



**Implication de PIM1 dans la réparation de l'ADN par la jonction
d'extrémités non-homologues en Hypertension Artérielle
Pulmonaire**

Mémoire

Marie-Claude Lampron

Maitrise en biologie cellulaire et moléculaire

Maître ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Marie-Claude Lampron, 2018

RÉSUMÉ

Introduction : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie caractérisée par une augmentation des pressions pulmonaires menant à une défaillance cardiaque droite. Les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CMLAP) sont exposées à un niveau de stress accru notamment dû à l'inflammation des tissus et du milieu pseudo-hypoxique. Malgré cet environnement hostile, elles arrivent à proliférer et à survivre. Toutefois, cela entraîne une augmentation anormale du dommage à l'ADN. Il existe, cependant, un équilibre entre les dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation. PIM1, une onco-protéine à l'activité kinase, est surexprimée en HTAP. Elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, telles la survie et la prolifération, mais la voie de réparation du dommage à l'ADN n'a jamais été explorée en HTAP. De plus, l'inhibiteur de PIM1, le SGI-1776, a été testé en essai clinique en cancer, ainsi l'évaluation de son efficacité pour les patients HTAP pourrait rapidement être mise en place.

Objectifs : Évaluer le potentiel thérapeutique du SGI-1776 et élucider l'implication de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN en HTAP.

Méthodes/Résultats : Nous démontrons premièrement que les poumons de patients HTAP (n=10) ainsi que les CMLAP-HTAP (n=5) présentent une surexpression de PIM1. Sur ces mêmes tissus et lignées cellulaires, le précurseur de la reconnaissance des dommages à l'ADN (γ H2AX) est également augmenté comparativement aux sujets sains. Ce précurseur est essentiel à l'initiation de la réparation à l'ADN et l'inhibition de PIM1 par SGI-1776 (1,3 et 5 μ M) diminue la capacité de la réponse au dommage à l'ADN via la voie de la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) : le traitement cause une diminution des facteurs du NHEJ comme Ku70, DNA-PKcs et γ H2AX (n=4). Par essai comet, nous démontrons que les dommages sont toujours présents et que ceci diminue la prolifération (Ki67 n=3; p<0.05) et augmente l'apoptose (AnnexinV n=3; p<0.05). *In vivo*, le SGI-1776 diminue les pressions pulmonaires (n=30, 30 \pm 2mmHg vs 49 \pm 5mmHg) et diminue le remodelage des artères pulmonaires distales (H&E, 45% vs 65%), ce qui est principalement dû à la restauration de la balance entre la prolifération (Ki67 n=25; p<0.05) et l'apoptose (TUNEL n=25; p<0.05) des artères pulmonaires distales.

Conclusion : Nous avons démontré pour la première fois l'implication de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN en HTAP et que l'inhibition de son activité améliore *in vitro* et *in vivo* l'HTAP.

ABSTRACT

RATIONALE: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a fatal disease characterized by the narrowing of pulmonary arteries (PA) due to vascular remodeling. It is now established that this phenotype is associated with enhanced pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) proliferation and suppressed apoptosis. This phenotype is sustained in part by the activation of several DNA repair pathways allowing PASMC to survive despite the environmental stresses seen in PAH. PIM1 is an oncoprotein upregulated in PAH and that has been implicated in many pro-survival pathways in cancer, including DNA repair. PIM1 inhibitors, like SGI-1776, are already in clinical trials in cancer and could thus be beneficial to PAH patients.

OBJECTIVES: The aim of this study is to demonstrate the implication of PIM1 in the DNA damage response and the beneficial effect of its inhibition by SGI-1776 in human PAH-PASMC and in rat preclinical model of PAH.

METHODS/RESULTS: Using western blot we showed in both human PAH lungs (n=10) and PAH-PASMC (n=5) a significant upregulation of PIM1 compared to control donor (n=5). PIM1 upregulation in PAH was associated with a significant activation of DNA damage sensor (γ H2AX), which is critical for DNA repair initiation. We showed that PIM1 inhibition using SGI-1776 (1,3, and 5 μ M) significantly impaired DNA repair capacity in PASMC (n=4) with a significant repression of Ku70, DNA-PKcs, and γ H2AX and decreased ATM expression. We showed no diminution of DNA damage with SGI-1776 treatment (Comet Assay, n=3). As expected, the lack of DNA repair in SGI-1776 treated PAH-PASMC lead to a significant reduction in proliferation (Ki67 n=3; p<0.05) and resistance to apoptosis (AnnexinV assay n=3; p<0.05). *In vivo*, SGI-1776 10mg*kg⁻¹ given 3 times a week, improves significantly (n=30; p<0.05) monocrotaline-induced PH (decreased RVSP, mean PA pressures and vascular remodeling).

CONCLUSION: We demonstrated for the first time that PIM1 is implicated in DNA repair signaling in PAH-PASMC and that repressing its activity reverses PAH both *in vitro* and *in vivo*.

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
TABLE DES MATIÈRES	V
LISTE DES TABLEAUX	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XI
REMERCIEMENTS	XIII
AVANT-PROPOS	XIV
INTRODUCTION	1
LA FONCTION CARDIORESPIRATOIRE	2
LE SYSTÈME RESPIRATOIRE	2
LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE	3
STRUCTURE ET FONCTION DES VAISSEaux SANGUINS	5
HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE	6
DÉFINITION	6
PRÉVALENCE ET SYMPTÔMES CLINIQUES	9
DIAGNOSTIC	9
THÉRAPIES ACTUELLES	11
Thérapies ciblées	11
Thérapies conventionnelles non spécifiques	14

