeutiques, quel est le futur ?

5.6.1. Cibler le poumon.

La PAH est une pathologie spécifiquement pulmonaire, aussi intervenir directement sur cet organe ouvert à l'environnement extérieur par les voies aériennes semble être un bon concept pour appliquer une intervention thérapeutique spécifique. L'inhalation de médication est-elle le futur des traitements de la PAH ?

5.6.1.1. Le poumon particulièrement perméable aux macromolécules.

Pour des raisons qui ne sont pas encore bien comprises, le poumon fournit une meilleure biodisponibilité des macromolécules injectées que n'importe quelle autre porte d'entrée, que ce soit sous cutanée, intraveineuse, intrapéritoneale⁶⁰⁷. Par exemple, dans le traitement du diabète, l'insuline est connue pour être absorbée par le poumon avec une cinétique plus avantageuse que par injection sous cutanée⁶⁰⁸. De même, les résultats obtenus par inhalation d'Iloprost chez les patients PAH en comparaison des injections

intraveineuses pratiquées précédemment, ont été attribués au fait que la spécificité de l'action thérapeutique est supérieure en ciblant directement le poumon, mais l'obtention de tels résultats est peut être dû au fait que l'absorption est facilitée dans le poumon^{197, 609, 610}. Nous pouvons donc spéculer que de plus en plus d'interventions thérapeutiques dans la PAH vont se faire par inhalation. Le fait que l'absorption de la molécule soit augmentée dans le poumon pourrait permettre de diminuer les doses utilisées. L'inhalation évite aussi la douleur au niveau des sites de multiples injections. Cette douleur serait par contre remplacée par une toux liée aux multiples inhalations¹⁹⁷. Finalement, cette absorption favorisée des macromolécules par le poumon a amené à la conceptualisation d'un nouveau mécanisme selon lequel délivrer une médication par le poumon serait la meilleure façon d'atteindre la circulation systémique, avec une incroyable rapidité d'action et sans altération de la molécule⁶¹¹. Il est donc peut être à considérer que cibler spécifiquement le poumon sans toucher la circulation systémique n'est pas réalisable d'un point de vue technique. La molécule injectée doit alors être dotée de cette spécificité.

5.6.1.2. La thérapie génique

La thérapie génique apparaît comme un traitement incroyable permettant d'éviter la non-spécificité des peptides inhibiteurs, agonistes, antagonistes ou autres molécules, ayant un impact beaucoup plus important sur la signalisation globale de la cellule et étant de ce fait associés à de nombreux effets secondaires indésirables. Même si il est souvent admis que les défis à relever pour délivrer des oligonucléotides dans le poumon sont les mêmes que ceux pour délivrer des macromolécules, en pratique, cela semble bien différent. L'utilisation de la thérapie génique par inhalation en clinique met du temps à voir le jour alors que l'inhalation des macromolécules est utilisée depuis 40ans (corticostéroïdes dans le traitement de l'asthme). Durant les 20 dernières années, de nombreux essais précliniques et cliniques ont été réalisés pour diverses pathologies thoraciques (fibrose kystique, cancer) et des leçons doivent être tirées de ceci pour une éventuelle application en PAH.

Les premiers essais avec des adénovirus et des vecteurs associés à des adénovirus sont apparus inefficaces et accompagnés d'une réponse immunitaire indésirable et d'une certaine toxicité cellulaire⁶¹². Des constructions ingénieuses comme des adénovirus couplés à des antibiotiques ou des "helper dependent adenovirus" dans lesquels la séquence pro-inflammatoire du virus est manquante permettent de diminuer la réponse inflammatoire liée

à la thérapie. Les transferts avec des constructions non virales sont généralement moins efficaces mais le développement des nanotechnologies permet l'apparition de nouvelles constructions : les liposomes et les nanomicelles semblent causer moins de réponse immune de la part des poumons⁶¹³. Des formulations comme le polyéthylèneimine (PEI 25KDa, Sigma), le lipide cationique 67 (GL67A, Genzyme corporation), ou les nanoparticules d'ADN (Copernicus) ont permis d'augmenter l'efficacité et la durée d'expression du transgène⁶¹⁴.

5.6.2. Cellules souches

L'augmentation des connaissances et de la compréhension des mécanismes impliquant les cellules souches laisse la communauté scientifique espérer pouvoir appliquer cette technologie dans le traitement de la PAH. Une thérapie génique avec des EPC autologues programmées pour surexprimer la eNOS est déjà en essai clinique pour la PAH. Les cellules progénitrices endothéliales EPCs (endothelial progenitors cells) apparaissent être de très bons candidats, mais les cellules souches mésenchymateuses MSCs (mesenchymal stem cells) sont également très prometteuses du fait qu'elles sont multipotentes et qu'elles ont tendance à s'accumuler *in vivo* aux niveaux de sites où il y a blessure et inflammation^{615, 616}. La compréhension des mécanismes de différenciation des SMC devient stratégiquement intéressante pour l'utilisation de ces MSCs dans le traitement des pathologies vasculaires comme l'athérosclérose, l'infarctus ou la PAH.

5.6.3. Les patients traités par des thérapies inhibant les kinases peuvent-ils développer des résistances comme les patients traités pour le cancer?

Des études autant *in vitro* que cliniques ont montré que des cellules cancéreuses traitées avec des inhibiteurs des tyrosines kinases tendent à développer des mécanismes de résistance en acquérant des modifications génétiques qui leur permettent de compenser l'inhibition. Ces modifications sont communément des mutations, des délétions ou des amplifications génomiques. Les cellules cancéreuses sont des cellules qui se divisent rapidement, l'apparition de mutations est un phénomène commun. Des mutations qui entraînent une diminution de l'affinité du récepteur pour la drogue, augmentant l'affinité de la kinase pour l'ATP et ainsi diminuant l'efficacité de l'inhibiteur qui est compétitif pour l'ATP, sont des exemples de mutations qui peuvent entraîner une résistance au traitement. Proposer une intervention thérapeutique pour la PAH avec des inhibiteurs des tyrosines

kinases conduit donc à se demander si de tels phénomènes de résistances pourraient être observés au niveau des PSMCs. Même si les PSMCs ont, comme il est montré ici, un phénotype cancéreux, elles n'ont pas le même pouvoir réplicatif et mutagène que les cellules cancéreuses. Il se pourrait donc que ce phénomène de résistance soit propre au cancer. Ceci devrait être envisagé dans les études à venir, vérifié *in vitro* et *in vivo*, et les patients actuellement traités avec Imatinib, devraient également faire l'objet d'un suivi pour voir si il y a ou non apparition de mécanismes de résistance.

CHAPITRE 6
CONCLUSION ET PERSPECTIVES

6. Conclusion/perspectives

6.1. Conclusion

La PAH est une maladie grave et fatale. Même si les cas de PAH idiopathiques sont rares, les PAH secondaires apparaissent comme souvent non réversibles et les thérapies utilisées dans les PAH de groupe I sont souvent bénéfiques. Aucune thérapie actuelle n'est capable d'améliorer la survie de plus de 5 ans et il est capital de progresser à ce niveau.

Au cours de ce doctorat j'ai pu mettre en évidence l'implication de l'axe oncogénique Src/FAK/STAT3/Pim1 et démontrer son importance en tant que plateforme signalétique, recevant de nombreux signaux en amont, et redistribuant ce signal en aval pour la transformation du phénotype des PSMCs en phénotype « pseudo malin », prolifératif, résistant à l'apoptose et invasif.

De plus j'ai pu montrer que l'expression de Pim1 corrèle à l'augmentation des PVRs. Cette protéine pourrait donc être utilisée comme biomarqueur pour estimer l'état du remodelage de la circulation pulmonaire, une variable qui n'est que peu accessible par les techniques de diagnostic actuelles.

Pour terminer, d'un point de vue thérapeutique, j'ai pu démontrer que la DHEA a une action bénéfique dans la PAH par une inhibition de STAT3. Son utilisation en phase clinique sur des patients atteints de COPD pourrait être étendue aux patients avec PAH. De plus, du fait de la disponibilité et de l'engouement actuel pour les molécules inhibitrices de Src et FAK, j'ai pu suggérer que leur utilisation dans la PAH soit bientôt considérée.

Ces travaux ouvrent de nouvelles opportunités d'investigation fondamentales et cliniques et sont donc accompagnés d'un certain nombre de perspectives.

6.2. Perspectives

6.2.1. Essais précliniques

6.2.1.1. Inhibiteurs de FAK.

La molécule PF-576228 est la mère des composés inhibiteurs de FAK développés par Pfizer aujourd'hui. Cette molécule a une spécificité d'action sur FAK 100 fois supérieure par rapport aux autres kinases. Une étude préclinique est actuellement en cours

dans notre laboratoire avec cette molécule. Nous espérons pouvoir convaincre de la nécessité de considérer les inhibiteurs de FAK avec intérêt pour le traitement de la PAH.

6.2.1.2. Inhibiteurs de Pim1

Suite à la publication des travaux relatés dans le chapitre 2, une collaboration avec une société pharmaceutique a été établie pour la mise en place de tests précliniques avec des molécules inhibitrices de Pim1. Trois composés sont actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire.

6.2.2. Etude a grande échelle de Pim1 comme biomarqueur dans la PHT

Une meilleure prise en charge des patients au niveau du diagnostic est indispensable aujourd'hui pour pouvoir classifier rapidement la PHT et appliquer les traitements adéquats. Un biomarqueur non invasif capable de discriminer la présence ou non d'une augmentation des PVR et de prédire la réponse aux thérapeutiques est d'un grand intérêt. Aux vues de nos travaux, Pim1 présente un haut potentiel. Nous avons donc mis en place une étude à grande échelle de Pim1 en tant que Biomarqueur en collaboration avec le Dr. Provencher et le Pr. Pibarot de l'Institut Universitaire en Cardiologie et Pneumologie de L'Hôpital Laval à Québec.

Une première cohorte de 120 patients suspectés de PAH et suivis par cathétérisme droit tous les 6 mois, va être recrutée dans les 4 ans qui viennent. Au moment de la cathétérisme, un prélèvement sanguin sera effectué et les niveaux de Pim1 seront mesurés et mis en parallèle avec les données hémodynamiques, les résultats d'échocardiographie, les résultats du 6MWT et même comparés aux niveaux des biomarqueurs utilisés actuellement.

Une seconde cohorte sera composée de patients PAH participant à une étude clinique multicentrique et placebo comparant les effets d'une monothérapie ambrisentan ou taladafil a une bithérapie combinatoire. Environ 352 patients seront enrôlés.



Anorexigènes : groupe de médicaments qui diminuent l'appétit, la plupart d'entre eux appartiennent à la famille des amphétamines.	30
Asplénie : absence de rate, par anomalie congénitale ou ablation chirurgicale Le dysfonctionnement est appelée également asplénie fonctionnelle. Cette affection s'observe essentiellement au cours de la drépanocytose.	30
Bêta-thalassémies : hémoglobinopathies caractérisée par une absence de la synthèse de la chaîne β de l'hémoglobine, touchant chaque année 200 000 enfants à la naissance, faisant d'elles la maladie génétique la plus courante au monde.	30
Connectivite : <i>groupe d'affections auto-immunes systémiques rares affectant le tissu conjonctif de l'organisme</i>	29
Drépanocytose : maladie héréditaire qui se caractérise par l'altération de l'hémoglobine.	30
Lupus systémique érythémateux : maladie auto-immune déclenchant des processus inflammatoires toxiques à différents niveaux : peau, articulations.	29
Sclérodermie : maladie auto-immune qui, dans sa forme localisée, provoque des anomalies de la peau. Sous forme généralisée dite systémique, elle attaque de nombreux organes et notamment le cœur, les poumons et le rein au niveau vasculaire.	29
Sphérocytoses héréditaires : caractérisées par une anomalie des protéines constituant la membrane des globules rouges qui deviennent sphériques et fragiles.	30
Syndromes myélodysplasiques : maladies de la moelle osseuse ou affections clonales myéloïdes des cellules souches hématopoïétiques. Les trois lignées cellulaires sanguines (globules rouges, globules blancs et plaquettes) présentent un trouble de différenciation qui aboutit à une production insuffisante d'une, deux ou des trois sortes de cellules.	30
Télangiectasie hémorragique héréditaire : trouble génétique inné affectant les petits vaisseaux sanguins. En créant des connexions directes entre veines et artères.	30
Thrombocytose : augmentation du nombre des plaquettes sanguines > 450 Giga/l.	30
Angiogenèse : processus décrivant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. C'est un processus physiologique normal, que l'on retrouve notamment lors du développement embryonnaire. Mais c'est aussi un processus pathologique, primordial dans la croissance des tumeurs malignes et le développement des métastases.	33
Fibrose pulmonaire idiopathique (IPF) : pneumopathie provoquant des lésions fibrotiques du parenchyme pulmonaire amenant a une destruction et d'une rétraction du poumon. Le volume pulmonaire est par conséquent nettement réduit chez les patients atteints, résultant en un essoufflement à l'effort. Le pronostic vital est de 3–4 ans.	31
Hypercapnie : phénomène qui survient lorsque la pression partielle de CO ₂ dans le sang artériel (PaCO ₂) normalement voisine de 5,3 kPa \pm 0.5 (40 mmHg \pm 4) devient trop importante ; on parle alors de surcharge du sang artériel en CO ₂	31
Hyperplasie : terme médical désignant une augmentation de volume d'un tissu ou d'un organe due à une augmentation du nombre de ses cellules.	31
Ischémie : diminution de l'apport sanguin artériel à un organe. Cette diminution entraîne essentiellement une baisse de l'oxygénation des tissus de l'organe en dessous de ses besoins (hypoxie), et la perturbation, voire l'arrêt de sa fonction.	34

REFERENCES

1. West JB, Jones NL. Effects of changes in topographical distribution of lung blood flow on gas exchange. *J Appl Physiol*. 1965;20(5):825-835.
2. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008;586(Pt 21):5047-5061.
3. Owens GK. Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation and phenotypic plasticity. *Novartis Found Symp*. 2007;283:174-191; discussion 191-173, 238-141.
4. Somlyo AV, Somlyo AP. Intracellular signaling in vascular smooth muscle. *Adv Exp Med Biol*. 1993;346:31-38.
5. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;98(1):10-23.
6. Tsien RW, Ellinor PT, Horne WA. Molecular diversity of voltage-dependent Ca²⁺ channels. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12(9):349-354.
7. van Breemen C, Saida K. Cellular mechanisms regulating [Ca²⁺]_i smooth muscle. *Annu Rev Physiol*. 1989;51:315-329.
8. Yuan XJ. Voltage-gated K⁺ currents regulate resting membrane potential and [Ca²⁺]_i in pulmonary arterial myocytes. *Circ Res*. 1995;77(2):370-378.
9. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol*. 1995;268(4 Pt 1):C799-822.
10. Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(1):28-38.
11. Korovkina VP, England SK. Molecular diversity of vascular potassium channel isoforms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2002;29(4):317-323.
12. Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda)*. 2006;21:69-78.
13. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004;286(6):L1228-1236.
14. Large WA. Receptor-operated Ca²⁺(+)-permeable nonselective cation channels in vascular smooth muscle: a physiologic perspective. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2002;13(5):493-501.
15. Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol*. 1990;259(1 Pt 1):C3-18.
16. Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev*. 1997;77(4):901-930.
17. Albert AP, Large WA. Store-operated Ca²⁺-permeable non-selective cation channels in smooth muscle cells. *Cell Calcium*. 2003;33(5-6):345-356.
18. Bryan NS, Rassaf T, Maloney RE, Rodriguez CM, Saijo F, Rodriguez JR, Feelisch M. Cellular targets and mechanisms of nitros(yl)ation: an insight into their nature and kinetics in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(12):4308-4313.
19. Hidalgo C, Donoso P. Crosstalk between calcium and redox signaling: from molecular mechanisms to health implications. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(7):1275-1312.
20. Touyz RM. Reactive oxygen species as mediators of calcium signaling by angiotensin II: implications in vascular physiology and pathophysiology. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7(9-10):1302-1314.
21. Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M, Narumiya S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature*. 1997;389(6654):990-994.
22. Carafoli E, Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol*. 1994;25(3):312-324.
23. Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem*. 1992;267(20):14483-14489.
24. Carvajal JA, Germain AM, Huidobro-Toro JP, Weiner CP. Molecular mechanism of cGMP-mediated smooth muscle relaxation. *J Cell Physiol*. 2000;184(3):409-420.
25. Surks HK. cGMP-dependent protein kinase I and smooth muscle relaxation: a tale of two isoforms. *Circ Res*. 2007;101(11):1078-1080.