Limitations des thérapies actuelles	14
REMODELAGE VASCULAIRE EN HTAP	15
Intima – Les cellules endothéliales	15
Adventia – Les fibroblastes	15
Media – Les cellules musculaires lisses	16
Hyper-prolifération	16
Résistance à l'apoptose	18
RÔLE DE PIM1 EN HTAP	20
MODÈLE ANIMAL	21
LE DOMMAGE À L'ADN	22
LES CASSURES DOUBLES BRINS DE L'ADN	23
LA JONCTION D'EXTRÉMITÉS NON-HOMOLOGUES	23
Le NHEJ classique	23
Le NHEJ alternatif	24
PHOSPHORYLATION DU VARIANT D'HISTONE H2AX	24
PIM1 ET LA RÉPARATION DU DOMMAGE À L'ADN	25
LA RÉPONSE AUX DOMMAGES À L'ADN EN HTAP	26
PROBLÉMATIQUE	28
HYPOTHÈSES	28
OBJECTIFS DE TRAVAIL	30
INSERTION D'ARTICLE	31

RÉSUMÉ	33
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	35
MATERIAL AND METHODS	36
HUMAN TISSUE SAMPLES	36
CELL CULTURE AND TREATMENTS	37
PROLIFERATION AND APOPTOSIS MEASUREMENTS	37
IMMUNOBLOTS	37
IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND IMMUNOFLUORESCENCE STUDIES	38
COMET ASSAY	39
ANIMAL MODELS	39
STATISTICAL ANALYSIS	40
RESULTS	40
PIM1 IS INCREASED IN PAH AND ITS EXPRESSION IS STIMULATED BY DNA DAMAGE	40
PIM1 INHIBITION BY SGI-1776 DECREASES DNA DAMAGE REPAIR	41
PIM1 INHIBITION BY SGI-1776 DECREASES PAH-PASMCs PROLIFERATION AND INDUCES APOPTOSIS	43
SGI-1776 REDUCES PULMONARY PRESSURES AND IMPROVES RV FUNCTION IN ANIMAL MODELS OF PAH	44
DISCUSSION	45
ACKNOWLEDGMENT	47
REFERENCES	48

FIGURES	55
SUPPLEMENTALS FIGURES	62
FIGURE LEGENDS	66
<u>DISCUSSION ET CONCLUSION</u>	<u>70</u>
DISCUSSION	71
CONCLUSION	75
<u>RÉFÉRENCES</u>	<u>77</u>

Liste des tableaux

Tableau 1: Classification de l'Hypertension Pulmonaire (2)7

Liste des figures

Figure 1-1: Circulation sanguine pulmonaire et systémique	4
Figure 1-2: Structure des vaisseaux sanguins	5
Figure 1-3 : Remodelage vasculaire et hypertrophie du VD en HTAP	8
Figure 1-4: Cathétérisme cardiaque droit - Adaptée de Richard E. Klabunde.....	10
Figure 1-5 Cibles thérapeutiques utilisées en HTAP (19)	13
Figure 1-6 Mécanismes cellulaires de STAT3 impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire en HTAP (79)	19
Figure 1-7 Détection et réparation des dommages à l'ADN via le NHEJ (97)	25

Liste des abréviations

CML : cellules musculaires lisses

CMLAP : cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire

PAPm : pression de l'artère pulmonaire moyenne

RVP : résistance vasculaire pulmonaire

ET-1 : endothéline-1

PDE-5: phosphodiesterase-5

IL-6: interleukine 6

TNF- α : tumor necrosis factor alpha

STAT3: signal transducer and activator of transcription 3

Src: sarcoma inducing kinase

JAK: Janus kinase

NFAT: nuclear factor of activated T-cells

Bcl-2 : B-cell lymphoma protein-2

Bcl-XL: B-cell lymphoma-extra large

Bad: Bcl-2-associated death promoter

PIM1: provirus integration site for Moloney murine leukemia virus

MCT : monocrotaline

ROS : espèces réactives de l'oxygène

DDR : réponse aux dommages à l'ADN

CDB : cassure double brin

HR : recombinaison homologue

NHEJ : jonction des extrémités non-homologues

Ku70 : Lupus Ku autoantigen protein p70

Ku80 : Lupus Ku autoantigen protein p80

DNA-PKcs: DNA-dependent protein kinase, sous-unité catalytique

PIKK: phosphatidylinositol 3'-kinase-like kinase

ATM: ataxia telangiectasia mutated

ATR: ATM and Rad3-related

γ H2AX: phosphorylation du variant d'histone H2AX

PARP-1: poly (ADP-ribose) polymérase-1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier ma directrice de recherche, Dr Roxane Paulin pour son support et sa confiance en tant que sa première étudiante. Merci de me permettre de continuer la recherche à tes côtés pour les milles et un projets qui verront bientôt le jour!

Merci également aux autres chercheurs du groupe de recherche : Sébastien, Steeve et Olivier de m'avoir épaulée, conseillée et encouragée au cours de ces deux années d'études. Le deal de la mort m'a permis d'acquérir de l'expérience, du savoir et de continuer dans le domaine qui me passionne, le monde fascinant (mais pas toujours évident!) de la recherche.

Je remercie chaudement les PPR qui m'ont supportée, aidée et écoutée au laboratoire, à m'entendre chanter de joie, chialer et d'avoir écouté mes histoires de bons goûts et d'une chasteté sans faille! Hahaha!

A special thanks to my best lab partner Karl with whom my adventure started, a lot of laughs and I discovered a wonderful friend!

Aux autres étudiants avec qui les jours, les soirées et les week-ends passaient plus vite et étaient beaucoup plus agréables. Merci à Jojo de ta patience, de ta passion et de ton amitié. Un merci infini à Sophie pour tout ton aide et nos confidences. Un grand merci Benoît pour tes conseils scientifiques et ton savoir-faire ainsi que pour tous les autres sujets discutés ensemble. À Alice my friend pour ton support et ton écoute. Un merci à la familia française : Géraldine, Thibaut et Nolwenn avec qui j'ai partagé une grande gamme d'émotions et beaucoup d'aventures!

Merci à l'équipe d'entretien ménager pour votre précieuse présence lors des longues soirées. Un merci spécial à toi Michel de m'avoir toujours encouragé, d'avoir su me faire rire et d'avoir pu discuter avec toi de n'importe quoi.

Je tiens à souligner le soutien inconditionnel de ma famille, de l'aide de mes parents et de l'encouragement de tous. Ce fût nécessaire et très précieux à mes yeux. Vous m'êtes très chers et je vous aime!

À mes amis pour m'avoir écoutée et divertie. Je pense à la gang de team-dru, Leea, Ophélie, Dey, Renée et tous les autres, de près ou de loin, que je ne peux identifier par manque d'espace!

Avant-propos

L'ensemble de mes travaux de maîtrise est regroupé dans un article scientifique inséré dans le chapitre 2. Ceci est une ébauche à l'article scientifique prévu pour la publication au cours de cette année. J'ai été responsable de plus de 90% des données et de leur mise en forme finale. La conception de l'étude, la planification des manipulations et l'écriture du manuscrit ont été réalisées avec le Dr Roxane Paulin, ma directrice de recherche. Jolyane Meloche, Renée Paradis, Nolwenn Samson et Ève Tremblay font partie des autres auteurs nommés dans l'étude, car elles ont contribué au soutien technique lors de diverses manipulations.

Ce projet m'a amené à présenter à l'oral dans deux congrès :

- BIENNALE DE L'ESPACE FRANCOPHONE DE PNEUMOLOGIE – Québec, 2017
SESSION : SCIENCES FONDAMENTALES – HYPERTENSION PULMONAIRE ET PHYSIOLOGIE
« *Le SGI-1776, un inhibiteur de Pim1 et son potentiel thérapeutique dans l'hypertension artérielle pulmonaire* » Revue des Maladies Respiratoires Actualités (2017), p.108-109

- AMERICAN HEART ASSOCIATION Scientific sessions – Anaheim, 2017
« *Pim1: A New DNA Repair Modulator Implicated in Pulmonary Hypertension* »
Circulation, November 14, 2017, Volume 136, Issue Suppl 1¹

Au cours de ma maîtrise, j'ai eu la chance de participer à divers projets et j'ai contribué à la production de données qui ont mené à la publication de deux articles :

Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, **Lampron MC**, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Goncharova EA, Provencher S, Bonnet S. "HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension." Sci Rep. 2017;7(1):4546.

Meloche J, **Lampron MC**, Nadeau V, Maltais M, Potus F, Lambert C, Tremblay E, Vitry G, Breuils-Bonnet S, Boucherat O, Charbonneau E, Provencher S, Paulin R, Bonnet S. "Implication of Inflammation and Epigenetic Readers in Coronary Artery Remodeling in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension." Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2017 (8):1513-1523.

J'ai également participé à l'élaboration et à la production de données de plusieurs autres projets tels *YY1* cancer, les projets *Prohibitin* et *Clock* en HTAP. De plus, j'ai collecté les données *in vivo* de cathétérismes cardiaques droits du projet *CHK1* et *SAB*. Ceci a permis l'obtention de différentes subventions et dans un futur proche, à la publication de plusieurs articles.

INTRODUCTION

La cellule est le vivant sous sa forme la plus élémentaire, tous les êtres se composent de cellules. La cellule entretient diverses relations avec son environnement, qu'elles soient internes ou externes. Selon sa fonction et son milieu, elle transforme différents éléments nutritifs utiles à ses besoins et à son code génétique. La cellule doit être en homéostasie afin de croître, de se régénérer et de se multiplier, c'est-à-dire qu'elle doit s'harmoniser avec son milieu et préserver un certain équilibre pour conserver sa fonction et sa structure. Les organismes supérieurs sont multicellulaires et se composent de plusieurs catégories de cellules spécialisées qui s'unissent à d'autres pour atteindre un niveau d'organisation supérieur, comme les tissus et les organes. Le corps humain est constitué de 210 types cellulaires formant des organes hautement spécialisés tels le foie, le rein, le cœur et les poumons.

Tout organisme, incluant l'humain, échange plusieurs substances et de l'énergie avec son environnement. Tous ces échanges se font au niveau cellulaire. Les ressources dont la cellule a besoin sont les nutriments et le dioxygène (O_2) et elle rejette des déchets métaboliques comme le dioxyde de carbone (CO_2). Cela demande un niveau d'organisation structuré et efficace pour faire parvenir par exemple, le glucose provenant de l'intestin et l' O_2 des poumons au reste du corps. La fonction cardiorespiratoire englobe le système cardiovasculaire ainsi que le système respiratoire, et ils fonctionnent en pair de façon à permettre les échanges gazeux et l'acheminement des nutriments via le sang

LA FONCTION CARDIORESPIRATOIRE

Le système respiratoire

Le système respiratoire permet l'acheminement de l'air à l'intérieur des poumons où le passage de l'oxygène contenu dans l'air est transféré dans le sang au niveau des alvéoles. C'est également à cet endroit qu'il y a libération du CO_2 dans l'environnement. L'organe crucial au système respiratoire est le poumon, permettant un renouvellement de l' O_2 dans les globules rouges à chaque respiration. Le poumon droit est composé de trois lobes tandis que le poumon gauche seulement

de deux, ce qui laisse un emplacement pour le cœur. Le système des conduits intégrés au système respiratoire est appelé l'arbre bronchique. Les deux bronches souches naissent à la terminaison de la trachée et se jettent dans le poumon droit et gauche. Les bronches lobaires se subdivisent en bronchioles et se terminent en alvéoles pulmonaires. L'air inspiré suit donc le trajet de la trachée et des bronches jusqu'aux alvéoles pulmonaires où les échanges gazeux avec la circulation sanguine ont lieu.

Le système cardiovasculaire

Suite à l'inhalation, l'air riche en O_2 traverse un mince épithélium par diffusion simple pour parvenir dans le sang. Le réseau sanguin est très complexe et extrêmement efficace. En plus de transporter l' O_2 , les nutriments et de rejeter les déchets métaboliques, le réseau sanguin permet la transmission de l'information, le transport des hormones, la protection immunitaire et la régulation thermique. Le sang est pompé par le cœur au rythme d'environ cinq litres par minute. Il circule dans un réseau de vaisseaux sanguins. Chez les mammifères, le réseau sanguin est un circuit fermé et en continu. Il se divise en deux parties, regroupant la circulation pulmonaire et la circulation périphérique (aussi dite systémique).