26. Tewari K, Simard JM. Sodium nitroprusside and cGMP decrease Ca²⁺ channel availability in basilar artery smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 1997;433(3):304-311.
27. Rashatwar SS, Cornwell TL, Lincoln TM. Effects of 8-bromo-cGMP on Ca²⁺ levels in vascular smooth muscle cells: possible regulation of Ca²⁺-ATPase by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(16):5685-5689.
28. Cornwell TL, Pryzwansky KB, Wyatt TA, Lincoln TM. Regulation of sarcoplasmic reticulum protein phosphorylation by localized cyclic GMP-dependent protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol.* 1991;40(6):923-931.
29. Komalavilas P, Lincoln TM. Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem.* 1996;271(36):21933-21938.
30. Lincoln TM, Cornwell TL. Intracellular cyclic GMP receptor proteins. *FASEB J.* 1993;7(2):328-338.
31. Abdel-Latif AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001;226(3):153-163.
32. Schlossmann J, Ammendola A, Ashman K, Zong X, Huber A, Neubauer G, Wang GX, Allescher HD, Korth M, Wilm M, Hofmann F, Ruth P. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature.* 2000;404(6774):197-201.
33. Surks HK, Mochizuki N, Kasai Y, Georgescu SP, Tang KM, Ito M, Lincoln TM, Mendelsohn ME. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science.* 1999;286(5444):1583-1587.
34. Kumar R, Cartledge WA, Lincoln TM, Pandey KN. Expression of guanylyl cyclase-A/atrial natriuretic peptide receptor blocks the activation of protein kinase C in vascular smooth muscle cells. Role of cGMP and cGMP-dependent protein kinase. *Hypertension.* 1997;29(1 Pt 2):414-421.
35. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 2003;93(4):280-291.
36. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2004;351(14):1425-1436.
37. Yanagisawa M, Masaki T. Molecular biology and biochemistry of the endothelins. *Trends Pharmacol Sci.* 1989;10(9):374-378.
38. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyachi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86(8):2863-2867.
39. Yoshizumi M, Kurihara H, Morita T, Yamashita T, Oh-hashii Y, Sugiyama T, Takaku F, Yanagisawa M, Masaki T, Yazaki Y. Interleukin 1 increases the production of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;166(1):324-329.
40. Yanagisawa M, Inoue A, Ishikawa T, Kasuya Y, Kimura S, Kumagaye S, Nakajima K, Watanabe TX, Sakakibara S, Goto K, et al. Primary structure, synthesis, and biological activity of rat endothelin, an endothelium-derived vasoconstrictor peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1988;85(18):6964-6967.
41. Boulanger C, Luscher TF. Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest.* 1990;85(2):587-590.
42. Prins BA, Hu RM, Nazario B, Pedram A, Frank HJ, Weber MA, Levin ER. Prostaglandin E2 and prostacyclin inhibit the production and secretion of endothelin from cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1994;269(16):11938-11944.
43. Stewart DJ, Langleben D, Cernacek P, Cianflone K. Endothelin release is inhibited by coculture of endothelial cells with cells of vascular media. *Am J Physiol.* 1990;259(6 Pt 2):H1928-1932.
44. Cade C, Ilozue CV, Rubanyi GM, Botelho LH. Smooth muscle cells contain a factor responsible for decreasing big endothelin and endothelin-1 produced by cultured endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991;17 Suppl 7:S71-75.
45. Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature.* 1990;348(6303):730-732.
46. Sakurai T, Yanagisawa M, Takuwa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature.* 1990;348(6303):732-735.

47. Wallnofer A, Weir S, Ruegg U, Cauvin C. The mechanism of action of endothelin-1 as compared with other agonists in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989;13 Suppl 5:S23-31; discussion S45.
48. Pollock DM, Keith TL, Highsmith RF. Endothelin receptors and calcium signaling. *FASEB J.* 1995;9(12):1196-1204.
49. Ohlstein EH, Arleth A, Bryan H, Elliott JD, Sung CP. The selective endothelin ETA receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1-mediated mitogenesis. *Eur J Pharmacol.* 1992;225(4):347-350.
50. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332(6163):411-415.
51. Hirata Y, Emori T, Eguchi S, Kanno K, Imai T, Ohta K, Marumo F. Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells. *J Clin Invest.* 1993;91(4):1367-1373.
52. Schiffrin EL. Role of endothelin-1 in hypertension and vascular disease. *Am J Hypertens.* 2001;14(6 Pt 2):83S-89S.
53. Goto K, Hama H, Kasuya Y. Molecular pharmacology and pathophysiological significance of endothelin. *Jpn J Pharmacol.* 1996;72(4):261-290.
54. McMurdo L, Thiernemann C, Vane JR. The endothelin ETB receptor agonist, IRL 1620, causes vasodilatation and inhibits ex vivo platelet aggregation in the anaesthetised rabbit. *Eur J Pharmacol.* 1994;259(1):51-55.
55. Needleman P, Moncada S, Bunting S, Vane JR, Hamberg M, Samuelsson B. Identification of an enzyme in platelet microsomes which generates thromboxane A2 from prostaglandin endoperoxides. *Nature.* 1976;261(5561):558-560.
56. Raz A, Isakson PC, Minkes MS, Needleman P. Characterization of a novel metabolic pathway of arachidonate in coronary arteries which generates a potent endogenous coronary vasodilator. *J Biol Chem.* 1977;252(3):1123-1126.
57. Bunting S, Gryglewski R, Moncada S, Vane JR. Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins.* 1976;12(6):897-913.
58. Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature.* 1976;263(5579):663-665.
59. Armstrong JM, Chapple D, Dusting GJ, Hughes R, Moncada S, Vane JR. Cardiovascular actions of prostacyclin (PGI₂) in chloralose anaesthetized dogs [proceedings]. *Br J Pharmacol.* 1977;61(1):136P.
60. Pinelis V, Markov C. Effects of prostacyclin on the hemodynamics of the rat. In *Advances in Prostaglandin and Thromboxane Research.* Edited by Samuelsson, B. Ramwell, PW. and Paoletti, R. Raven Press, New York. 1980;7:691-693.
61. Davis K, Grinsburg R, Bristow MR, Harrison DC. Biphasic action of prostacyclin in the human coronary artery. *Clin. Res.* 1980;28.
62. Pomerantz K, Sintetos A, Ramwell P. The effect of prostacyclin on the human umbilical artery. *Prostaglandins.* 1978;15(6):1035-1044.
63. Virdis A, Colucci R, Versari D, Ghisu N, Fornai M, Antonioli L, Duranti E, Daghini E, Giannarelli C, Blandizzi C, Taddei S, Del Tacca M. Atorvastatin prevents endothelial dysfunction in mesenteric arteries from spontaneously hypertensive rats: role of cyclooxygenase 2-derived contracting prostanoids. *Hypertension.* 2009;53(6):1008-1016.
64. Wise H, Jones RL. Focus on prostacyclin and its novel mimetics. *Trends Pharmacol Sci.* 1996;17(1):17-21.
65. Bos CL, Richel DJ, Ritsema T, Peppelenbosch MP, Versteeg HH. Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(7):1187-1205.
66. Hata AN, Breyer RM. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol Ther.* 2004;103(2):147-166.
67. Raymond JR, Mukhin YV, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys TW, Grewal JS, Garnovskaya MN. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther.* 2001;92(2-3):179-212.

68. Keegan A, Morecroft I, Smillie D, Hicks MN, MacLean MR. Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res*. 2001;89(12):1231-1239.
69. Konigshoff M, Dumitrascu R, Udalov S, Amarie OV, Reiter R, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Eickelberg O. Increased expression of 5-hydroxytryptamine_{2A/B} receptors in idiopathic pulmonary fibrosis: a rationale for therapeutic intervention. *Thorax*. 2010;65(11):949-955.
70. Launay JM, Herve P, Peoc'h K, Tournois C, Callebert J, Nebigil CG, Etienne N, Drouet L, Humbert M, Simonneau G, Maroteaux L. Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med*. 2002;8(10):1129-1135.
71. Porvasnik SL, Germain S, Embury J, Gannon KS, Jacques V, Murray J, Byrne BJ, Shacham S, Al-Mousily F. PRX-08066, a novel 5-hydroxytryptamine receptor 2B antagonist, reduces monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricular hypertrophy in rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2011;334(2):364-372.
72. Ullmer C, Schmuck K, Kalkman HO, Lubbert H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Lett*. 1995;370(3):215-221.
73. Lee SL, Wang WW, Lanzillo JJ, Fanburg BL. Regulation of serotonin-induced DNA synthesis of bovine pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1994;266(1 Pt 1):L53-60.
74. Eddahibi S, Fabre V, Boni C, Martres MP, Raffestin B, Hamon M, Adnot S. Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res*. 1999;84(3):329-336.
75. Barnes PJ, Liu SF. Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacol Rev*. 1995;47(1):87-131.
76. Hyman AL, Lipton HL, Kadowitz PJ. Analysis of pulmonary vascular responses in cats to sympathetic nerve stimulation under elevated tone conditions. Evidence that neuronally released norepinephrine acts on alpha 1-, alpha 2-, and beta 2-adrenoceptors. *Circ Res*. 1990;67(4):862-870.
77. Begonha R, Moura D, Guimaraes S. Vascular beta-adrenoceptor-mediated relaxation and the tone of the tissue in canine arteries. *J Pharm Pharmacol*. 1995;47(6):510-513.
78. Hyman SA, Smith DW, England R, Naukam R, Berman ML. Pulmonary artery catheter introducers: do the component parts affect flow rate? *Anesth Analg*. 1991;73(5):573-575.
79. el-Kashef H, Catravas JD. The nature of muscarinic receptor subtypes mediating pulmonary vasoconstriction in the rabbit. *Pulm Pharmacol*. 1991;4(1):8-19.
80. el-Kashef HA, Hofman WF, Ehrhart IC, Catravas JD. Multiple muscarinic receptor subtypes in the canine pulmonary circulation. *J Appl Physiol*. 1991;71(5):2032-2043.
81. McCormack DG, Mak JC, Minette P, Barnes PJ. Muscarinic receptor subtypes mediating vasodilation in the pulmonary artery. *Eur J Pharmacol*. 1988;158(3):293-297.
82. Inoue T, Kannan MS. Nonadrenergic and noncholinergic excitatory neurotransmission in rat intrapulmonary artery. *Am J Physiol*. 1988;254(6 Pt 2):H1142-1148.
83. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(12 Suppl S):13S-24S.
84. Petkov V, Mosgoeller W, Ziesche R, Raderer M, Stiebellehner L, Vonbank K, Funk GC, Hamilton G, Novotny C, Burian B, Block LH. Vasoactive intestinal peptide as a new drug for treatment of primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2003;111(9):1339-1346.
85. Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1655-1665.
86. Archer S, Rich S. Primary pulmonary hypertension: a vascular biology and translational research "Work in progress". *Circulation*. 2000;102(22):2781-2791.
87. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(9):1023-1030.
88. Peacock AJ, Murphy NF, McMurray JJ, Caballero L, Stewart S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2007;30(1):104-109.
89. Wigley FM, Lima JA, Mayes M, McLain D, Chapin JL, Ward-Able C. The prevalence of undiagnosed pulmonary arterial hypertension in subjects with connective tissue disease at the secondary health care level of community-based rheumatologists (the UNCOVER study). *Arthritis Rheum*. 2005;52(7):2125-2132.

90. Pope JE, Lee P, Baron M, Dunne J, Smith D, Docherty PS, Bookman A, Abu-Hakima M. Prevalence of elevated pulmonary arterial pressures measured by echocardiography in a multicenter study of patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2005;32(7):1273-1278.
91. Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK, et al. Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med.* 1987;107(2):216-223.
92. Cogan JD, Vnencak-Jones CL, Phillips JA, 3rd, Lane KB, Wheeler LA, Robbins IM, Garrison G, Hedges LK, Loyd JE. Gross BMPR2 gene rearrangements constitute a new cause for primary pulmonary hypertension. *Genet Med.* 2005;7(3):169-174.
93. Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Lane KB, Morgan NV, Wheeler L, Phillips JA, 3rd, Newman J, Williams D, Galie N, Manes A, McNeil K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Corris P, Humbert M, Donnai D, Martensson G, Tranebjaerg L, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC. BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet.* 2001;68(1):92-102.
94. Loyd JE, Butler MG, Foroud TM, Conneally PM, Phillips JA, 3rd, Newman JH. Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;152(1):93-97.
95. Sztrymf B, Coulet F, Girerd B, Yaici A, Jais X, Sitbon O, Montani D, Souza R, Simonneau G, Soubrier F, Humbert M. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(12):1377-1383.
96. Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Newman J, Wheeler L, Higenbottam T, Gibbs JS, Egan J, Crozier A, Peacock A, Allcock R, Corris P, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC. Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet.* 2000;37(10):741-745.
97. Humbert M, Labrune P, Sitbon O, Le Gall C, Callebert J, Herve P, Samuel D, Machado R, Trembath R, Drouet L, Launay JM, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension and type-I glycogen-storage disease: the serotonin hypothesis. *Eur Respir J.* 2002;20(1):59-65.
98. Koehler R, Grunig E, Pauciulo MW, Hoepfer MM, Olschewski H, Wilkens H, Halank M, Winkler J, Ewert R, Bremer H, Kreuzer S, Janssen B, Nichols WC. Low frequency of BMPR2 mutations in a German cohort of patients with sporadic idiopathic pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet.* 2004;41(12):e127.
99. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Frances C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: a French nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum.* 2005;52(12):3792-3800.
100. Sitbon O, Lascoux-Combe C, Delfraissy JF, Yeni PG, Raffi F, De Zuttere D, Gressin V, Clerson P, Sereni D, Simonneau G. Prevalence of HIV-related pulmonary arterial hypertension in the current antiretroviral therapy era. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(1):108-113.
101. Mehta NJ, Khan IA, Mehta RN, Sepkowitz DA. HIV-Related pulmonary hypertension: analytic review of 131 cases. *Chest.* 2000;118(4):1133-1141.
102. Gurtner HP. Aminorex and pulmonary hypertension. A review. *Cor Vasa.* 1985;27(2-3):160-171.
103. Abenhaim L, Moride Y, Brenot F, Rich S, Benichou J, Kurz X, Higenbottam T, Oakley C, Wouters E, Aubier M, Simonneau G, Begaud B. Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.* 1996;335(9):609-616.
104. Gomez-Sanchez MA, Saenz de la Calzada C, Gomez-Pajuelo C, Martinez-Tello FJ, Mestre de Juan MJ, James TN. Clinical and pathologic manifestations of pulmonary vascular disease in the toxic oil syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 1991;18(6):1539-1545.
105. Sack KE, Criswell LA. Eosinophilia-myalgia syndrome: the aftermath. *South Med J.* 1992;85(9):878-882.
106. Chin KM, Channick RN, Rubin LJ. Is methamphetamine use associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension? *Chest.* 2006;130(6):1657-1663.
107. Albertson TE, Walby WF, Derlet RW. Stimulant-induced pulmonary toxicity. *Chest.* 1995;108(4):1140-1149.