La circulation systémique englobe les vaisseaux sanguins appelés artères et veines. Le sang oxygéné quitte le cœur vers les organes dans les artères, alors que le sang appauvri en oxygène, retournent au cœur par les veines. Les systèmes artériels et veineux sont reliés au niveau des capillaires qui permettent les échanges gazeux entre le sang et les tissus.

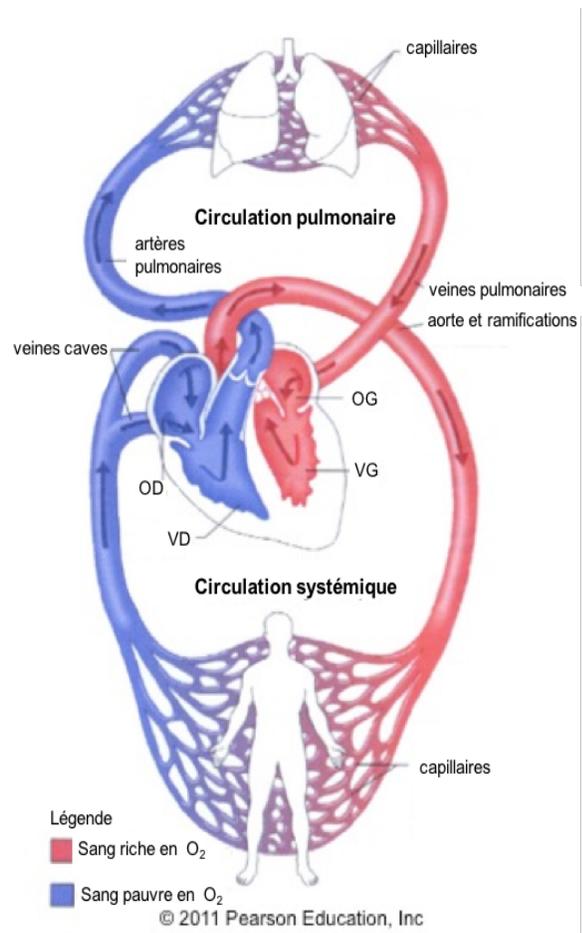


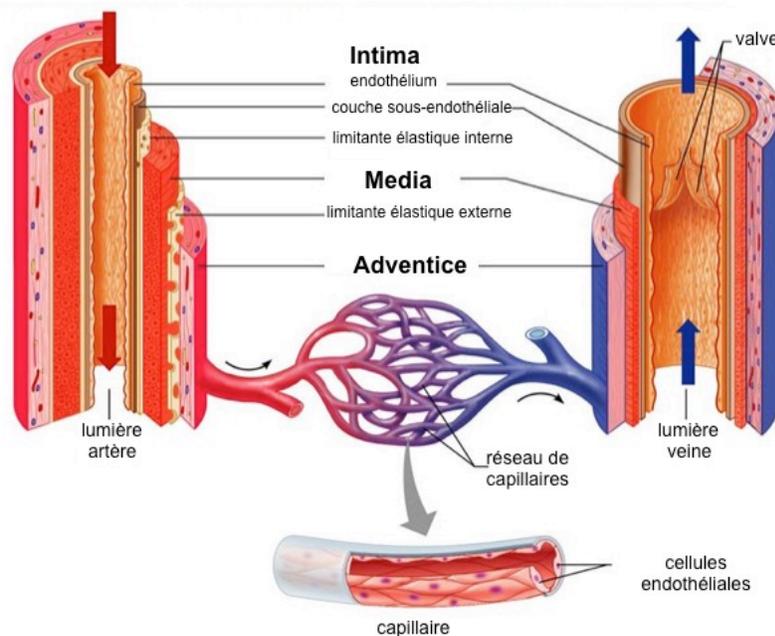
Figure 1-1: Circulation sanguine pulmonaire et systémique

-Adaptée de Pearson Education, Inc.

Toutefois, la circulation pulmonaire fait exception, car ce sont les artères pulmonaires qui transportent le sang pauvre en oxygène aux poumons et les veines pulmonaires qui conduisent le sang oxygéné des poumons vers le cœur. Le sang non oxygéné est acheminé dans l'oreillette droite (OD) du cœur puis dans le ventricule droit (VD) pour ensuite se diriger dans les poumons via les artères pulmonaires (AP), où les échanges se feront tels que mentionné précédemment. Par la suite, le sang oxygéné est acheminé vers l'oreillette gauche (OG) par les veines pulmonaires puis dans le ventricule gauche (VG) où il quittera le cœur par l'aorte (figure 1-1).

Il est aussi intéressant de mentionner brièvement la circulation bronchique. Elle permet d'assurer une fonction nourricière aux structures pulmonaires en leur amenant du sang oxygéné et des nutriments via les vaisseaux bronchiques. Les artères bronchiques issues notamment de l'aorte thoracique descendante suivent les bronches en se ramifiant jusqu'aux bronchioles où les veines bronchiques se jetteront ensuite dans les veines azygos pour rejoindre la veine cave supérieure.

Structure et fonction des vaisseaux sanguins



©2006 Pearson Education, Inc.

Figure 1-2: Structure des vaisseaux sanguins

-Adaptée de Pearson Education, Inc.

Les différents vaisseaux se distinguent de par leur structure et leur rôle. Ils peuvent posséder jusqu'à trois couches. L'intima, qui tapisse la surface interne du vaisseau, est composée d'un endothélium vasculaire. La media entoure l'intima et elle est constituée de fibres musculaires et élastiques. Les fibres musculaires servent notamment à la contraction du vaisseau alors que les fibres élastiques permettent son élasticité. L'adventice est la membrane externe et est formée de fibres de collagène pour la résistance vasculaire, de fibres élastiques et fibreuses ainsi que de tissu conjonctif.

Les veines sont dotées d'une paroi mince pouvant largement se dilater et la pression sanguine est plutôt faible. En revanche, elles ont une faible capacité de contraction. Les veines disposent de valvules pour empêcher le sang de refluer vers le bas en se rendant au cœur. Les capillaires ne possèdent qu'une couche de cellules endothéliales entourée d'une membrane basale et ils sont de très petit calibre avec une pression très faible. Les artères sont dotées d'une élasticité naturelle grâce à leurs cellules musculaires lisses (CML). Cela permet de modifier leur calibre et leur tension, ainsi elles peuvent se dilater et/ou se contracter afin de moduler la pression du sang. (Figure 1-2) Il existe des artères de type élastique ayant un calibre important et possédant une paroi épaisse constituée de nombreuses fibres élastiques. Elles sont localisées près du cœur, comme par exemple l'aorte ou l'AP. Les artères de type musculaire possèdent un calibre moins grand et leur paroi est composée principalement de fibres musculaires lisses. Ce sont les artères situées plus loin du cœur : en d'autres mots, ce sont les ramifications des troncs artériels. La pression artérielle est la pression du sang dans les artères lors des deux phases du cycle cardiaque : systole et diastole. Au niveau de la circulation systémique, la pression systolique est la valeur de la pression lorsque la contraction du VG éjecte le sang dans l'artère et sa valeur moyenne se situe entre 116-120mmHg. Une telle pression permet l'écoulement rapide du sang à travers tout le corps. La pression diastolique est quant à elle, la valeur de la pression lorsque le VG se relâche et sa pression moyenne se situe entre 76 et 80mmHg. Le système circulatoire pulmonaire possède une pression artérielle beaucoup plus basse, avec une valeur moyenne de 20mmHg en systole et 8mmHg en diastole.

HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE

Définition

L'hypertension pulmonaire (HTP) regroupe un ensemble de maladies cardio-pulmonaires caractérisées par une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires conduisant à une élévation de la pression de l'artère pulmonaire moyenne (PAPm) au repos supérieur ou égale à 25mmHg. L'HTP est

Table 1 Updated Classification of Pulmonary Hypertension*

1. Pulmonary arterial hypertension
 - 1.1 Idiopathic PAH
 - 1.2 Heritable PAH
 - 1.2.1 BMPR2
 - 1.2.2 ALK-1, ENG, **SMAD9, CAV1, KCNK3**
 - 1.2.3 Unknown
 - 1.3 Drug and toxin induced
 - 1.4 Associated with:
 - 1.4.1 Connective tissue disease
 - 1.4.2 HIV infection
 - 1.4.3 Portal hypertension
 - 1.4.4 Congenital heart diseases
 - 1.4.5 Schistosomiasis
- 1' Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary hemangiomatosis
- 1''. **Persistent pulmonary hypertension of the newborn (PPHN)**
2. Pulmonary hypertension due to left heart disease
 - 2.1 Left ventricular systolic dysfunction
 - 2.2 Left ventricular diastolic dysfunction
 - 2.3 Valvular disease
 - 2.4 **Congenital/acquired left heart inflow/outflow tract obstruction and congenital cardiomyopathies**
3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia
 - 3.1 Chronic obstructive pulmonary disease
 - 3.2 Interstitial lung disease
 - 3.3 Other pulmonary diseases with mixed restrictive and obstructive pattern
 - 3.4 Sleep-disordered breathing
 - 3.5 Alveolar hypoventilation disorders
 - 3.6 Chronic exposure to high altitude
 - 3.7 Developmental lung diseases
4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH)
5. Pulmonary hypertension with unclear multifactorial mechanisms
 - 5.1 Hematologic disorders: **chronic hemolytic anemia, myeloproliferative disorders, splenectomy**
 - 5.2 Systemic disorders: sarcoidosis, pulmonary histiocytosis, lymphangioleiomyomatosis
 - 5.3 Metabolic disorders: glycogen storage disease, Gaucher disease, thyroid disorders
 - 5.4 Others: tumoral obstruction, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure, **segmental PH**

*5th WSPH Nice 2013. Main modifications to the previous Dana Point classification are in **bold**.
 BMPR = bone morphogenic protein receptor type II; CAV1 = caveolin-1; ENG = endoglin;
 HIV = human immunodeficiency virus; PAH = pulmonary arterial hypertension.

Tableau 1: Classification de l'Hypertension Pulmonaire (2)

classé en cinq groupes selon l'Organisation Mondiale de la Santé et actualisé par Simonneau et *al.* en 2009². L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond au groupe 1 des HTP (tableau 1) et il englobe les formes idiopathiques, familiales/héritables et les formes associées à des maladies du tissu conjonctif, des maladies congénitales du cœur, à de l'hypertension portale, à une infection au virus de l'immunodéficience humaine et quelques autres conditions³. C'est principalement de la classe HTAP idiopathiques dont il sera question dans ce mémoire. La définition hémodynamique de l'HTAP correspond à une pression pulmonaire moyenne ≥ 25 mmHg au repos en présence d'une pression pulmonaire pré-capillaire ≤ 15 mmHg³ et une résistance vasculaire pulmonaire > 3 unités Wood.

Cet accroissement des résistances est caractérisé par un désordre structural au niveau des artères pulmonaires distales (APD) (i.e. $<500\mu\text{m}$) impliquant plusieurs types cellulaires tels que les cellules endothéliales (CE), les fibroblastes et les CML⁴. Ces dernières ont un phénotype pro-prolifératif conduisant au remodelage des APD avec rétrécissement et parfois oblitération complète de la lumière du vaisseau (figure 1-3)⁵. De plus, une contraction accrue des CML entraîne une vasoconstriction qui aggrave la réduction de la lumière vasculaire et l'augmentation des pressions.