108. Anthi A, Machado RF, Jison ML, Taveira-Dasilva AM, Rubin LJ, Hunter L, Hunter CJ, Coles W, Nichols J, Avila NA, Sachdev V, Chen CC, Gladwin MT. Hemodynamic and functional assessment of patients with sickle cell disease and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;175(12):1272-1279.
109. Klings ES, Farber HW. Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease. *Respir Res*. 2001;2(5):280-285.
110. Aessopos A, Farmakis D, Karagiorga M, Voskaridou E, Loutradi A, Hatziliami A, Joussef J, Rombos J, Loukopoulos D. Cardiac involvement in thalassemia intermedia: a multicenter study. *Blood*. 2001;97(11):3411-3416.
111. Hayag-Barin JE, Smith RE, Tucker FC, Jr. Hereditary spherocytosis, thrombocytosis, and chronic pulmonary emboli: a case report and review of the literature. *Am J Hematol*. 1998;57(1):82-84.
112. Abdalla SA, Gallione CJ, Barst RJ, Horn EM, Knowles JA, Marchuk DA, Letarte M, Morse JH. Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J*. 2004;23(3):373-377.
113. Dingli D, Utz JP, Krowka MJ, Oberg AL, Tefferi A. Unexplained pulmonary hypertension in chronic myeloproliferative disorders. *Chest*. 2001;120(3):801-808.
114. Chu JW, Kao PN, Faul JL, Doyle RL. High prevalence of autoimmune thyroid disease in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2002;122(5):1668-1673.
115. Peacock AJ. Pulmonary hypertension after splenectomy: a consequence of loss of the splenic filter or is there something more? *Thorax*. 2005;60(12):983-984.
116. Walls MC, Cimino N, Bolling SF, Bach DS. Persistent pulmonary hypertension after mitral valve surgery: does surgical procedure affect outcome? *J Heart Valve Dis*. 2008;17(1):1-9; discussion 9.
117. Tryka AF, Godleski JJ, Schoen FJ, Vandevanter SH. Pulmonary vascular disease and hypertension after valve surgery for mitral stenosis. *Hum Pathol*. 1985;16(1):65-71.
118. Higenbottam T. Pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease: a case for treatment. *Proc Am Thorac Soc*. 2005;2(1):12-19.
119. Ryu JH, Krowka MJ, Pellikka PA, Swanson KL, McGoon MD. Pulmonary hypertension in patients with interstitial lung diseases. *Mayo Clin Proc*. 2007;82(3):342-350.
120. Nathan SD, Shlobin OA, Ahmad S, Urbanek S, Barnett SD. Pulmonary hypertension and pulmonary function testing in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2007;131(3):657-663.
121. Moser KM, Auger WR, Fedullo PF. Chronic major-vessel thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 1990;81(6):1735-1743.
122. Hooper MM, Mayer E, Simonneau G, Rubin LJ. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Circulation*. 2006;113(16):2011-2020.
123. Shorr AF, Helman DL, Davies DB, Nathan SD. Pulmonary hypertension in advanced sarcoidosis: epidemiology and clinical characteristics. *Eur Respir J*. 2005;25(5):783-788.
124. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991;115(5):343-349.
125. Sandoval J, Bauerle O, Palomar A, Gomez A, Martinez-Guerra ML, Beltran M, Guerrero ML. Survival in primary pulmonary hypertension. Validation of a prognostic equation. *Circulation*. 1994;89(4):1733-1744.
126. Galie N, Manes A, Palazzini M, Negro L, Romanazzi S, Branzi A. Pharmacological impact on right ventricular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *European Heart Journal Supplements*. 2007;H:H68-H74.
127. Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2004;279(13):12001-12004.
128. Ross RS, Pham C, Shai SY, Goldhaber JI, Fenczik C, Glembotski CC, Ginsberg MH, Loftus JC. Beta1 integrins participate in the hypertrophic response of rat ventricular myocytes. *Circ Res*. 1998;82(11):1160-1172.
129. Mann DL. Basic mechanisms of left ventricular remodeling: the contribution of wall stress. *J Card Fail*. 2004;10(6 Suppl):S202-206.
130. Hu H, Sachs F. Stretch-activated ion channels in the heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29(6):1511-1523.
131. Lowes BD, Minobe W, Abraham WT, Rizeq MN, Bohlmeier TJ, Quaipe RA, Roden RL, Dutcher DL, Robertson AD, Voelkel NF, Badesch DB, Groves BM, Gilbert EM, Bristow MR. Changes in

- gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. *J Clin Invest.* 1997;100(9):2315-2324.
132. Herron TJ, McDonald KS. Small amounts of alpha-myosin heavy chain isoform expression significantly increase power output of rat cardiac myocyte fragments. *Circ Res.* 2002;90(11):1150-1152.
 133. Bristow MR, Zisman LS, Lowes BD, Abraham WT, Badesch DB, Groves BM, Voelkel NF, Lynch DM, Quaiife RA. The pressure-overloaded right ventricle in pulmonary hypertension. *Chest.* 1998;114(1 Suppl):101S-106S.
 134. Boxt LM, Katz J, Kolb T, Czegledy FP, Barst RJ. Direct quantitation of right and left ventricular volumes with nuclear magnetic resonance imaging in patients with primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19(7):1508-1515.
 135. Quaiife RA, Chen MY, Lynch D, Badesch DB, Groves BM, Wolfel E, Robertson AD, Bristow MR, Voelkel NF. Importance of right ventricular end-systolic regional wall stress in idiopathic pulmonary arterial hypertension: a new method for estimation of right ventricular wall stress. *Eur J Med Res.* 2006;11(5):214-220.
 136. Zaffran S, Kelly RG, Meilhac SM, Buckingham ME, Brown NA. Right ventricular myocardium derives from the anterior heart field. *Circ Res.* 2004;95(3):261-268.
 137. McFadden DG, Barbosa AC, Richardson JA, Schneider MD, Srivastava D, Olson EN. The Hand1 and Hand2 transcription factors regulate expansion of the embryonic cardiac ventricles in a gene dosage-dependent manner. *Development.* 2005;132(1):189-201.
 138. Nagendran J, Gurtu V, Fu DZ, Dyck JR, Haromy A, Ross DB, Rebeyka IM, Michelakis ED. A dynamic and chamber-specific mitochondrial remodeling in right ventricular hypertrophy can be therapeutically targeted. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;136(1):168-178, 178 e161-163.
 139. Kreymborg K, Uchida S, Gellert P, Schneider A, Boettger T, Voswinckel R, Wietelmann A, Szibor M, Weissmann N, Ghofrani AH, Schermuly R, Schranz D, Seeger W, Braun T. Identification of right heart-enriched genes in a murine model of chronic outflow tract obstruction. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;49(4):598-605.
 140. Rudolph AM. The changes in the circulation after birth. Their importance in congenital heart disease. *Circulation.* 1970;41(2):343-359.
 141. Hopkins WE, Waggoner AD. Severe pulmonary hypertension without right ventricular failure: the unique hearts of patients with Eisenmenger syndrome. *Am J Cardiol.* 2002;89(1):34-38.
 142. Hopkins WE. The remarkable right ventricle of patients with Eisenmenger syndrome. *Coron Artery Dis.* 2005;16(1):19-25.
 143. Champion HC, Michelakis ED, Hassoun PM. Comprehensive invasive and noninvasive approach to the right ventricle-pulmonary circulation unit: state of the art and clinical and research implications. *Circulation.* 2009;120(11):992-1007.
 144. Jamieson SW, Kapelanski DP, Sakakibara N, Manecke GR, Thistlethwaite PA, Kerr KM, Channick RN, Fedullo PF, Auger WR. Pulmonary endarterectomy: experience and lessons learned in 1,500 cases. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(5):1457-1462; discussion 1462-1454.
 145. Bresser P, Fedullo PF, Auger WR, Channick RN, Robbins IM, Kerr KM, Jamieson SW, Rubin LJ. Continuous intravenous epoprostenol for chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2004;23(4):595-600.
 146. Reichenberger F, Voswinckel R, Enke B, Rutsch M, El Fechtali E, Schmehl T, Olschewski H, Schermuly R, Weissmann N, Ghofrani HA, Grimminger F, Mayer E, Seeger W. Long-term treatment with sildenafil in chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007;30(5):922-927.
 147. Jais X, D'Armini AM, Jansa P, Torbicki A, Delcroix M, Ghofrani HA, Hoepfer MM, Lang IM, Mayer E, Pepke-Zaba J, Perchenet L, Morganti A, Simonneau G, Rubin LJ. Bosentan for treatment of inoperable chronic thromboembolic pulmonary hypertension: BENEFiT (Bosentan Effects in iNoperable Forms of chronic Thromboembolic pulmonary hypertension), a randomized, placebo-controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2008;52(25):2127-2134.
 148. Galie N, Beghetti M, Gatzoulis MA, Granton J, Berger RM, Lauer A, Chiossi E, Landzberg M. Bosentan therapy in patients with Eisenmenger syndrome: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Circulation.* 2006;114(1):48-54.

149. Camargo VM, Martins Bdo C, Jardim C, Fernandes CJ, Hovnanian A, Souza R. Validation of a treadmill six-minute walk test protocol for the evaluation of patients with pulmonary arterial hypertension. *J Bras Pneumol*. 2009;35(5):423-430.
150. Bruce RA. Methods of exercise testing. Step test, bicycle, treadmill, isometrics. *Am J Cardiol*. 1974;33(6):715-720.
151. Skali H, Zornoff LA, Pfeffer MA, Arnold MO, Lamas GA, Moye LA, Plappert T, Rouleau JL, Sussex BA, St John Sutton M, Braunwald E, Solomon SD. Prognostic use of echocardiography 1 year after a myocardial infarction. *Am Heart J*. 2005;150(4):743-749.
152. Kjaergaard J, Petersen CL, Kjaer A, Schaadt BK, Oh JK, Hassager C. Evaluation of right ventricular volume and function by 2D and 3D echocardiography compared to MRI. *Eur J Echocardiogr*. 2006;7(6):430-438.
153. Hori Y, Kano T, Hoshi F, Higuchi S. Relationship between tissue Doppler-derived RV systolic function and invasive hemodynamic measurements. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(1):H120-125.
154. Tei C, Dujardin KS, Hodge DO, Bailey KR, McGoon MD, Tajik AJ, Seward SB. Doppler echocardiographic index for assessment of global right ventricular function. *J Am Soc Echocardiogr*. 1996;9(6):838-847.
155. Yeo TC, Dujardin KS, Tei C, Mahoney DW, McGoon MD, Seward JB. Value of a Doppler-derived index combining systolic and diastolic time intervals in predicting outcome in primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 1998;81(9):1157-1161.
156. Imanishi T, Nakatani S, Yamada S, Nakanishi N, Beppu S, Nagata S, Miyatake K. Validation of continuous wave Doppler-determined right ventricular peak positive and negative dP/dt: effect of right atrial pressure on measurement. *J Am Coll Cardiol*. 1994;23(7):1638-1643.
157. Tuller D, Steiner M, Wahl A, Kabok M, Seiler C. Systolic right ventricular function assessment by pulsed wave tissue Doppler imaging of the tricuspid annulus. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(31-32):461-468.
158. Lindqvist P, Waldenstrom A, Wikstrom G, Kazzam E. The use of isovolumic contraction velocity to determine right ventricular state of contractility and filling pressures A pulsed Doppler tissue imaging study. *Eur J Echocardiogr*. 2005;6(4):264-270.
159. Urheim S, Cauduro S, Frantz R, McGoon M, Belohlavek M, Green T, Miller F, Bailey K, Seward J, Tajik J, Abraham TP. Relation of tissue displacement and strain to invasively determined right ventricular stroke volume. *Am J Cardiol*. 2005;96(8):1173-1178.
160. Niemann PS, Pinho L, Balbach T, Galuschky C, Blankenhagen M, Silberbach M, Broberg C, Jerosch-Herold M, Sahn DJ. Anatomically oriented right ventricular volume measurements with dynamic three-dimensional echocardiography validated by 3-Tesla magnetic resonance imaging. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(17):1668-1676.
161. Dambrauskaite V, Delcroix M, Claus P, Herbots L, Palecek T, D'Hooge J, Bijnens B, Rademakers F, Sutherland GR. The evaluation of pulmonary hypertension using right ventricular myocardial isovolumic relaxation time. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;18(11):1113-1120.
162. Lindqvist P, Waldenstrom A, Wikstrom G, Kazzam E. Right ventricular myocardial isovolumic relaxation time and pulmonary pressure. *Clin Physiol Funct Imaging*. 2006;26(1):1-8.
163. Abbas AE, Fortuin FD, Schiller NB, Appleton CP, Moreno CA, Lester SJ. A simple method for noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41(6):1021-1027.
164. Rajagopalan N, Simon MA, Suffoletto MS, Shah H, Edelman K, Mathier MA, Lopez-Candales A. Noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance in pulmonary hypertension. *Echocardiography*. 2009;26(5):489-494.
165. Lanzarini L, Fontana A, Campana C, Klersy C. Two simple echo-Doppler measurements can accurately identify pulmonary hypertension in the large majority of patients with chronic heart failure. *J Heart Lung Transplant*. 2005;24(6):745-754.
166. Kouzu H, Nakatani S, Kyotani S, Kanzaki H, Nakanishi N, Kitakaze M. Noninvasive estimation of pulmonary vascular resistance by Doppler echocardiography in patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Cardiol*. 2009;103(6):872-876.
167. Benza R, Biederman R, Murali S, Gupta H. Role of cardiac magnetic resonance imaging in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2008;52(21):1683-1692.

168. McLure LE, Peacock AJ. Cardiac magnetic resonance imaging for the assessment of the heart and pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009;33(6):1454-1466.
169. van Wolferen SA, Marcus JT, Boonstra A, Marques KM, Bronzwaer JG, Spreuwenberg MD, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2007;28(10):1250-1257.
170. Gan CT, Lankhaar JW, Westerhof N, Marcus JT, Becker A, Twisk JW, Boonstra A, Postmus PE, Vonk-Noordegraaf A. Noninvasively assessed pulmonary artery stiffness predicts mortality in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2007;132(6):1906-1912.
171. Canter CE, Gutierrez FR, Mirowitz SA, Martin TC, Hartmann AF, Jr. Evaluation of pulmonary arterial morphology in cyanotic congenital heart disease by magnetic resonance imaging. *Am Heart J*. 1989;118(2):347-354.
172. Fink C, Risse F, Buhmann R, Ley S, Meyer FJ, Plathow C, Puderbach M, Kauczor HU. Quantitative analysis of pulmonary perfusion using time-resolved parallel 3D MRI - initial results. *Rofo*. 2004;176(2):170-174.
173. Padma R, Nagarajan L. The human PIM-1 gene product is a protein serine kinase. *Cancer Res*. 1991;51(9):2486-2489.
174. Boger RH. The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor. *Cardiovasc Res*. 2003;59(4):824-833.
175. Rubens C, Ewert R, Halank M, Wensel R, Orzechowski HD, Schultheiss HP, Hoeffken G. Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest*. 2001;120(5):1562-1569.
176. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328(24):1732-1739.
177. Stewart DJ, Kubac G, Costello KB, Cernacek P. Increased plasma endothelin-1 in the early hours of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1991;18(1):38-43.
178. Hall C. Essential biochemistry and physiology of (NT-pro)BNP. *Eur J Heart Fail*. 2004;6(3):257-260.
179. Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol*. 2007;50(25):2357-2368.
180. Casserly B, Klinger JR. Brain natriuretic peptide in pulmonary arterial hypertension: biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Des Devel Ther*. 2009;3:269-287.
181. Nagaya N, Nishikimi T, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Kakishita M, Fukushima K, Okano Y, Nakanishi N, Miyatake K, Kangawa K. Plasma brain natriuretic peptide as a prognostic indicator in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 2000;102(8):865-870.
182. Nagaya N, Uematsu M, Satoh T, Kyotani S, Sakamaki F, Nakanishi N, Yamagishi M, Kunieda T, Miyatake K. Serum uric acid levels correlate with the severity and the mortality of primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;160(2):487-492.
183. Leuchte HH, Neurohr C, Baumgartner R, Holzapfel M, Giehl W, Vogeser M, Behr J. Brain natriuretic peptide and exercise capacity in lung fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2004;170(4):360-365.
184. Andreassen AK, Wergeland R, Simonsen S, Geiran O, Guevara C, Ueland T. N-terminal pro-B-type natriuretic peptide as an indicator of disease severity in a heterogeneous group of patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 2006;98(4):525-529.
185. Allanore Y, Borderie D, Meune C, Cabanes L, Weber S, Ekindjian OG, Kahan A. N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a diagnostic marker of early pulmonary artery hypertension in patients with systemic sclerosis and effects of calcium-channel blockers. *Arthritis Rheum*. 2003;48(12):3503-3508.
186. Goetze JP, Videbaek R, Boesgaard S, Aldershvile J, Rehfeld JF, Carlsen J. Pro-brain natriuretic peptide as marker of cardiovascular or pulmonary causes of dyspnea in patients with terminal parenchymal lung disease. *J Heart Lung Transplant*. 2004;23(1):80-87.
187. Aubert JD. Biochemical markers in the management of pulmonary hypertension. *Swiss Med Wkly*. 2005;135(3-4):43-49.
188. Dimitroulas T, Giannakoulas G, Karvounis H, Gatzoulis MA, Settas L. Natriuretic peptides in systemic sclerosis-related pulmonary arterial hypertension. *Semin Arthritis Rheum*. 2003;33(4):278-284.