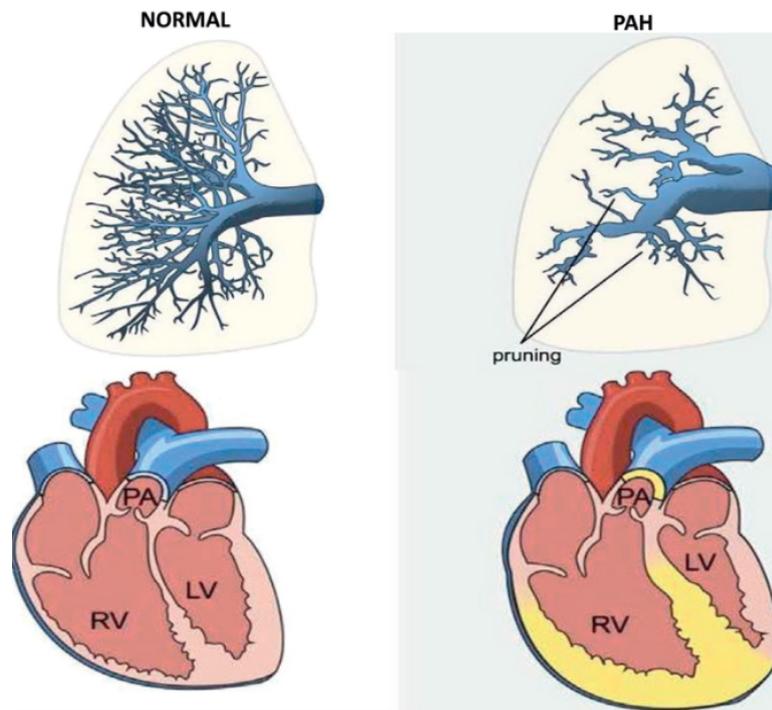


Figure 1-3 : Remodelage vasculaire et hypertrophie du VD en HTAP

-Adaptée de Ryan et al. (5)

Une caractéristique propre à l'HTAP est la formation de lésions complexes comprenant notamment les lésions plexiformes. Elles se retrouvent au niveau de bifurcations des vaisseaux surnuméraires. Ces lésions se présentent sous la forme de structures gloméruloïdes où les canaux endothéliaux sont entourés de myofibroblastes, de CML et de cellules mésenchymateuses non différenciées résistantes à l'apoptose en plus d'une matrice de tissu conjonctif entraînant une destruction de la paroi pulmonaire. Il n'a pas été déterminé que ces lésions jouent

un rôle dans la pathogénèse et/ou la progression de l'HTAP mais elles sont indéniablement un marqueur morphologique du développement de la maladie.

Pour compenser l'augmentation des pressions pulmonaires, une adaptation mécanique du VD survient, comme le VD fournit un plus grand effort pour expulser le sang dans les vaisseaux, il se muscularise, on dit alors qu'il s'hypertrophie afin de maintenir un débit cardiaque constant (figure 1-3). Par contre, le VD évolue rapidement vers un stade où il n'est plus capable de compenser l'augmentation des pressions, on dit alors que le VD est « décompensé », entraînant inévitablement le décès des patients par insuffisance cardiaque droite⁶.

Prévalence et symptômes cliniques

L'HTAP est une maladie rare ayant une prévalence mondiale entre 40 et 50 cas par million^{7,8}. Environ 40% des cas d'HTAP sont idiopathiques, ce qui signifie que la cause est inconnue⁹, avec une prédominance féminine¹⁰. Le taux de survie est estimé à 5 ans pour 40% des cas^{7,11}. Les symptômes associés à l'HTAP ne sont pas spécifiques à la maladie. Dans un premier temps, les patients présenteront une dyspnée à l'effort, de la fatigue et une intolérance à l'effort, notamment causées par la progression de l'hypertrophie cardiaque droite. Alors que la maladie évolue, d'autres symptômes peuvent apparaître comme des douleurs thoraciques et abdominales, de l'œdème, des syncopes et au stade avancé, une dyspnée au repos¹²⁻¹⁴.

Diagnostic

Les symptômes associés sont donc insuffisants pour un diagnostic précoce et concis. Ainsi, le diagnostic de l'HTAP est ardu et tardif. Une série d'investigations est nécessaire afin de conduire à la détection de la maladie, ce n'est qu'ensuite que les spécialistes peuvent confirmer et déterminer la gravité de la pathologie chez le patient. Lorsque l'HTAP est soupçonnée, deux outils sont mis à la disposition du clinicien : l'échocardiographie et le cathétérisme cardiaque droit⁴.

L'échocardiographie est un moyen utile et non invasif pour confirmer ou exclure une HTAP. Cet outil permet également de suivre l'évolution de la maladie¹⁵. Elle permet d'imager et de mesurer certaines caractéristiques du cœur droit comme son hypertrophie et sa dilatation, sa pression systolique, l'effusion péricardique et l'étendue du mouvement du septum vers le VG en diastole¹⁵. Il est possible d'estimer la PAPm grâce à la pression du VD mesurée à partir de la vitesse maximale de régurgitation tricuspidiene et à la pression de l'OD obtenue à partir de l'affaissement de la veine cave^{16,17}. C'est une étape primordiale avant de référer le patient à l'autre outil diagnostique, le cathétérisme cardiaque droit.

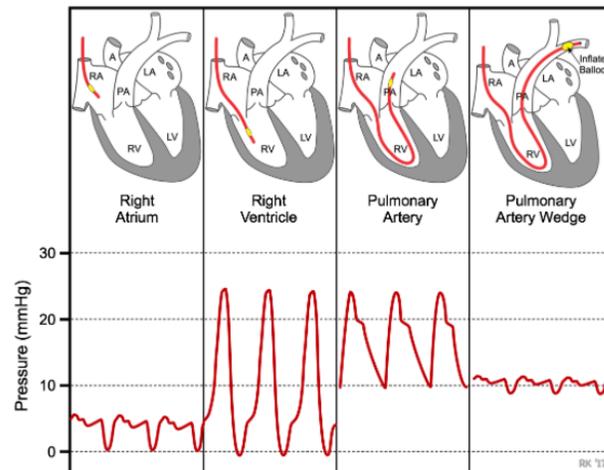


Figure 1-4: Cathétérisme cardiaque droit - Adaptée de Richard E. Klabunde

D'après : www.cvphysiology.com

Le cathétérisme droit est la seule procédure indispensable pour établir le diagnostic, la sévérité et le pronostic d'HTAP^{13,18}. Cette technique est invasive et consiste à introduire un cathéter par une veine systémique pour se rendre du côté droit au cœur afin de mesurer directement la pression dans l'OD, le VD et l'AP (figure 1-4). Il permet également de mesurer le débit cardiaque (DC) et la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPO) grâce au gonflement d'un ballonnet, une fois que le cathéter est dans l'AP. Ces mesures servent à calculer les résistances vasculaires pulmonaires (RVP). Rappelons que l'augmentation progressive de la RVP et de la

PAPm conduit à une diminution du débit cardiaque et à l'insuffisance cardiaque droite¹⁷.