189. Nickel N, Kempf T, Tapken H, Tongers J, Laenger F, Lehmann U, Golpon H, Olsson K, Wilkins MR, Gibbs JS, Hoepfer MM, Wollert KC. Growth differentiation factor-15 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;178(5):534-541.
190. Sitbon O, Humbert M, Jais X, Ioos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G. Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005;111(23):3105-3111.
191. Rubin LJ, Mendoza J, Hood M, McGoon M, Barst R, Williams WB, Diehl JH, Crow J, Long W. Treatment of primary pulmonary hypertension with continuous intravenous prostacyclin (epoprostenol). Results of a randomized trial. *Ann Intern Med.* 1990;112(7):485-491.
192. Barst RJ, Rubin LJ, Long WA, McGoon MD, Rich S, Badesch DB, Groves BM, Tapson VF, Bourge RC, Brundage BH, et al. A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. The Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med.* 1996;334(5):296-302.
193. Badesch DB, Tapson VF, McGoon MD, Brundage BH, Rubin LJ, Wigley FM, Rich S, Barst RJ, Barrett PS, Kral KM, Jobsis MM, Loyd JE, Murali S, Frost A, Girgis R, Bourge RC, Ralph DD, Elliott CG, Hill NS, Langleben D, Schilz RJ, McLaughlin VV, Robbins IM, Groves BM, Shapiro S, Medsger TA, Jr. Continuous intravenous epoprostenol for pulmonary hypertension due to the scleroderma spectrum of disease. A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 2000;132(6):425-434.
194. Sitbon O, Humbert M, Nunes H, Parent F, Garcia G, Herve P, Rainisio M, Simonneau G. Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(4):780-788.
195. McLaughlin VV, Shillington A, Rich S. Survival in primary pulmonary hypertension: the impact of epoprostenol therapy. *Circulation.* 2002;106(12):1477-1482.
196. Olschewski H, Simonneau G, Galie N, Higenbottam T, Naeije R, Rubin LJ, Nikkho S, Speich R, Hoepfer MM, Behr J, Winkler J, Sitbon O, Popov W, Ghofrani HA, Manes A, Kiely DG, Ewert R, Meyer A, Corris PA, Delcroix M, Gomez-Sanchez M, Siedentop H, Seeger W. Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 2002;347(5):322-329.
197. Olschewski H, Hoepfer MM, Behr J, Ewert R, Meyer A, Borst MM, Winkler J, Pfeifer M, Wilkens H, Ghofrani HA, Nikkho S, Seeger W. Long-term therapy with inhaled iloprost in patients with pulmonary hypertension. *Respir Med.* 2010;104(5):731-740.
198. McLaughlin VV, Sitbon O, Badesch DB, Barst RJ, Black C, Galie N, Rainisio M, Simonneau G, Rubin LJ. Survival with first-line bosentan in patients with primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2005;25(2):244-249.
199. Galie N, Ghofrani HA, Torbicki A, Barst RJ, Rubin LJ, Badesch D, Fleming T, Parpia T, Burgess G, Branzi A, Grimminger F, Kurzyna M, Simonneau G. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2005;353(20):2148-2157.
200. Hoepfer MM, Welte T. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2006;354(10):1091-1093; author reply 1091-1093.
201. Ghofrani HA, Morrell NW, Hoepfer MM, Olschewski H, Peacock AJ, Barst RJ, Shapiro S, Golpon H, Toshner M, Grimminger F, Pascoe S. Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2010;182(9):1171-1177.
202. Gombert-Maitland M, Maitland ML, Barst RJ, Sugeng L, Coslet S, Perrino TJ, Bond L, Lacouture ME, Archer SL, Ratain MJ. A dosing/cross-development study of the multikinase inhibitor sorafenib in patients with pulmonary arterial hypertension. *Clin Pharmacol Ther.* 2010;87(3):303-310.
203. Cheng H, Force T. Molecular mechanisms of cardiovascular toxicity of targeted cancer therapeutics. *Circ Res.* 106(1):21-34.
204. Ishikura K, Yamada N, Ito M, Ota S, Nakamura M, Isaka N, Nakano T. Beneficial acute effects of rho-kinase inhibitor in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circ J.* 2006;70(2):174-178.
205. Fukumoto Y, Matoba T, Ito A, Tanaka H, Kishi T, Hayashidani S, Abe K, Takeshita A, Shimokawa H. Acute vasodilator effects of a Rho-kinase inhibitor, fasudil, in patients with severe pulmonary hypertension. *Heart.* 2005;91(3):391-392.
206. Jurasz P, Courtman D, Babaie S, Stewart DJ. Role of apoptosis in pulmonary hypertension: from experimental models to clinical trials. *Pharmacol Ther.* 126(1):1-8.

207. Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Chen JZ. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49(14):1566-1571.
208. Jones RC, Capen DE, Cohen KS, Munn LL, Jain RK, Duda DG. A protocol for phenotypic detection and characterization of vascular cells of different origins in a lung neovascularization model in rodents. *Nat Protoc*. 2008;3(3):388-397.
209. Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG. Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res*. 2006;99(7):675-691.
210. Meyrick BO, Perrett EA. The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli. *Am Rev Respir Dis*. 1989;140(5):1486-1489.
211. Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, Karoor V, Anwar A, Wagner BD, Strassheim D, Stenmark KR. Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2009;297(2):L238-250.
212. Nozik-Grayck E, Suliman HB, Majka S, Albietsz J, Van Rheen Z, Roush K, Stenmark KR. Lung EC-SOD overexpression attenuates hypoxic induction of Egr-1 and chronic hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(3):L422-430.
213. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2009;104(2):236-244, 228p following 244.
214. Dempsey EC, Wick MJ, Karoor V, Barr EJ, Tallman DW, Wehling CA, Walchak SJ, Laudi S, Le M, Oka M, Majka S, Cool CD, Fagan KA, Klemm DJ, Hersh LB, Gerard NP, Gerard C, Miller YE. Nprilysin null mice develop exaggerated pulmonary vascular remodeling in response to chronic hypoxia. *Am J Pathol*. 2009;174(3):782-796.
215. Paddenberg R, Stieger P, von Lilien AL, Faulhammer P, Goldenberg A, Tillmanns HH, Kummer W, Braun-Dullaeus RC. Rapamycin attenuates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling and right ventricular hypertrophy in mice. *Respir Res*. 2007;8:15.
216. Tuchscherer HA, Vanderpool RR, Chesler NC. Pulmonary vascular remodeling in isolated mouse lungs: effects on pulsatile pressure-flow relationships. *J Biomech*. 2007;40(5):993-1001.
217. Estrada KD, Chesler NC. Collagen-related gene and protein expression changes in the lung in response to chronic hypoxia. *Biomech Model Mechanobiol*. 2009;8(4):263-272.
218. Le Cras TD, Kim DH, Gebb S, Markham NE, Shannon JM, Tudor RM, Abman SH. Abnormal lung growth and the development of pulmonary hypertension in the Fawn-Hooded rat. *Am J Physiol*. 1999;277(4 Pt 1):L709-718.
219. Le Cras TD, Kim DH, Markham NE, Abman AS. Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver's altitude. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2000;279(2):L283-291.
220. Jasmin JF, Lucas M, Cernacek P, Dupuis J. Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2001;103(2):314-318.
221. Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol*. 1980;239(5):H692-702.
222. Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, Dunston SK. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res*. 1989;38(1):57-80.
223. Reid MJ, Lame MW, Morin D, Wilson DW, Segall HJ. Involvement of cytochrome P450 3A in the metabolism and covalent binding of ¹⁴C-monocrotaline in rat liver microsomes. *J Biochem Mol Toxicol*. 1998;12(3):157-166.
224. Deyo JA, Reed RL, Buhler DR, Kerkvliet NI. Role of metabolism in monocrotaline-induced immunotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicology*. 1994;94(1-3):209-222.
225. Mattocks AR, Jukes R, Brown J. Simple procedures for preparing putative toxic metabolites of pyrrolizidine alkaloids. *Toxicon*. 1989;27(5):561-567.
226. Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S, Vainchenker W, Adnot S, Eddahibi S, Maitre B. Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res*. 2007;8:8.
227. Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tudor RM. Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-

- dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J*. 2001;15(2):427-438.
228. Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M. Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;121(25):2747-2754.
 229. Altschul R. Endothelium: its development, morphology, function and pathology. . *The Macmillan Company, New York*. 1954.
 230. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333(4):214-221.
 231. Christman BW, McPherson CD, Newman JH, King GA, Bernard GR, Groves BM, Loyd JE. An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1992;327(2):70-75.
 232. Tudor RM, Cool CD, Geraci MW, Wang J, Abman SH, Wright L, Badesch D, Voelkel NF. Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(6):1925-1932.
 233. Cacoub P, Dorent R, Nataf P, Carayon A, Riquet M, Noe E, Piette JC, Godeau P, Gandjbakhch I. Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 1997;33(1):196-200.
 234. Stewart DJ, Levy RD, Cernacek P, Langleben D. Increased plasma endothelin-1 in pulmonary hypertension: marker or mediator of disease? *Ann Intern Med*. 1991;114(6):464-469.
 235. Herve P, Launay JM, Scrobohaci ML, Brenot F, Simonneau G, Petitpretz P, Poubeau P, Cerrina J, Duroux P, Drouet L. Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med*. 1995;99(3):249-254.
 236. Rai PR, Cool CD, King JA, Stevens T, Burns N, Winn RA, Kasper M, Voelkel NF. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178(6):558-564.
 237. Tudor RM, Cool CD, Yeager M, Taraseviciene-Stewart L, Bull TM, Voelkel NF. The pathobiology of pulmonary hypertension. Endothelium. *Clin Chest Med*. 2001;22(3):405-418.
 238. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70.
 239. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
 240. Bonnet S, Archer SL, Allalunis-Turner J, Haromy A, Beaulieu C, Thompson R, Lee CT, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Bonnet S, Harry G, Hashimoto K, Porter CJ, Andrade MA, Thebaud B, Michelakis ED. A mitochondria-K⁺ channel axis is suppressed in cancer and its normalization promotes apoptosis and inhibits cancer growth. *Cancer Cell*. 2007;11(1):37-51.
 241. Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, Nagendran J, Haromy A, Dyck JR, Michelakis ED. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- β /NFAT axis. *Circulation*. 2009;120(13):1231-1240.
 242. Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(27):11418-11423.
 243. Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JR, Michelakis ED. Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2(44):44ra58.
 244. Ruan K, Fang X, Ouyang G. MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer Lett*. 2009;285(2):116-126.
 245. Voelkel NF, Cool C, Lee SD, Wright L, Geraci MW, Tudor RM. Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest*. 1998;114(3 Suppl):225S-230S.
 246. Lee SD, Shroyer KR, Markham NE, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM. Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 1998;101(5):927-934.
 247. Deng Z, Morse JH, Slager SL, Cuervo N, Moore KJ, Venetos G, Kalachikov S, Cayanis E, Fischer SG, Barst RJ, Hodge SE, Knowles JA. Familial primary pulmonary hypertension (gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am J Hum Genet*. 2000;67(3):737-744.

248. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, Yi ES, Platoshyn O, Thistlethwaite PA, Kriett JM, Yung G, Rubin LJ, Yuan JX. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;285(3):L740-754.
249. Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002;277(7):5330-5338.
250. Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, Atkinson C, Chen H, Trembath RC, Morrell NW. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res*. 2005;96(10):1053-1063.
251. Moreno-Vinasco L, Gomberg-Maitland M, Maitland ML, Desai AA, Singleton PA, Sammani S, Sam L, Liu Y, Husain AN, Lang RM, Ratain MJ, Lussier YA, Garcia JG. Genomic assessment of a multikinase inhibitor, sorafenib, in a rodent model of pulmonary hypertension. *Physiol Genomics*. 2008;33(2):278-291.
252. Caldwell RL, Gadipatti R, Lane KB, Shepherd VL. HIV-1 TAT represses transcription of the bone morphogenetic protein receptor-2 in U937 monocytic cells. *J Leukoc Biol*. 2006;79(1):192-201.
253. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, Morrell NW. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation*. 2002;105(14):1672-1678.
254. West J, Fagan K, Steudel W, Fouty B, Lane K, Harral J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Ozimek J, Tuder R, Rodman DM. Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res*. 2004;94(8):1109-1114.
255. McMurtry MS, Moudgil R, Hashimoto K, Bonnet S, Michelakis ED, Archer SL. Overexpression of human bone morphogenetic protein receptor 2 does not ameliorate monocrotaline pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(4):L872-878.
256. Wong WK, Knowles JA, Morse JH. Bone morphogenetic protein receptor type II C-terminus interacts with c-Src: implication for a role in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;33(5):438-446.
257. Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, Simonneau G, Galie N, Loyd JE, Humbert M, Nichols WC, Morrell NW, Berg J, Manes A, McGaughan J, Pauculo M, Wheeler L. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001;345(5):325-334.
258. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, Abdalla SA, Rowell J, Machado RD, Elliott CG, Robbins IM, Olschewski H, McLaughlin V, Gruenig E, Kermeen F, Halme M, Raisanen-Sokolowski A, Laitinen T, Morrell NW, Trembath RC. Molecular and functional analysis identifies ALK-1 as the predominant cause of pulmonary hypertension related to hereditary haemorrhagic telangiectasia. *J Med Genet*. 2003;40(12):865-871.
259. Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, Morrell NW, Aldred MA, Trembath RC. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation*. 2005;111(4):435-441.
260. Fujiwara M, Yagi H, Matsuoka R, Akimoto K, Furutani M, Imamura S, Uehara R, Nakayama T, Takao A, Nakazawa M, Saji T. Implications of mutations of activin receptor-like kinase 1 gene (ALK1) in addition to bone morphogenetic protein receptor II gene (BMP2) in children with pulmonary arterial hypertension. *Circ J*. 2008;72(1):127-133.
261. Willers ED, Newman JH, Loyd JE, Robbins IM, Wheeler LA, Prince MA, Stanton KC, Cogan JA, Runo JR, Byrne D, Humbert M, Simonneau G, Sztrymf B, Morse JA, Knowles JA, Roberts KE, McElroy JJ, Barst RJ, Phillips JA, 3rd. Serotonin transporter polymorphisms in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(7):798-802.
262. Lesch KP, Bengel D, Heils A, Sabol SZ, Greenberg BD, Petri S, Benjamin J, Muller CR, Hamer DH, Murphy DL. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*. 1996;274(5292):1527-1531.
263. Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, Raffestin B, Darmon M, Capron F, Simonneau G, Darteville P, Hamon M, Adnot S. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2001;108(8):1141-1150.
264. Machado RD, Koehler R, Glissmeyer E, Veal C, Suntharalingam J, Kim M, Carlquist J, Town M, Elliott CG, Hoeper M, Fijalkowska A, Kurzyna M, Thomson JR, Gibbs SR, Wilkins MR, Seeger W,

- Morrell NW, Gruenig E, Trembath RC, Janssen B. Genetic association of the serotonin transporter in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(7):793-797.
265. Remillard CV, Tigno DD, Platoshyn O, Burg ED, Brevnova EE, Conger D, Nicholson A, Rana BK, Channick RN, Rubin LJ, O'Connor D T, Yuan JX. Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292(5):C1837-1853.
266. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2003;22(2):358-363.
267. Eddahibi S, Morrell N, d'Ortho MP, Naeije R, Adnot S. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2002;20(6):1559-1572.
268. Tamby MC, Chauseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillemin L, Boissier MC, Mouthon L. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax.* 2005;60(9):765-772.
269. Tamby MC, Humbert M, Guilpain P, Servettaz A, Dupin N, Christner JJ, Simonneau G, Fermanian J, Weill B, Guillemin L, Mouthon L. Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2006;28(4):799-807.
270. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Broussard C, Bussone G, Yaici A, Hotellier F, Simonneau G, Guillemin L, Humbert M, Mouthon L. Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177(10):1128-1134.
271. Nunez B, Sauleda J, Anto JM, Julia MR, Orozco M, Monso E, Noguera A, Gomez FP, Garcia-Aymerich J, Agusti A. Anti-Tissue Antibodies are Related to Lung Function in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.*
272. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995;151(5):1628-1631.
273. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010;122(9):920-927.
274. Tuder RM, Groves B, Badesch DB, Voelkel NF. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol.* 1994;144(2):275-285.
275. Ulrich S, Taraseviciene-Stewart L, Huber LC, Speich R, Voelkel N. Peripheral blood B lymphocytes derived from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension express a different RNA pattern compared with healthy controls: a cross sectional study. *Respir Res.* 2008;9:20.
276. Ulrich S, Nicolls MR, Taraseviciene L, Speich R, Voelkel N. Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration.* 2008;75(3):272-280.
277. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G, Humbert M. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2007;29(3):462-468.
278. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet.* 2005;39:359-407.
279. Michelakis ED, Sutendra G, Dromparis P, Webster L, Haromy A, Niven E, Maguire C, Gammer TL, Mackey JR, Fulton D, Abdulkarim B, McMurtry MS, Petruk KC. Metabolic modulation of glioblastoma with dichloroacetate. *Sci Transl Med.* 2010;2(31):31ra34.
280. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1479-1491.
281. Kim JW, Dang CV. Multifaceted roles of glycolytic enzymes. *Trends Biochem Sci.* 2005;30(3):142-150.
282. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:143-183.
283. Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? *Trends Cell Biol.* 1998;8(7):267-271.

284. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*. 1999;341 (Pt 2):233-249.
285. Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *J Biol Chem*. 2005;280(19):18558-18561.
286. Halestrap AP. Mitochondrial permeability: dual role for the ADP/ATP translocator? *Nature*. 2004;430(7003):1 p following 983.
287. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*. 2007;87(1):99-163.
288. Leber B, Lin J, Andrews DW. Embedded together: the life and death consequences of interaction of the Bcl-2 family with membranes. *Apoptosis*. 2007;12(5):897-911.
289. Pastorino JG, Hoek JB. Regulation of hexokinase binding to VDAC. *J Bioenerg Biomembr*. 2008;40(3):171-182.
290. Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N. Activation of glycogen synthase kinase 3beta disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res*. 2005;65(22):10545-10554.
291. Pastorino JG, Shulga N, Hoek JB. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7610-7618.
292. Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 1999;402(6760):371-372.
293. Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF. Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem*. 1996;271(50):32253-32259.
294. Pozeg ZI, Michelakis ED, McMurtry MS, Thebaud B, Wu XC, Dyck JR, Hashimoto K, Wang S, Moudgil R, Harry G, Sultanian R, Koshal A, Archer SL. In vivo gene transfer of the O₂-sensitive potassium channel Kv1.5 reduces pulmonary hypertension and restores hypoxic pulmonary vasoconstriction in chronically hypoxic rats. *Circulation*. 2003;107(15):2037-2044.
295. Platoshyn O, Yu Y, Golovina VA, McDaniel SS, Krick S, Li L, Wang JY, Rubin LJ, Yuan JX. Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;280(4):L801-812.
296. Humbert M, Monti G, Fartoukh M, Magnan A, Brenot F, Rain B, Capron F, Galanaud P, Duroux P, Simonneau G, Emilie D. Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur Respir J*. 1998;11(3):554-559.
297. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest*. 2005;115(10):2811-2821.
298. Merklinger SL, Jones PL, Martinez EC, Rabinovitch M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation*. 2005;112(3):423-431.
299. Csiszar A, Labinskyy N, Olson S, Pinto JT, Gupte S, Wu JM, Hu F, Ballabh P, Podlutzky A, Losonczy G, de Cabo R, Mathew R, Wolin MS, Ungvari Z. Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension*. 2009;54(3):668-675.
300. Frasch HF, Marshall C, Marshall BE. Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol*. 1999;276(2 Pt 1):L304-310.
301. Guilluy C, Eddahibi S, Agard C, Guignabert C, Izikki M, Tu L, Savale L, Humbert M, Fadel E, Adnot S, Loirand G, Pacaud P. RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179(12):1151-1158.
302. Zuckerbraun BS, Shapiro RA, Billiar TR, Tzeng E. RhoA influences the nuclear localization of extracellular signal-regulated kinases to modulate p21Waf/Cip1 expression. *Circulation*. 2003;108(7):876-881.
303. Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA. Heparin inhibits pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through guanine nucleotide exchange factor-H1/RhoA/Rho kinase/p27. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(4):524-530.
304. Archer SL, Souil E, Dinh-Xuan AT, Schremmer B, Mercier JC, El Yaagoubi A, Nguyen-Huu L, Reeve HL, Hampl V. Molecular identification of the role of voltage-gated K⁺ channels, Kv1.5 and

- Kv2.1, in hypoxic pulmonary vasoconstriction and control of resting membrane potential in rat pulmonary artery myocytes. *J Clin Invest.* 1998;101(11):2319-2330.
305. Yuan XJ, Wang J, Juhaszova M, Gaine SP, Rubin LJ. Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet.* 1998;351(9104):726-727.
306. Patel AJ, Lazdunski M, Honore E. Kv2.1/Kv9.3, a novel ATP-dependent delayed-rectifier K⁺ channel in oxygen-sensitive pulmonary artery myocytes. *EMBO J.* 1997;16(22):6615-6625.
307. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Puttagunta L, Michelakis ED. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005;115(6):1479-1491.
308. McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 2004;95(8):830-840.
309. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation.* 2002;105(2):244-250.
310. Gilboa L, Nohe A, Geissendorfer T, Sebald W, Henis YI, Knaus P. Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell.* 2000;11(3):1023-1035.
311. Massague J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000;19(8):1745-1754.
312. Newman JH, Wheeler L, Lane KB, Loyd E, Gaddipati R, Phillips JA, 3rd, Loyd JE. 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.* 2001;345(5):319-324.
313. Shi Y. Structural insights on Smad function in TGFbeta signaling. *Bioessays.* 2001;23(3):223-232.
314. von Bubnoff A, Cho KW. Intracellular BMP signaling regulation in vertebrates: pathway or network? *Dev Biol.* 2001;239(1):1-14.
315. Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am.* 2003;85-A Suppl 3:44-51.
316. Itoh F, Asao H, Sugamura K, Heldin CH, ten Dijke P, Itoh S. Promoting bone morphogenetic protein signaling through negative regulation of inhibitory Smads. *EMBO J.* 2001;20(15):4132-4142.
317. Roberts AB. The ever-increasing complexity of TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002;13(1):3-5.
318. Chen XY, Dun JN, Miao QF, Zhang YJ. Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, suppresses 5-hydroxytryptamine-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation via JNK and ERK1/2 pathway. *Pharmacology.* 2009;83(2):67-79.
319. Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ. Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.* 2000;14(4):391-396.
320. Mazure NM, Chen EY, Laderoute KR, Giaccia AJ. Induction of vascular endothelial growth factor by hypoxia is modulated by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway in Ha-ras-transformed cells through a hypoxia inducible factor-1 transcriptional element. *Blood.* 1997;90(9):3322-3331.
321. Jiang BH, Agani F, Passaniti A, Semenza GL. V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.* 1997;57(23):5328-5335.
322. Ausserer WA, Bourrat-Floek B, Green CJ, Laderoute KR, Sutherland RM. Regulation of c-jun expression during hypoxic and low-glucose stress. *Mol Cell Biol.* 1994;14(8):5032-5042.
323. Muller JM, Krauss B, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Rupec RA. Hypoxia induces c-fos transcription via a mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *J Biol Chem.* 1997;272(37):23435-23439.
324. Kaab S, Miguel-Velado E, Lopez-Lopez JR, Perez-Garcia MT. Down regulation of Kv3.4 channels by chronic hypoxia increases acute oxygen sensitivity in rabbit carotid body. *J Physiol.* 2005;566(Pt 2):395-408.

325. O'Reilly MA, Staversky RJ, Watkins RH, Reed CK, de Mesy Jensen KL, Finkelstein JN, Keng PC. The cyclin-dependent kinase inhibitor p21 protects the lung from oxidative stress. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24(6):703-710.
326. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. 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.* 2006;113(22):2630-2641.
327. Thebaud B, Michelakis ED, Wu XC, Moudgil R, Kuzyk M, Dyck JR, Harry G, Hashimoto K, Haromy A, Rebeyka I, Archer SL. Oxygen-sensitive Kv channel gene transfer confers oxygen responsiveness to preterm rabbit and remodeled human ductus arteriosus: implications for infants with patent ductus arteriosus. *Circulation.* 2004;110(11):1372-1379.
328. Fouty BW, Grimison B, Fagan KA, Le Cras TD, Harral JW, Hoedt-Miller M, Sclafani RA, Rodman DM. p27(Kip1) is important in modulating pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;25(5):652-658.
329. Yu L, Quinn DA, Garg HG, Hales CA. Cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1, but not p21WAF1/Cip1, is required for inhibition of hypoxia-induced pulmonary hypertension and remodeling by heparin in mice. *Circ Res.* 2005;97(9):937-945.
330. Mizuno S, Bogaard HJ, Kraskauskas D, Alhussaini A, Gomez-Arroyo J, Voelkel NF, Ishizaki T. p53 gene deficiency promotes hypoxia-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.*
331. Chen SJ, Wang YB, Chen O, Zhu XB, Ma Y. [Effect of p21 gene transfection mediated by replication deficient adenovirus on the pulmonary hypertensive rat model]. *Zhonghua Er Ke Za Zhi.* 2008;46(2):139-142.
332. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1):15-20.
333. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Luo J, Mantha G, Sobol RW, Dacic S. Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2007;67(5):2345-2350.
334. Brock M, Trenkmann M, Gay RE, Michel BA, Gay S, Fischler M, Ulrich S, Speich R, Huber LC. Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type II through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ Res.* 2009;104(10):1184-1191.
335. Corney DC, Flesken-Nikitin A, Godwin AK, Wang W, Nikitin AY. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res.* 2007;67(18):8433-8438.
336. Tarasov V, Jung P, Verdoodt B, Lodygin D, Epanchintsev A, Menssen A, Meister G, Hermeking H. Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle.* 2007;6(13):1586-1593.
337. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ. Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell.* 2009;35(6):856-867.
338. Fasanaro P, Greco S, Lorenzi M, Pescatori M, Brioschi M, Kulshreshtha R, Banfi C, Stubbs A, Calin GA, Ivan M, Capogrossi MC, Martelli F. An integrated approach for experimental target identification of hypoxia-induced miR-210. *J Biol Chem.* 2009;284(50):35134-35143.
339. Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(2):255-264.
340. Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R. Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene.* 2010;29(30):4362-4368.
341. Caruso P, Maclean MR, Khanin R, McClure J, Soon E, Southwood M, McDonald RA, Greig JA, Robertson KE, Masson R, Denby L, Dempsie Y, Long L, Morrell NW, Baker AH. Dynamic Changes in Lung MicroRNA Profiles During the Development of Pulmonary Hypertension Due to Chronic Hypoxia and Monocrotaline. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010.

342. Courboulain A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011.
343. Davis BN, Hilyard AC, Lagna G, Hata A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature*. 2008;454(7200):56-61.
344. Davis BN, Hilyard AC, Nguyen PH, Lagna G, Hata A. Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. *Mol Cell*. 2010;39(3):373-384.
345. Long L, Crosby A, Yang X, Southwood M, Upton PD, Kim DK, Morrell NW. Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation*. 2009;119(4):566-576.
346. Ji R, Cheng Y, Yue J, Yang J, Liu X, Chen H, Dean DB, Zhang C. MicroRNA expression signature and antisense-mediated depletion reveal an essential role of MicroRNA in vascular neointimal lesion formation. *Circ Res*. 2007;100(11):1579-1588.
347. Runo JR, Loyd JE. Primary pulmonary hypertension. *Lancet*. 2003;361(9368):1533-1544.
348. Barillari G, Albonici L, Incerpi S, Bogetto L, Pistrutto G, Volpi A, Ensoli B, Manzari V. Inflammatory cytokines stimulate vascular smooth muscle cells locomotion and growth by enhancing alpha5beta1 integrin expression and function. *Atherosclerosis*. 2001;154(2):377-385.
349. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003;302(5651):1704-1709.
350. Menezes GC, Miron-Mendoza M, Ho CH, Jiang H, Grinnell F. Oncogenic Ras-transformed human fibroblasts exhibit differential changes in contraction and migration in 3D collagen matrices. *Exp Cell Res*. 2008;314(16):3081-3091.
351. Yabkowitz R, Mansfield PJ, Ryan US, Suchard SJ. Thrombospondin mediates migration and potentiates platelet-derived growth factor-dependent migration of calf pulmonary artery smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. 1993;157(1):24-32.
352. Yamboliev IA, Gerthoffer WT. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2001;280(6):C1680-1688.
353. Leung WC, Lawrie A, Demaries S, Massaelli H, Burry A, Yablonsky S, Sarjeant JM, Fera E, Rassart E, Pickering JG, Rabinovitch M. Apolipoprotein D and platelet-derived growth factor-BB synergism mediates vascular smooth muscle cell migration. *Circ Res*. 2004;95(2):179-186.
354. Dai YP, Bongalon S, Tian H, Parks SD, Mutafova-Yambolieva VN, Yamboliev IA. Upregulation of profilin, cofilin-2 and LIMK2 in cultured pulmonary artery smooth muscle cells and in pulmonary arteries of monocrotaline-treated rats. *Vascul Pharmacol*. 2006;44(5):275-282.
355. Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massague J, Bernard O. Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol*. 2003;162(6):1089-1098.
356. Lawrie A, Spiekerkoetter E, Martinez EC, Ambartsumian N, Sheward WJ, MacLean MR, Harmor AJ, Schmidt AM, Lukanidin E, Rabinovitch M. Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res*. 2005;97(3):227-235.
357. Spiekerkoetter E, Guignabert C, de Jesus Perez V, Alastalo TP, Powers JM, Wang L, Lawrie A, Ambartsumian N, Schmidt AM, Berryman M, Ashley RH, Rabinovitch M. S100A4 and bone morphogenetic protein-2 codependently induce vascular smooth muscle cell migration via phospho-extracellular signal-regulated kinase and chloride intracellular channel 4. *Circ Res*. 2009;105(7):639-647, 613 p following 647.
358. Sarkar J, Gou D, Turaka P, Viktorova E, Ramchandran R, Raj JU. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2010;299(6):L861-871.
359. Negash S, Narasimhan SR, Zhou W, Liu J, Wei FL, Tian J, Raj JU. Role of cGMP-dependent protein kinase in regulation of pulmonary vascular smooth muscle cell adhesion and migration: effect of hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009;297(1):H304-312.
360. Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1alpha-dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem*. 2008;104(5):1918-1926.

361. Harvey KA, Welch Z, Sliva D, Siddiqui RA. Role of Rho kinase in sphingosine 1-phosphate-mediated endothelial and smooth muscle cell migration and differentiation. *Mol Cell Biochem.* 2010;342(1-2):7-19.
362. Paulin R, Barrier M, Bonnet S. New therapeutics for pulmonary arterial hypertension: do gene therapies have translational values? *Future Science-Clinical Investigation.* 2011;1(3):363-366.
363. Dewachter L, Dewachter C, Naeije R. New therapies for pulmonary arterial hypertension: an update on current bench to bedside translation. *Expert Opin Investig Drugs.* 19(4):469-488.
364. Glazova M, Aho TL, Palmetshofer A, Murashov A, Scheinin M, Koskinen PJ. Pim-1 kinase enhances NFATc activity and neuroendocrine functions in PC12 cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 2005;138(2):116-123.
365. Rainio EM, Sandholm J, Koskinen PJ. Cutting edge: Transcriptional activity of NFATc1 is enhanced by the Pim-1 kinase. *J Immunol.* 2002;168(4):1524-1527.
366. He HC, Bi XC, Dai QS, Wang SS, Wei HA, Zhong WD, Liu WH, Jiang FN, Liu LS. Detection of pim-1 mRNA in prostate cancer diagnosis. *Chin Med J (Engl).* 2007;120(17):1491-1493.
367. Beier UH, Weise JB, Laudien M, Sauerwein H, Gorogh T. Overexpression of Pim-1 in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2007;30(6):1381-1387.
368. Chiang WF, Yen CY, Lin CN, Liaw GA, Chiu CT, Hsia YJ, Liu SY. Up-regulation of a serine-threonine kinase proto-oncogene Pim-1 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(8):740-745.
369. Cibull TL, Jones TD, Li L, Eble JN, Ann Baldridge L, Malott SR, Luo Y, Cheng L. Overexpression of Pim-1 during progression of prostatic adenocarcinoma. *J Clin Pathol.* 2006;59(3):285-288.
370. Willert M, Augstein A, Poitz DM, Schmeisser A, Strasser RH, Braun-Dullaeus RC. Transcriptional regulation of Pim-1 kinase in vascular smooth muscle cells and its role for proliferation. *Basic Res Cardiol.* 2009.
371. Muraski JA, Fischer KM, Wu W, Cottage CT, Quijada P, Mason M, Din S, Gude N, Alvarez R, Jr., Rota M, Kajstura J, Wang Z, Schaefer E, Chen X, MacDonnel S, Magnuson N, Houser SR, Anversa P, Sussman MA. Pim-1 kinase antagonizes aspects of myocardial hypertrophy and compensation to pathological pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(37):13889-13894.
372. Katakami N, Kaneto H, Hao H, Umayahara Y, Fujitani Y, Sakamoto K, Gorogawa S, Yasuda T, Kawamori D, Kajimoto Y, Matsuhisa M, Yutani C, Hori M, Yamasaki Y. Role of pim-1 in smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279(52):54742-54749.
373. Shirogane T, Fukada T, Muller JM, Shima DT, Hibi M, Hirano T. Synergistic roles for Pim-1 and c-Myc in STAT3-mediated cell cycle progression and antiapoptosis. *Immunity.* 1999;11(6):709-719.
374. Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, Nagendran J, Haromy A, Dyck JR, Michelakis ED. Dehydroepiandrosterone Reverses Systemic Vascular Remodeling Through the Inhibition of the Akt/GSK3- β /NFAT Axis. *Circulation.* 2009.
375. Yu CL, Meyer DJ, Campbell GS, Lerner AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R. Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science.* 1995;269(5220):81-83.
376. Giordano V, De Falco G, Chiari R, Quinto I, Pelicci PG, Bartholomew L, Delmastro P, Gadina M, Scala G. Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *J Immunol.* 1997;158(9):4097-4103.
377. Itoh T, Nagaya N, Ishibashi-Ueda H, Kyotani S, Oya H, Sakamaki F, Kimura H, Nakanishi N. Increased plasma monocyte chemoattractant protein-1 level in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respirology.* 2006;11(2):158-163.
378. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lhermine A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002;165(4):534-539.
379. Schober A, Zerneck A. Chemokines in vascular remodeling. *Thromb Haemost.* 2007;97(5):730-737.
380. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 122(9):920-927.