Le pronostic des patients HTAP est très sombre, car la maladie progresse rapidement et elle est fatale. Aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. Les thérapies actuelles sont utilisées afin de ralentir la progression de la maladie et d'améliorer la qualité de vie des patients. La majorité des patients meurent ou sont obligés de se soumettre à une transplantation pulmonaire dans les cinq ans après le diagnostic. Le traitement de l'HTAP se définit par une stratégie complexe basée sur la sévérité initiale de la maladie et il sera réévalué fréquemment en fonction de sa réponse sur le patient.

Thérapies actuelles

L'avancée de la recherche dans le domaine de l'HTAP a permis le développement de nombreux outils thérapeutiques ciblés, interagissant avec les voies impliquées dans la vasoconstriction et le remodelage des AP malades. Les médications dites conventionnelles sont les traitements non spécifiques de l'HTAP.

Thérapies ciblées

Les thérapies spécifiques (ou ciblées) sont des vasodilatateurs et ont pour but de favoriser la dilatation des artères pulmonaires¹⁹. En effet, la vasoconstriction est toujours considérée comme un facteur important de la physiopathologie de l'HTAP et plusieurs voies de signalisation majeures sont affectées (figure 1-5).

Les bloqueurs de canaux à calcium inhibent le flux calcique dans les cellules vasculaires et cela a pour effet de dilater les vaisseaux sanguins, autant systémiques que pulmonaires, ce qui amène à une diminution de la pression artérielle. Malheureusement, moins de 10% des patients HTAP répondent et seulement 50% de ces patients présenteront des effets bénéfiques à long terme²⁰⁻²². Trois principaux bloqueurs de canaux calciques sont utilisés : le nifedipine, le diltiazem et l'amlodipine.

L'endothéline-1 (ET-1) est un puissant agent vasoconstricteur dont la concentration sérique corrèle avec la sévérité et le pronostic des patients HTAP²³. Le système vasculaire pulmonaire présente deux récepteurs de l'ET-1 à la surface des CML, soit ET-A et ET-B afin de promouvoir la prolifération et la vasoconstriction^{24,25}. Paradoxalement, les CE ont également le récepteur ET-B et leur activation consiste à relarguer des substances vasodilatatrices et antiprolifératives tels la prostacycline et l'oxyde nitrique (NO). Donc, ce blocage non-sélectif des deux récepteurs à l'ET-1 peut théoriquement occasionner des effets opposés²⁶. Néanmoins, des études cliniques démontrent l'efficacité des antagonistes non-sélectifs des récepteurs (Bosentan, Macitentan), et celle-ci serait semblable aux antagonistes sélectifs du récepteur ET-A (Ambrisentan)²⁷. Ces thérapies améliorent la qualité de vie, les symptômes, les paramètres hémodynamiques et montrent également une diminution de la morbidité chez les patients atteints d'HTAP^{28,29}.

Le NO est un puissant vasodilatateur stimulant la guanylate cyclase soluble et la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc), provoquant ainsi la relaxation des CML de l'AP³⁰. La phosphodiesterase-5 (PDE-5) est une enzyme ayant pour fonction d'inactiver la GMPc. En HTAP, il y a une diminution de production de NO et une augmentation de l'expression de PDE-5^{31,32}. De ce fait, plusieurs molécules pharmaceutiques ciblent cette voie de signalisation comme un inhibiteur de PDE-5, le Tadalafil, permettant la relaxation des vaisseaux sanguins et présentant également un effet antiprolifératif³³. Il est associé à une amélioration de la tolérance à l'effort, de l'hémodynamique pulmonaire et à une diminution de la détérioration clinique des patients HTAP³⁴.

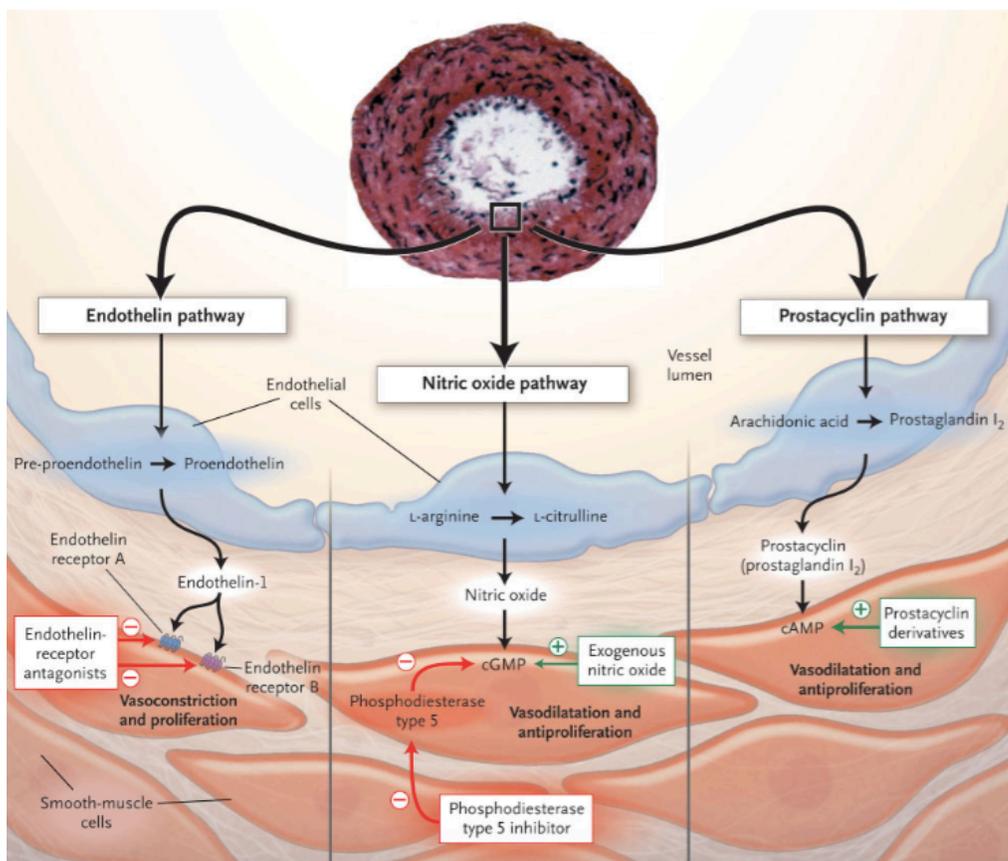


Figure 1-5 Cibles thérapeutiques utilisées en HTAP (19)