381. Selimovic N, Bergh CH, Andersson B, Sakiniene E, Carlsten H, Rundqvist B. Growth factors and interleukin-6 across the lung circulation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2009;34(3):662-668.
382. Otterdal K, Andreassen AK, Yndestad A, Oie E, Sandberg WJ, Dahl CP, Pedersen TM, Ueland T, Gullestad L, Brosstad FR, Aukrust P, Damas JK. Raised LIGHT levels in pulmonary arterial hypertension: potential role in thrombus formation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177(2):202-207.
383. Nadiminty N, Chun JY, Hu Y, Dutt S, Lin X, Gao AC. LIGHT, a member of the TNF superfamily, activates Stat3 mediated by NIK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007;359(2):379-384.
384. Mellado M, Rodriguez-Frade JM, Aragay A, del Real G, Martin AM, Vila-Coro AJ, Serrano A, Mayor F, Jr., Martinez AC. The chemokine monocyte chemoattractant protein 1 triggers Janus kinase 2 activation and tyrosine phosphorylation of the CCR2B receptor. *J Immunol*. 1998;161(2):805-813.
385. Wong M, Fish EN. RANTES and MIP-1alpha activate stats in T cells. *J Biol Chem*. 1998;273(1):309-314.
386. Miscia S, Marchisio M, Grilli A, Di Valerio V, Centurione L, Sabatino G, Garaci F, Zauli G, Bonvini E, Di Baldassarre A. Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) activates Jak1/Stat3-Stat5B signaling through TNFR-1 in human B cells. *Cell Growth Differ*. 2002;13(1):13-18.
387. Vignais ML, Sadowski HB, Watling D, Rogers NC, Gilman M. Platelet-derived growth factor induces phosphorylation of multiple JAK family kinases and STAT proteins. *Mol Cell Biol*. 1996;16(4):1759-1769.
388. Rosenbloom KR, Dreszer TR, Pheasant M, Barber GP, Meyer LR, Pohl A, Raney BJ, Wang T, Hinrichs AS, Zweig AS, Fujita PA, Learned K, Rhead B, Smith KE, Kuhn RM, Karolchik D, Haussler D, Kent WJ. ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser. *Nucleic Acids Res*. 38(Database issue):D620-625.
389. Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 2008;133(6):1106-1117.
390. Ahmad S. Pulmonary hypertension and right heart failure. *Chest*. 1995;108(6):1773.
391. Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther*. 2008;120(2):172-185.
392. Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B. JANUS under stress--role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases. *Vascul Pharmacol*. 2005;43(5):357-363.
393. Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science*. 1997;277(5332):1630-1635.
394. Banes-Berceli AK, Ketsawatsomkron P, Oghi S, Patel B, Pollock DM, Marrero MB. Angiotensin II and endothelin-1 augment the vascular complications of diabetes via JAK2 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(2):H1291-1299.
395. Diller GP, Thum T, Wilkins MR, Wharton J. Endothelial progenitor cells in pulmonary arterial hypertension. *Trends Cardiovasc Med*. 20(1):22-29.
396. Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bedard E, Gibbs JS, Bauersachs J, Hobbs AJ, Wilkins MR, Gatzoulis MA, Wharton J. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2008;117(23):3020-3030.
397. Schmidt T, Karsunky H, Rodel B, Zevnik B, Elsasser HP, Moroy T. Evidence implicating Gfi-1 and Pim-1 in pre-T-cell differentiation steps associated with beta-selection. *EMBO J*. 1998;17(18):5349-5359.
398. Zippo A, De Robertis A, Bardelli M, Galvagni F, Oliviero S. Identification of Flk-1 target genes in vasculogenesis: Pim-1 is required for endothelial and mural cell differentiation in vitro. *Blood*. 2004;103(12):4536-4544.
399. Morcinek JC, Weisser C, Geissinger E, Scharl M, Wellbrock C. Activation of STAT5 triggers proliferation and contributes to anti-apoptotic signalling mediated by the oncogenic Xmrk kinase. *Oncogene*. 2002;21(11):1668-1678.
400. Matikainen S, Sareneva T, Ronni T, Lehtonen A, Koskinen PJ, Julkunen I. Interferon-alpha activates multiple STAT proteins and upregulates proliferation-associated IL-2Ralpha, c-myc, and pim-1 genes in human T cells. *Blood*. 1999;93(6):1980-1991.

401. Barst RJ. PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2691-2694.
402. Tanaka H, Sukhova G, Schwartz D, Libby P. Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF-alpha but not interleukin-1 or basic fibroblast growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(1):12-18.
403. Zhang F, Hu Y, Xu Q, Ye S. Different effects of angiotensin II and angiotensin-(1-7) on vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *PLoS One.* 5(8).
404. Muraski JA, Rota M, Misao Y, Fransioli J, Cottage C, Gude N, Esposito G, Delucchi F, Arcarese M, Alvarez R, Siddiqi S, Emmanuel GN, Wu W, Fischer K, Martindale JJ, Glembotski CC, Leri A, Kajstura J, Magnuson N, Berns A, Beretta RM, Houser SR, Schaefer EM, Anversa P, Sussman MA. Pim-1 regulates cardiomyocyte survival downstream of Akt. *Nat Med.* 2007;13(12):1467-1475.
405. Sussman MA. Mitochondrial integrity: preservation through Akt/Pim-1 kinase signaling in the cardiomyocyte. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2009;7(8):929-938.
406. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(1):67-71.
407. Hu XF, Li J, Vandervalk S, Wang Z, Magnuson NS, Xing PX. PIM-1-specific mAb suppresses human and mouse tumor growth by decreasing PIM-1 levels, reducing Akt phosphorylation, and activating apoptosis. *J Clin Invest.* 2009;119(2):362-375.
408. Holder S, Zemskova M, Zhang C, Tabrizid M, Bremer R, Neidigh JW, Lilly MB. Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase. *Mol Cancer Ther.* 2007;6(1):163-172.
409. Toshner M, Voswinkel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2009;180(8):780-787.
410. Lagunas L, Clipstone NA. Deregulated NFATc1 activity transforms murine fibroblasts via an autocrine growth factor-mediated Stat3-dependent pathway. *J Cell Biochem.* 2009;108(1):237-248.
411. Manukyan I, Galatioto J, Mascareno E, Bhaduri S, Siddiqui MA. Cross-talk between Calcineurin/NFAT and Jak/STAT Signaling Induces Cardioprotective alphaB-crystallin Gene Expression In Response to Hypertrophic Stimuli. *J Cell Mol Med.* 2009.
412. Zemskova M, Sahakian E, Bashkirova S, Lilly M. The PIM1 kinase is a critical component of a survival pathway activated by docetaxel and promotes survival of docetaxel-treated prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2008;283(30):20635-20644.
413. Bachmann M, Hennemann H, Xing PX, Hoffmann I, Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 phosphorylates and inhibits the activity of Cdc25C-associated kinase 1 (C-TAK1): a novel role for Pim-1 at the G2/M cell cycle checkpoint. *J Biol Chem.* 2004;279(46):48319-48328.
414. Bachmann M, Kosan C, Xing PX, Montenarh M, Hoffmann I, Moroy T. The oncogenic serine/threonine kinase Pim-1 directly phosphorylates and activates the G2/M specific phosphatase Cdc25C. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(3):430-443.
415. Morishita D, Katayama R, Sekimizu K, Tsuruo T, Fujita N. Pim kinases promote cell cycle progression by phosphorylating and down-regulating p27Kip1 at the transcriptional and posttranscriptional levels. *Cancer Res.* 2008;68(13):5076-5085.
416. Zaidi SH, You XM, Ciura S, Husain M, Rabinovitch M. Overexpression of the serine elastase inhibitor elafin protects transgenic mice from hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation.* 2002;105(4):516-521.
417. Barman SA, Zhu S, White RE. RhoA/Rho-kinase signaling: a therapeutic target in pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag.* 2009;5:663-671.
418. Laird PW, van der Lugt NM, Clarke A, Domen J, Linders K, McWhir J, Berns A, Hooper M. In vivo analysis of Pim-1 deficiency. *Nucleic Acids Res.* 1993;21(20):4750-4755.
419. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 2006;126(2):375-387.
420. Senis YA, Tomlinson MG, Ellison S, Mazharian A, Lim J, Zhao Y, Kornerup KN, Auger JM, Thomas SG, Dhanjal T, Kalia N, Zhu JW, Weiss A, Watson SP. The tyrosine phosphatase CD148 is an essential positive regulator of platelet activation and thrombosis. *Blood.* 2009;113(20):4942-4954.

421. Wu JH, Goswami R, Cai X, Exum ST, Huang X, Zhang L, Brian L, Premont RT, Poppel K, Freedman NJ. Regulation of the platelet-derived growth factor receptor-beta by G protein-coupled receptor kinase-5 in vascular smooth muscle cells involves the phosphatase Shp2. *J Biol Chem.* 2006;281(49):37758-37772.
422. Mitra SK, Schlaepfer DD. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol.* 2006;18(5):516-523.
423. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Damsky CH, Schlaepfer DD. FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *Nat Cell Biol.* 2000;2(5):249-256.
424. Schlaepfer DD, Hou S, Lim ST, Tomar A, Yu H, Lim Y, Hanson DA, Uryu SA, Molina J, Mitra SK. Tumor necrosis factor-alpha stimulates focal adhesion kinase activity required for mitogen-activated kinase-associated interleukin 6 expression. *J Biol Chem.* 2007;282(24):17450-17459.
425. Rozengurt E. Mitogenic signaling pathways induced by G protein-coupled receptors. *J Cell Physiol.* 2007;213(3):589-602.
426. Schaller MD. Biochemical signals and biological responses elicited by the focal adhesion kinase. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1540(1):1-21.
427. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6(1):56-68.
428. Xie B, Zhao J, Kitagawa M, Durbin J, Madri JA, Guan JL, Fu XY. Focal adhesion kinase activates Stat1 in integrin-mediated cell migration and adhesion. *J Biol Chem.* 2001;276(22):19512-19523.
429. Harte MT, Hildebrand JD, Burnham MR, Bouton AH, Parsons JT. p130Cas, a substrate associated with v-Src and v-Crk, localizes to focal adhesions and binds to focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 1996;271(23):13649-13655.
430. Bellis SL, Miller JT, Turner CE. Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase. *J Biol Chem.* 1995;270(29):17437-17441.
431. Paulin R, Courboulin A, Barrier M, Bonnet S. From oncoproteins/tumor suppressors to microRNAs, the newest therapeutic targets for pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl).* 2011.
432. Paulin R, Courboulin A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, Cote J, Provencher S, Sussman MA, Bonnet S. Signal Transducers and Activators of Transcription-3/Pim1 Axis Plays a Critical Role in the Pathogenesis of Human Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2011;123(11):1205-1215.
433. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ, Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med.* 2011;208(3):535-548.
434. World Medical Association Declaration of Helsinki. Recommendations guiding physicians in biomedical research involving human subjects. *Cardiovasc Res.* 1997;35(1):2-3.
435. Lietha D, Cai X, Ceccarelli DF, Li Y, Schaller MD, Eck MJ. Structural basis for the autoinhibition of focal adhesion kinase. *Cell.* 2007;129(6):1177-1187.
436. Schlaepfer DD, Hanks SK, Hunter T, van der Geer P. Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase. *Nature.* 1994;372(6508):786-791.
437. Calalb MB, Polte TR, Hanks SK. Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases. *Mol Cell Biol.* 1995;15(2):954-963.
438. Taylor JM, Mack CP, Nolan K, Regan CP, Owens GK, Parsons JT. Selective expression of an endogenous inhibitor of FAK regulates proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2001;21(5):1565-1572.
439. Bond M, Sala-Newby GB, Newby AC. Focal adhesion kinase (FAK)-dependent regulation of S-phase kinase-associated protein-2 (Skp-2) stability. A novel mechanism regulating smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem.* 2004;279(36):37304-37310.
440. Mukhopadhyay UK, Mooney P, Jia L, Eves R, Raptis L, Mak AS. Double game: Src-Stat3 versus p53-PTEN in cellular migration and invasion. *Mol Cell Biol.* 2010;30(21):4980-4995.
441. Gao H, Priebe W, Glod J, Banerjee D. Activation of signal transducers and activators of transcription 3 and focal adhesion kinase by stromal cell-derived factor 1 is required for migration of human mesenchymal stem cells in response to tumor cell-conditioned medium. *Stem Cells.* 2009;27(4):857-865.
442. Geiger B, Bershadsky A. Assembly and mechanosensory function of focal contacts. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(5):584-592.

443. Schaller MD. Paxillin: a focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*. 2001;20(44):6459-6472.
444. Horwitz AR, Parsons JT. Cell migration--movin' on. *Science*. 1999;286(5442):1102-1103.
445. Rottner K, Behrendt B, Small JV, Wehland J. VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol*. 1999;1(5):321-322.
446. Dauer DJ, Ferraro B, Song L, Yu B, Mora L, Buettner R, Enkemann S, Jove R, Haura EB. Stat3 regulates genes common to both wound healing and cancer. *Oncogene*. 2005;24(21):3397-3408.
447. Verma NK, Dourlat J, Davies AM, Long A, Liu WQ, Garbay C, Kelleher D, Volkov Y. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *J Biol Chem*. 2009;284(18):12349-12362.
448. Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V, Cao X. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol*. 2006;172(2):245-257.
449. Gao SP, Bromberg JF. Touched and moved by STAT3. *Sci STKE*. 2006;2006(343):pe30.
450. Silver DL, Naora H, Liu J, Cheng W, Montell DJ. Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res*. 2004;64(10):3550-3558.
451. Ahn S, Park H. XIAP is essential for shear stress-enhanced Tyr-576 phosphorylation of FAK. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;399(2):256-261.
452. Hu Y, Bock G, Wick G, Xu Q. Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *FASEB J*. 1998;12(12):1135-1142.
453. O'Callaghan CJ, Williams B. Mechanical strain-induced extracellular matrix production by human vascular smooth muscle cells: role of TGF-beta(1). *Hypertension*. 2000;36(3):319-324.
454. Lehoux S, Esposito B, Merval R, Tedgui A. Differential regulation of vascular focal adhesion kinase by steady stretch and pulsatility. *Circulation*. 2005;111(5):643-649.
455. Lim ST, Chen XL, Lim Y, Hanson DA, Vo TT, Howerton K, Larocque N, Fisher SJ, Schlaepfer DD, Ilic D. Nuclear FAK promotes cell proliferation and survival through FERM-enhanced p53 degradation. *Mol Cell*. 2008;29(1):9-22.
456. Lim ST, Miller NL, Nam JO, Chen XL, Lim Y, Schlaepfer DD. Pyk2 inhibition of p53 as an adaptive and intrinsic mechanism facilitating cell proliferation and survival. *J Biol Chem*. 2010;285(3):1743-1753.
457. Cance WG, Golubovskaya VM. Focal adhesion kinase versus p53: apoptosis or survival? *Sci Signal*. 2008;1(20):pe22.
458. Cordes KR, Sheehy NT, White MP, Berry EC, Morton SU, Muth AN, Lee TH, Miano JM, Ivey KN, Srivastava D. miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature*. 2009;460(7256):705-710.
459. Boettger T, Beetz N, Kostin S, Schneider J, Kruger M, Hein L, Braun T. Acquisition of the contractile phenotype by murine arterial smooth muscle cells depends on the Mir143/145 gene cluster. *J Clin Invest*. 2009;119(9):2634-2647.
460. Quintavalle M, Elia L, Condorelli G, Courtneidge SA. MicroRNA control of podosome formation in vascular smooth muscle cells in vivo and in vitro. *J Cell Biol*. 2010;189(1):13-22.
461. Meloche J, Paulin R, Courboulain A, Lambert C, Barrier M, Bonnet P, Bissierier M, Roy M, Sussman MA, Agharazii M, Bonnet S. RAGE-Dependent Activation of the Oncoprotein Pim1 Plays a Critical Role in Systemic Vascular Remodeling Processes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011.
462. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP, Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(16):9488-9493.
463. Farrukh IS, Peng W, Orlinska U, Hoidal JR. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca(2+)-activated K(+)-channel opener. *Am J Physiol*. 1998;274(2 Pt 1):L186-195.
464. Peng W, Hoidal JR, Farrukh IS. Role of a novel KCa opener in regulating K+ channels of hypoxic human pulmonary vascular cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1999;20(4):737-745.
465. Oka M, Karoor V, Homma N, Nagaoka T, Sakao E, Golembeski SM, Limbird J, Imamura M, Gebb SA, Fagan KA, McMurtry IF. Dehydroepiandrosterone upregulates soluble guanylate cyclase and inhibits hypoxic pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res*. 2007;74(3):377-387.
466. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev*. 2006;86(1):1-23.

467. Kopplov K, Wayss K, Enzmann H, Mayer D. Dehydroepiandrosterone causes hyperplasia and impairs regeneration in rat liver. *Int J Oncol*. 2005;27(6):1551-1558.
468. Zakrzewicz A, Hecker M, Marsh LM, Kwapiszewska G, Nejman B, Long L, Seeger W, Schermuly RT, Morrell NW, Morty RE, Eickelberg O. Receptor for activated C-kinase 1, a novel interaction partner of type II bone morphogenetic protein receptor, regulates smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2007;115(23):2957-2968.
469. Tada Y, Majka S, Carr M, Harral J, Crona D, Kuriyama T, West J. Molecular effects of loss of BMPR2 signaling in smooth muscle in a transgenic mouse model of PAH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;292(6):L1556-1563.
470. Nitabach MN, Llamas DA, Thompson II, Collins KA, Holmes TC. Phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent modes of modulation of shaker family voltage-gated potassium channels by SRC family protein tyrosine kinases. *J Neurosci*. 2002;22(18):7913-7922.
471. Jahn MP, Jacob MH, Gomes LF, Duarte R, Araujo AS, Bello-Klein A, Ribeiro MF, Kucharski LC. The effect of long-term DHEA treatment on glucose metabolism, hydrogen peroxide and thioredoxin levels in the skeletal muscle of diabetic rats. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;120(1):38-44.
472. Li J, Piao YF, Jiang Z, Chen L, Sun HB. Silencing of signal transducer and activator of transcription 3 expression by RNA interference suppresses growth of human hepatocellular carcinoma in tumor-bearing nude mice. *World J Gastroenterol*. 2009;15(21):2602-2608.
473. Glienke W, Maute L, Wicht J, Bergmann L. Curcumin inhibits constitutive STAT3 phosphorylation in human pancreatic cancer cell lines and downregulation of survivin/BIRC5 gene expression. *Cancer Invest*. 2010;28(2):166-171.
474. Dumas de la Roque E, Savineau JP, Bonnet S. Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther*. 2010;126(2):186-199.
475. Gough DJ, Corlett A, Schlessinger K, Wegrzyn J, Larner AC, Levy DE. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science*. 2009;324(5935):1713-1716.
476. Zhong Z, Wen Z, Darnell JE, Jr. Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6. *Science*. 1994;264(5155):95-98.
477. Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, Eddahibi S. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res*. 2009;10:6.
478. Alioua A, Mahajan A, Nishimaru K, Zarei MM, Stefani E, Toro L. Coupling of c-Src to large conductance voltage- and Ca²⁺-activated K⁺ channels as a new mechanism of agonist-induced vasoconstriction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14560-14565.
479. Dey D, Shepherd A, Pachuau J, Martin-Caraballo M. Leukemia inhibitory factor regulates trafficking of T-type Ca²⁺ channels. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300(3):C576-587.
480. Trimarchi T, Pachuau J, Shepherd A, Dey D, Martin-Caraballo M. CNTF-evoked activation of JAK and ERK mediates the functional expression of T-type Ca²⁺ channels in chicken nodose neurons. *J Neurochem*. 2009;108(1):246-259.
481. Hu XQ, Singh N, Mukhopadhyay D, Akbarali HI. Modulation of voltage-dependent Ca²⁺ channels in rabbit colonic smooth muscle cells by c-Src and focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. 1998;273(9):5337-5342.
482. Aznar S, Valeron PF, del Rincon SV, Perez LF, Perona R, Lacal JC. Simultaneous tyrosine and serine phosphorylation of STAT3 transcription factor is involved in Rho A GTPase oncogenic transformation. *Mol Biol Cell*. 2001;12(10):3282-3294.
483. Lin MT, Lin BR, Chang CC, Chu CY, Su HJ, Chen ST, Jeng YM, Kuo ML. IL-6 induces AGS gastric cancer cell invasion via activation of the c-Src/RhoA/ROCK signaling pathway. *Int J Cancer*. 2007;120(12):2600-2608.
484. Homma N, Nagaoka T, Karoor V, Imamura M, Taraseviciene-Stewart L, Walker LA, Fagan KA, McMurtry IF, Oka M. Involvement of RhoA/Rho kinase signaling in protection against monocrotaline-induced pulmonary hypertension in pneumonectomized rats by dehydroepiandrosterone. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;295(1):L71-78.
485. de Frutos S, Caldwell E, Nitta CH, Kanagy NL, Wang J, Wang W, Walker MK, Gonzalez Bosc LV. NFATc3 contributes to intermittent hypoxia-induced arterial remodeling in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;299(2):H356-363.

486. de Frutos S, Ramiro-Diaz JM, Nitta CH, Sherpa ML, Gonzalez Bosc LV. Endothelin-1 contributes to increased NFATc3 activation by chronic hypoxia in pulmonary arteries. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011.
487. Masri FA, Xu W, Comhair SA, Asosingh K, Koo M, VasANJI A, Drazba J, Anand-Apte B, Erzurum SC. Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007;293(3):L548-554.
488. Mukhopadhyay S, Shah M, Xu F, Patel K, Tuder RM, Sehgal PB. Cytoplasmic provenance of STAT3 and PY-STAT3 in the endolysosomal compartments in pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells: implications in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(3):L449-468.
489. Hansmann G, Wagner RA, Schellong S, Perez VA, Urashima T, Wang L, Sheikh AY, Suen RS, Stewart DJ, Rabinovitch M. Pulmonary arterial hypertension is linked to insulin resistance and reversed by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *Circulation*. 2007;115(10):1275-1284.
490. Ji JD, Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon HJ, Sohn J, Song GG. Inhibition of IL-10-induced STAT3 activation by 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2. *Rheumatology (Oxford)*. 2005;44(8):983-988.
491. Kim HJ, Rho YH, Choi SJ, Lee YH, Cheon H, Um JW, Sohn J, Song GG, Ji JD. 15-Deoxy-delta12,14-PGJ2 inhibits IL-6-induced Stat3 phosphorylation in lymphocytes. *Exp Mol Med*. 2005;37(3):179-185.
492. Wang LH, Yang XY, Zhang X, Huang J, Hou J, Li J, Xiong H, Mihalic K, Zhu H, Xiao W, Farrar WL. Transcriptional inactivation of STAT3 by PPARgamma suppresses IL-6-responsive multiple myeloma cells. *Immunity*. 2004;20(2):205-218.
493. Ehrmann J, Strakova N, Vrzalikova K, Hezova R, Kolar Z. Expression of STATs and their inhibitors SOCS and PIAS in brain tumors. In vitro and in vivo study. *Neoplasma*. 2008;55(6):482-487.
494. Pocztakova H, Bogdanova K, Uherkova L, Cervenkova K, Riegrova D, Rypka M, Vesely J. Dehydroepiandrosterone effects on the mRNA levels of peroxisome proliferator-activated receptors and their coactivators in human hepatoma HepG2 cells. *Gen Physiol Biophys*. 2007;26(4):268-274.
495. Juurlink DN, Gomes T, Lipscombe LL, Austin PC, Hux JE, Mamdani MM. Adverse cardiovascular events during treatment with pioglitazone and rosiglitazone: population based cohort study. *BMJ*. 2009;339:b2942.
496. Frame MC. Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1602(2):114-130.
497. Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. 2003;22(4):337-358.
498. Tokarski JS, Newitt JA, Chang CY, Cheng JD, Wittekind M, Kiefer SE, Kish K, Lee FY, Borzilleri R, Lombardo LJ, Xie D, Zhang Y, Klei HE. The structure of Dasatinib (BMS-354825) bound to activated ABL kinase domain elucidates its inhibitory activity against imatinib-resistant ABL mutants. *Cancer Res*. 2006;66(11):5790-5797.
499. Konig H, Copland M, Chu S, Jove R, Holyoake TL, Bhatia R. Effects of dasatinib on SRC kinase activity and downstream intracellular signaling in primitive chronic myelogenous leukemia hematopoietic cells. *Cancer Res*. 2008;68(23):9624-9633.
500. Rasheed W, Flaim B, Seymour JF. Reversible severe pulmonary hypertension secondary to dasatinib in a patient with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2009;33(6):861-864.
501. Mattei D, Feola M, Orzan F, Mordini N, Rapezzi D, Gallamini A. Reversible dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricle failure in a previously allografted CML patient. *Bone Marrow Transplant*. 2009;43(12):967-968.
502. Hennigs JK, Keller G, Baumann HJ, Honecker F, Kluge S, Bokemeyer C, Brummendorf TH, Klose H. Multi tyrosine kinase inhibitor dasatinib as novel cause of severe pre-capillary pulmonary hypertension? *BMC Pulm Med*. 2011;11:30.
503. Dumitrescu D, Seck C, Ten Freyhaus H, Gerhardt F, Erdmann E, Rosenkranz S. Fully reversible pulmonary arterial hypertension associated with dasatinib treatment for chronic myeloid leukaemia. *Eur Respir J*. 2011;38(1):218-220.
504. Byers LA, Sen B, Saigal B, Diao L, Wang J, Nanjundan M, Cascone T, Mills GB, Heymach JV, Johnson FM. Reciprocal regulation of c-Src and STAT3 in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(22):6852-6861.

505. Rajeshkumar NV, Tan AC, De Oliveira E, Womack C, Wombwell H, Morgan S, Warren MV, Walker J, Green TP, Jimeno A, Messersmith WA, Hidalgo M. Antitumor effects and biomarkers of activity of AZD0530, a Src inhibitor, in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(12):4138-4146.
506. Pham NA, Magalhaes JM, Do T, Schwock J, Dhani N, Cao PJ, Hill RP, Hedley DW. Activation of Src and Src-associated signaling pathways in relation to hypoxia in human cancer xenograft models. *Int J Cancer.* 2009;124(2):280-286.
507. Bromberg J. Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest.* 2002;109(9):1139-1142.
508. Buettner R, Mora LB, Jove R. Activated STAT signaling in human tumors provides novel molecular targets for therapeutic intervention. *Clin Cancer Res.* 2002;8(4):945-954.
509. Ryu K, Choy E, Yang C, Susa M, Hornicek FJ, Mankin H, Duan Z. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 (Stat3) pathway in osteosarcoma cells and overexpression of phosphorylated-Stat3 correlates with poor prognosis. *J Orthop Res.* 28(7):971-978.
510. Khoury JD, Medeiros LJ, Rassidakis GZ, Yared MA, Tsioli P, Leventaki V, Schmitt-Graeff A, Herling M, Amin HM, Lai R. Differential expression and clinical significance of tyrosine-phosphorylated STAT3 in ALK+ and ALK- anaplastic large cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(10 Pt 1):3692-3699.
511. Masuda M, Suzui M, Yasumatu R, Nakashima T, Kuratomi Y, Azuma K, Tomita K, Komiyama S, Weinstein IB. Constitutive activation of signal transducers and activators of transcription 3 correlates with cyclin D1 overexpression and may provide a novel prognostic marker in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002;62(12):3351-3355.
512. Benekli M, Xia Z, Donohue KA, Ford LA, Pixley LA, Baer MR, Baumann H, Wetzler M. Constitutive activity of signal transducer and activator of transcription 3 protein in acute myeloid leukemia blasts is associated with short disease-free survival. *Blood.* 2002;99(1):252-257.
513. Horiguchi A, Oya M, Shimada T, Uchida A, Marumo K, Murai M. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 in renal cell carcinoma: a study of incidence and its association with pathological features and clinical outcome. *J Urol.* 2002;168(2):762-765.
514. Bromberg JF, Horvath CM, Besser D, Lathem WW, Darnell JE, Jr. Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):2553-2558.
515. Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R. Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol.* 1998;18(5):2545-2552.
516. Daino H, Matsumura I, Takada K, Odajima J, Tanaka H, Ueda S, Shibayama H, Ikeda H, Hibi M, Machii T, Hirano T, Kanakura Y. Induction of apoptosis by extracellular ubiquitin in human hematopoietic cells: possible involvement of STAT3 degradation by proteasome pathway in interleukin 6-dependent hematopoietic cells. *Blood.* 2000;95(8):2577-2585.
517. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999;98(3):295-303.
518. Wegrzyn J, Potla R, Chwae YJ, Sepuri NB, Zhang Q, Koeck T, Derecka M, Szczepanek K, Szlag M, Gornicka A, Moh A, Moghaddas S, Chen Q, Bobbili S, Cichy J, Dulak J, Baker DP, Wolfman A, Stuehr D, Hassan MO, Fu XY, Avadhani N, Drake JL, Fawcett P, Lesnfsky EJ, Larner AC. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science.* 2009;323(5915):793-797.
519. Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, Lufei C, Zeng Q, Cao X. GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol.* 2004;24(19):8447-8456.
520. Lu H, Cao X. GRIM-19 is essential for maintenance of mitochondrial membrane potential. *Mol Biol Cell.* 2008;19(5):1893-1902.
521. Lufei C, Ma J, Huang G, Zhang T, Novotny-Diermayr V, Ong CT, Cao X. GRIM-19, a death-regulatory gene product, suppresses Stat3 activity via functional interaction. *EMBO J.* 2003;22(6):1325-1335.
522. Zhang J, Yang J, Roy SK, Tininini S, Hu J, Bromberg JF, Poli V, Stark GR, Kalvakolanu DV. The cell death regulator GRIM-19 is an inhibitor of signal transducer and activator of transcription 3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(16):9342-9347.
523. Hagihara K, Nishikawa T, Sugamata Y, Song J, Isobe T, Taga T, Yoshizaki K. Essential role of STAT3 in cytokine-driven NF-kappaB-mediated serum amyloid A gene expression. *Genes Cells.* 2005;10(11):1051-1063.

524. Yu Z, Zhang W, Kone BC. Signal transducers and activators of transcription 3 (STAT3) inhibits transcription of the inducible nitric oxide synthase gene by interacting with nuclear factor kappaB. *Biochem J.* 2002;367(Pt 1):97-105.
525. Yoshida Y, Kumar A, Koyama Y, Peng H, Arman A, Boch JA, Auron PE. Interleukin 1 activates STAT3/nuclear factor-kappaB cross-talk via a unique TRAF6- and p65-dependent mechanism. *J Biol Chem.* 2004;279(3):1768-1776.
526. Wegenka UM, Buschmann J, Luttkien C, Heinrich PC, Horn F. Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol Cell Biol.* 1993;13(1):276-288.
527. Palaty CK, Kalmar G, Tai G, Oh S, Amankawa L, Affolter M, Aebersold R, Pelech SL. Identification of the autophosphorylation sites of the *Xenopus laevis* Pim-1 proto-oncogene-encoded protein kinase. *J Biol Chem.* 1997;272(16):10514-10521.
528. Nga ME, Swe NN, Chen KT, Shen L, Lilly MB, Chan SP, Salto-Tellez M, Das K. PIM-1 kinase expression in adipocytic neoplasms: diagnostic and biological implications. *Int J Exp Pathol.* 91(1):34-43.
529. Akagi T, Shih LY, Ogawa S, Gerss J, Moore SR, Schreck R, Kawamata N, Liang DC, Sanada M, Nannya Y, Deneberg S, Zachariadis V, Nordgren A, Song JH, Dugas M, Lehmann S, Koeffler HP. Single nucleotide polymorphism genomic arrays analysis of t(8;21) acute myeloid leukemia cells. *Haematologica.* 2009;94(9):1301-1306.
530. Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R, Martinez-Torrecuadrada JL, Sanchez-Carbayo M, Casal JI. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics.* 2009;8(10):2382-2395.
531. Zhu Y, Hollmen J, Raty R, Aalto Y, Nagy B, Elonen E, Kere J, Mannila H, Franssila K, Knuutila S. Investigatory and analytical approaches to differential gene expression profiling in mantle cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2002;119(4):905-915.
532. de Vos S, Krug U, Hofmann WK, Pinkus GS, Swerdlow SH, Wachsman W, Grogan TM, Said JW, Koeffler HP. Cell cycle alterations in the blastoid variant of mantle cell lymphoma (MCL-BV) as detected by gene expression profiling of mantle cell lymphoma (MCL) and MCL-BV. *Diagn Mol Pathol.* 2003;12(1):35-43.
533. Hsi ED, Jung SH, Lai R, Johnson JL, Cook JR, Jones D, Devos S, Cheson BD, Damon LE, Said J. Ki67 and PIM1 expression predict outcome in mantle cell lymphoma treated with high dose therapy, stem cell transplantation and rituximab: a Cancer and Leukemia Group B 59909 correlative science study. *Leuk Lymphoma.* 2008;49(11):2081-2090.
534. Mahadevan D, Spier C, Della Croce K, Miller S, George B, Riley C, Warner S, Grogan TM, Miller TP. Transcript profiling in peripheral T-cell lymphoma, not otherwise specified, and diffuse large B-cell lymphoma identifies distinct tumor profile signatures. *Mol Cancer Ther.* 2005;4(12):1867-1879.
535. He HC, Bi XC, Zheng ZW, Dai QS, Han ZD, Liang YX, Ye YK, Zeng GH, Zhu G, Zhong WD. Real-time quantitative RT-PCR assessment of PIM-1 and hK2 mRNA expression in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Med Oncol.* 2009;26(3):303-308.
536. Reiser-Erkan C, Erkan M, Pan Z, Bekasi S, Giese NA, Streit S, Michalski CW, Friess H, Kleeff J. Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(9):1352-1359.
537. Meyer OC, Fertig N, Lucas M, Somogyi N, Medsger TA, Jr. Disease subsets, antinuclear antibody profile, and clinical features in 127 French and 247 US adult patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol.* 2007;34(1):104-109.
538. Chang M, Kanwar N, Feng E, Siu A, Liu X, Ma D, Jongstra J. PIM kinase inhibitors downregulate STAT3(Tyr705) phosphorylation. *Mol Cancer Ther.* 2010;9(9):2478-2487.
539. Zhang P, Wang H, Min X, Wang Y, Tang J, Cheng J, Li D, Chen X, Cheng F, Wang N, Yang H. Pim-3 is expressed in endothelial cells and promotes vascular tube formation. *J Cell Physiol.* 2009;220(1):82-90.
540. Chung CD, Liao J, Liu B, Rao X, Jay P, Berta P, Shuai K. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science.* 1997;278(5344):1803-1805.
541. Long J, Wang G, Matsuura I, He D, Liu F. Activation of Smad transcriptional activity by protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(1):99-104.
542. Meulmeester E, Melchior F. Cell biology: SUMO. *Nature.* 2008;452(7188):709-711.

543. Kotaja N, Karvonen U, Janne OA, Palvimo JJ. PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases. *Mol Cell Biol.* 2002;22(14):5222-5234.
544. Schmidt D, Muller S. Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2872-2877.
545. Kadare G, Toutant M, Formstecher E, Corvol JC, Carnaud M, Bouterin MC, Girault JA. PIAS1-mediated sumoylation of focal adhesion kinase activates its autophosphorylation. *J Biol Chem.* 2003;278(48):47434-47440.
546. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature.* 1997;387(6636):917-921.
547. Liu E, Cote JF, Vuori K. Negative regulation of FAK signaling by SOCS proteins. *EMBO J.* 2003;22(19):5036-5046.
548. Fakharzadeh SS, Trusko SP, George DL. Tumorigenic potential associated with enhanced expression of a gene that is amplified in a mouse tumor cell line. *EMBO J.* 1991;10(6):1565-1569.
549. Momand J, Zambetti GP, Olson DC, George D, Levine AJ. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell.* 1992;69(7):1237-1245.
550. Oliner JD, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Gyuris J, Kinzler KW, Vogelstein B. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53. *Nature.* 1993;362(6423):857-860.
551. Ionov Y, Le X, Tunquist BJ, Sweetenham J, Sachs T, Ryder J, Johnson T, Lilly MB, Kraft AS. Pim-1 protein kinase is nuclear in Burkitt's lymphoma: nuclear localization is necessary for its biologic effects. *Anticancer Res.* 2003;23(1A):167-178.
552. Milne D, Kampanis P, Nicol S, Dias S, Campbell DG, Fuller-Pace F, Meek D. A novel site of AKT-mediated phosphorylation in the human MDM2 onco-protein. *FEBS Lett.* 2004;577(1-2):270-276.
553. Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D, Hemmings BA. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem.* 2004;279(34):35510-35517.
554. Zhou BP, Liao Y, Xia W, Zou Y, Spohn B, Hung MC. HER-2/neu induces p53 ubiquitination via Akt-mediated MDM2 phosphorylation. *Nat Cell Biol.* 2001;3(11):973-982.
555. Mayo LD, Donner DB. A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway promotes translocation of Mdm2 from the cytoplasm to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11598-11603.
556. Ashcroft M, Ludwig RL, Woods DB, Copeland TD, Weber HO, MacRae EJ, Vousden KH. Phosphorylation of HDM2 by Akt. *Oncogene.* 2002;21(13):1955-1962.
557. Ogawara Y, Kishishita S, Obata T, Isazawa Y, Suzuki T, Tanaka K, Masuyama N, Gotoh Y. Akt enhances Mdm2-mediated ubiquitination and degradation of p53. *J Biol Chem.* 2002;277(24):21843-21850.
558. Gottlieb TM, Leal JF, Seger R, Taya Y, Oren M. Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis. *Oncogene.* 2002;21(8):1299-1303.
559. Burch LR, Scott M, Pohler E, Meek D, Hupp T. Phage-peptide display identifies the interferon-responsive, death-activated protein kinase family as a novel modifier of MDM2 and p21WAF1. *J Mol Biol.* 2004;337(1):115-128.
560. Lim ST, Mikolon D, Stupack DG, Schlaepfer DD. FERM control of FAK function: implications for cancer therapy. *Cell Cycle.* 2008;7(15):2306-2314.
561. Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L. Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(11):5667-5672.
562. Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM. An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(23):12969-12973.
563. Ema M, Hirota K, Mimura J, Abe H, Yodoi J, Sogawa K, Poellinger L, Fujii-Kuriyama Y. Molecular mechanisms of transcription activation by HLF and HIF1alpha in response to hypoxia: their stabilization and redox signal-induced interaction with CBP/p300. *EMBO J.* 1999;18(7):1905-1914.
564. Avantiaggiati ML, Ogryzko V, Gardner K, Giordano A, Levine AS, Kelly K. Recruitment of p300/CBP in p53-dependent signal pathways. *Cell.* 1997;89(7):1175-1184.
565. Ruas JL, Berchner-Pfannschmidt U, Malik S, Gradin K, Fandrey J, Roeder RG, Pereira T, Poellinger L. Complex regulation of the transactivation function of hypoxia-inducible factor-1 alpha by direct

- interaction with two distinct domains of the CREB-binding protein/p300. *J Biol Chem.* 2010;285(4):2601-2609.
566. Gray MJ, Zhang J, Ellis LM, Semenza GL, Evans DB, Watowich SS, Gallick GE. HIF-1 α , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene.* 2005;24(19):3110-3120.
567. Sisk TJ, Gourley T, Roys S, Chang CH. MHC class II transactivator inhibits IL-4 gene transcription by competing with NF-AT to bind the coactivator CREB binding protein (CBP)/p300. *J Immunol.* 2000;165(5):2511-2517.
568. Kim JH, Kim K, Youn BU, Jin HM, Kim N. MHC class II transactivator negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation by downregulating NFATc1 and OSCAR. *Cell Signal.* 2010;22(9):1341-1349.
569. Davies PF. Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev.* 1995;75(3):519-560.
570. Kakisis JD, Pradhan S, Cordova A, Liapis CD, Sumpio BE. The role of STAT-3 in the mediation of smooth muscle cell response to cyclic strain. *Int J Biochem Cell Biol.* 2005;37(7):1396-1406.
571. Tu ML, Wang HQ, Sun XD, Chen LJ, Peng XC, Yuan YH, Li RM, Ruan XZ, Li DS, Xu YJ, Ke ZJ. Pim-1 is up-regulated by shear stress and is involved in shear stress-induced proliferation of rat mesenchymal stem cells. *Life Sci.* 2011;88(5-6):233-238.
572. Ingber DE. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006;20(7):811-827.
573. Gao M, Sotomayor M, Villa E, Lee EH, Schulten K. Molecular mechanisms of cellular mechanics. *Phys Chem Chem Phys.* 2006;8(32):3692-3706.
574. Gui P, Chao JT, Wu X, Yang Y, Davis GE, Davis MJ. Coordinated regulation of vascular Ca²⁺ and K⁺ channels by integrin signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2010;674:69-79.
575. Waitkus-Edwards KR, Martinez-Lemus LA, Wu X, Trzeciakowski JP, Davis MJ, Davis GE, Meininger GA. α (4) β (1) Integrin activation of L-type calcium channels in vascular smooth muscle causes arteriole vasoconstriction. *Circ Res.* 2002;90(4):473-480.
576. Fang Z, Yao W, Fu Y, Wang LY, Li Z, Yang Y, Shi Y, Qiu S, Fan J, Zha X. Increased integrin α 5 β 1 heterodimer formation and reduced c-Jun expression are involved in integrin β 1 overexpression-mediated cell growth arrest. *J Cell Biochem.* 2010;109(2):383-395.
577. Yang Y, Wu X, Gui P, Wu J, Sheng JZ, Ling S, Braun AP, Davis GE, Davis MJ. α 5 β 1 integrin engagement increases large conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channel current and Ca²⁺ sensitivity through c-src-mediated channel phosphorylation. *J Biol Chem.* 2010;285(1):131-141.
578. Makino A, Prossnitz ER, Bunemann M, Wang JM, Yao W, Schmid-Schonbein GW. G protein-coupled receptors serve as mechanosensors for fluid shear stress in neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290(6):C1633-1639.
579. Franchini KG, Torsoni AS, Soares PH, Saad MJ. Early activation of the multicomponent signaling complex associated with focal adhesion kinase induced by pressure overload in the rat heart. *Circ Res.* 2000;87(7):558-565.
580. Torsoni AS, Constancio SS, Nadruz W, Jr., Hanks SK, Franchini KG. Focal adhesion kinase is activated and mediates the early hypertrophic response to stretch in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2003;93(2):140-147.
581. Torsoni AS, Marin TM, Velloso LA, Franchini KG. RhoA/ROCK signaling is critical to FAK activation by cyclic stretch in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;289(4):H1488-1496.
582. Eble DM, Strait JB, Govindarajan G, Lou J, Byron KL, Samarel AM. Endothelin-induced cardiac myocyte hypertrophy: role for focal adhesion kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278(5):H1695-1707.
583. Taylor JM, Rovin JD, Parsons JT. A role for focal adhesion kinase in phenylephrine-induced hypertrophy of rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem.* 2000;275(25):19250-19257.
584. Umar S, Hessel M, Steendijk P, Bax W, Schutte C, Schalijs M, van der Wall E, Atsma D, van der Laarse A. Activation of signaling molecules and matrix metalloproteinases in right ventricular myocardium of rats with pulmonary hypertension. *Pathol Res Pract.* 2007;203(12):863-872.
585. Fonseca PM, Inoue RY, Kobarg CB, Crosara-Alberto DP, Kobarg J, Franchini KG. Targeting to C-terminal myosin heavy chain may explain mechanotransduction involving focal adhesion kinase in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2005;96(1):73-81.

586. Yi XP, Zhou J, Huber L, Qu J, Wang X, Gerdes AM, Li F. Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(6):H2509-2515.
587. Senyo SE, Koshman YE, Russell B. Stimulus interval, rate and direction differentially regulate phosphorylation for mechanotransduction in neonatal cardiac myocytes. *FEBS Lett.* 2007;581(22):4241-4247.
588. Peng X, Kraus MS, Wei H, Shen TL, Pariaut R, Alcaraz A, Ji G, Cheng L, Yang Q, Kotlikoff MI, Chen J, Chien K, Gu H, Guan JL. Inactivation of focal adhesion kinase in cardiomyocytes promotes eccentric cardiac hypertrophy and fibrosis in mice. *J Clin Invest.* 2006;116(1):217-227.
589. DiMichele LA, Doherty JT, Rojas M, Beggs HE, Reichardt LF, Mack CP, Taylor JM. Myocyte-restricted focal adhesion kinase deletion attenuates pressure overload-induced hypertrophy. *Circ Res.* 2006;99(6):636-645.
590. Clemente CF, Tornatore TF, Theizen TH, Deckmann AC, Pereira TC, Lopes-Cendes I, Souza JR, Franchini KG. Targeting focal adhesion kinase with small interfering RNA prevents and reverses load-induced cardiac hypertrophy in mice. *Circ Res.* 2007;101(12):1339-1348.
591. Peng X, Wu X, Druso JE, Wei H, Park AY, Kraus MS, Alcaraz A, Chen J, Chien S, Cerione RA, Guan JL. Cardiac developmental defects and eccentric right ventricular hypertrophy in cardiomyocyte focal adhesion kinase (FAK) conditional knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(18):6638-6643.
592. Tornatore TF, Dalla Costa AP, Clemente CF, Judice C, Rocco SA, Calegari VC, Cardoso L, Cardoso AC, Goncalves A, Jr., Franchini KG. A role for focal adhesion kinase in cardiac mitochondrial biogenesis induced by mechanical stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2011;300(3):H902-912.
593. Crosara-Alberto DP, Inoue RY, Costa CR. FAK signalling mediates NF-kappaB activation by mechanical stress in cardiac myocytes. *Clin Chim Acta.* 2009;403(1-2):81-86.
594. Aikawa R, Nagai T, Kudoh S, Zou Y, Tanaka M, Tamura M, Akazawa H, Takano H, Nagai R, Komuro I. Integrins play a critical role in mechanical stress-induced p38 MAPK activation. *Hypertension.* 2002;39(2):233-238.
595. Takeishi Y, Huang Q, Abe J, Glassman M, Che W, Lee JD, Kawakatsu H, Lawrence EG, Hoit BD, Berk BC, Walsh RA. Src and multiple MAP kinase activation in cardiac hypertrophy and congestive heart failure under chronic pressure-overload: comparison with acute mechanical stretch. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(9):1637-1648.
596. Willey CD, Palanisamy AP, Johnston RK, Mani SK, Shiraishi H, Tuxworth WJ, Zile MR, Balasubramanian S, Kuppaswamy D. STAT3 activation in pressure-overloaded feline myocardium: role for integrins and the tyrosine kinase BMX. *Int J Biol Sci.* 2008;4(3):184-199.
597. Kunisada K, Negoro S, Tone E, Funamoto M, Osugi T, Yamada S, Okabe M, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Signal transducer and activator of transcription 3 in the heart transduces not only a hypertrophic signal but a protective signal against doxorubicin-induced cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(1):315-319.
598. Negoro S, Kunisada K, Fujio Y, Funamoto M, Darville MI, Eizirik DL, Osugi T, Izumi M, Oshima Y, Nakaoka Y, Hirota H, Kishimoto T, Yamauchi-Takahara K. Activation of signal transducer and activator of transcription 3 protects cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation-induced oxidative stress through the upregulation of manganese superoxide dismutase. *Circulation.* 2001;104(9):979-981.
599. Stephanou A, Latchman DS. Transcriptional regulation of the heat shock protein genes by STAT family transcription factors. *Gene Expr.* 1999;7(4-6):311-319.
600. Yamauchi-Takahara K, Kishimoto T. A novel role for STAT3 in cardiac remodeling. *Trends Cardiovasc Med.* 2000;10(7):298-303.
601. Hilfiker-Kleiner D, Hilfiker A, Fuchs M, Kaminski K, Schaefer A, Schieffer B, Hillmer A, Schmiedl A, Ding Z, Podewski E, Poli V, Schneider MD, Schulz R, Park JK, Wollert KC, Drexler H. Signal transducer and activator of transcription 3 is required for myocardial capillary growth, control of interstitial matrix deposition, and heart protection from ischemic injury. *Circ Res.* 2004;95(2):187-195.
602. Lu Y, Zhou J, Xu C, Lin H, Xiao J, Wang Z, Yang B. JAK/STAT and PI3K/AKT pathways form a mutual transactivation loop and afford resistance to oxidative stress-induced apoptosis in cardiomyocytes. *Cell Physiol Biochem.* 2008;21(4):305-314.
603. Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem.* 2000;275(36):27832-27837.

604. Huang J, Kaminski PM, Edwards JG, Yeh A, Wolin MS, Frishman WH, Gewitz MH, Mathew R. Pyrrolidine dithiocarbamate restores endothelial cell membrane integrity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(6):L1250-1259.
605. Huang J, Wolk JH, Gewitz MH, Mathew R. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp Lung Res*. 2010;36(1):57-66.
606. Iwakura T, Mohri T, Hamatani T, Obana M, Yamashita T, Maeda M, Katakami N, Kaneto H, Oka T, Komuro I, Azuma J, Nakayama H, Fujio Y. STAT3/Pim-1 signaling pathway plays a crucial role in endothelial differentiation of cardiac resident Sca-1+ cells both in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol*. 2011;51(2):207-214.
607. Patton J. Mechanisms of macromolecular absorption by the lungs. *Adv Drug Deliv Rev*. 1996;19:3-36.
608. Patton JS, Bukar J, Nagarajan S. Inhaled insulin. *Adv Drug Deliv Rev*. 1999;35(2-3):235-247.
609. Gessler T, Seeger W, Schmehl T. Inhaled prostanoids in the therapy of pulmonary hypertension. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv*. 2008;21(1):1-12.
610. Opitz CF, Wensel R, Bettmann M, Schaffarczyk R, Linscheid M, Hetzer R, Ewert R. Assessment of the vasodilator response in primary pulmonary hypertension. Comparing prostacyclin and iloprost administered by either infusion or inhalation. *Eur Heart J*. 2003;24(4):356-365.
611. Patton JS, Fishburn CS, Weers JG. The lungs as a portal of entry for systemic drug delivery. *Proc Am Thorac Soc*. 2004;1(4):338-344.
612. Moss RB, Milla C, Colombo J, Accurso F, Zeitlin PL, Clancy JP, Spencer LT, Pilewski J, Waltz DA, Dorkin HL, Ferkol T, Pian M, Ramsey B, Carter BJ, Martin DB, Heald AE. Repeated aerosolized AAV-CFTR for treatment of cystic fibrosis: a randomized placebo-controlled phase 2B trial. *Hum Gene Ther*. 2007;18(8):726-732.
613. Hyde SC, Southern KW, Gileadi U, Fitzjohn EM, Mofford KA, Waddell BE, Gooi HC, Goddard CA, Hannavy K, Smyth SE, Egan JJ, Sorgi FL, Huang L, Cuthbert AW, Evans MJ, Colledge WH, Higgins CF, Webb AK, Gill DR. Repeat administration of DNA/liposomes to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *Gene Ther*. 2000;7(13):1156-1165.
614. Pringle IA, Hyde SC, Gill DR. Non-viral vectors in cystic fibrosis gene therapy: recent developments and future prospects. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9(8):991-1003.
615. Myers TJ, Granero-Molto F, Longobardi L, Li T, Yan Y, Spagnoli A. Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther*. 10(12):1663-1679.
616. Ozawa K, Sato K, Oh I, Ozaki K, Uchibori R, Obara Y, Kikuchi Y, Ito T, Okada T, Urabe M, Mizukami H, Kume A. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun*. 2008;30(3):121-127.