La prostacycline est produite principalement par les CE et est impliquée dans l'inhibition de l'activation des plaquettes et de la vasodilatation des vaisseaux sanguins. Elle présente également des propriétés cytoprotectrices et antiprolifératives³⁵. Les concentrations de prostacycline sont diminuées en HTAP³⁶,

donc la restauration des niveaux d'expressions représente une thérapie de choix. Récemment, un agoniste sélectif des récepteurs de la prostacycline ayant des effets vasodilatateurs a été mis sur le marché. Cet agoniste est le Selexipag et il montre un effet bénéfique sur les paramètres hémodynamiques et les RVP, en plus d'occasionner une diminution de la détérioration clinique des patients HTAP³⁷.

Thérapies conventionnelles non spécifiques

Les thérapies conventionnelles regroupent, entre autres, l'administration d'anticoagulants permettant de minimiser les risques de thromboses et l'administration de diurétiques afin de diminuer la volémie et la surcharge ventriculaire. Certains patients peuvent être sur digitaliques ou sous oxygénothérapie. Il est également conseillé aux patients de rester actifs dans les limites de leur possible afin d'éviter le déconditionnement. Il est recommandé d'effectuer ces entraînements sous supervision et dans un centre adapté pour la clientèle HTAP. Les patients sont sensibilisés aux vaccins annuels protégeant contre l'influenza et les pneumocoques, car près de 7% des décès sont la conséquence d'une pneumonie^{4,12}.

Limitations des thérapies actuelles

Les thérapies ciblées ont grandement permis d'améliorer la qualité de vie ainsi que la survie des patients. Cependant, aucun de ces traitements n'est curatif (ils ne réduisent pas l'hypertrophie de la media) et ils présentent plusieurs effets secondaires plus ou moins tolérés par les patients HTAP (notamment une hypotension systémique)¹⁶. Par contre, il est intéressant de spécifier qu'une méta-analyse récente démontre que la combinaison de deux thérapies était préférable à la monothérapie³⁸. Grâce à cette combinaison, le retardement d'une transplantation est envisageable pour une certaine proportion des patients³⁹. La transplantation en elle-même n'est pas aisée et les listes d'attentes peuvent être longues¹⁶. Effectivement, la survie à cinq ans post-transplantation est estimée à 52-75% et à 45-66% sur dix ans^{40,41}, ce qui prouve la nécessité d'identifier d'autres cibles thérapeutiques spécifiques à l'HTAP.

Remodelage vasculaire en HTAP

La prochaine partie de ce chapitre sera consacrée aux diverses molécules impliquées dans la pathologie de l'HTAP causant, entre autres, le remodelage des artères pulmonaires distales. L'HTAP est une maladie multifactorielle et très complexe, alors il sera question des facteurs et des déterminants moléculaires et cellulaires qu'en lien avec ce manuscrit. En HTAP, chacune des couches cellulaires constituant la paroi de l'AP, comme discuté précédemment, contribue à son remodelage et à l'oblitération de sa lumière. Nous nous focaliserons sur la media, car elle est la composante étudiée dans ce mémoire.

Intima – Les cellules endothéliales

Les CE sont exposées au sang et sont les premières à subir les effets de l'hypoxie, de l'inflammation et autres stress environnementaux, ainsi que les changements de pression. Cela amène à une dysfonction des CE : une partie de la population devient apoptotique alors que l'autre est résistante et se met à sur-proliférer, formant des lésions plexiformes et menant à une transition endothélio-mésenchymateuse vers la media⁴². Une hypothèse propose que les CE seraient impliquées dans l'initiation de l'HTAP suite à une blessure de l'endothélium vasculaire. Cette blessure mène à l'apoptose des cellules normalement quiescentes, entraînant une dysfonction de la structure et amenant une prolifération incontrôlée des CE résistantes⁴³. La lésion de l'endothélium peut entraîner l'infiltration des facteurs de croissance qui pourront alors cibler les autres couches cellulaires du vaisseau et démarrer le remodelage vasculaire^{43,44}.

Adventia – Les fibroblastes

Face à un stress environnemental ou à une blessure, les cellules adventitielles sont parmi les premières à répondre à cause de leurs fonctions immuno-régulatrices⁴⁵ et elles modulent la paroi vasculaire. Suite à leur activation, les fibroblastes migrent, prolifèrent et se différencient en myofibroblastes. De plus, elles perpétuent un environnement inflammatoire, entraînant un cercle vicieux d'inflammation, car elles

sécrètent des facteurs tels des cytokines et des chimiokines affectant les CE et les CML⁴⁵⁻⁴⁷.

Media – Les cellules musculaires lisses

Phénotypiquement, les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CMLAP) malades se caractérisent surtout par leur hyper-prolifération et leur résistance à l'apoptose. Cela est causé par différents acteurs moléculaires impliqués dans divers mécanismes pouvant se lier et interagir entre eux aboutissant à ce phénotype pathologique. Les CMLAP ont la capacité de changer de phénotype dans certaines conditions afin d'acquérir les propriétés nécessaires pour l'adaptation et réagir au stress et/ou au message environnant. Par exemple, les CMLAP dépendent étroitement des messages envoyés par les CE sous-jacentes.

Hyper-prolifération

Méiateur de l'inflammation

Comme mentionné brièvement plus haut, l'inflammation joue un rôle clé dans le développement de l'HTAP et elle est pressentie pour faire partie des éléments déclencheurs de la maladie. Plusieurs processus inflammatoires ainsi que leurs médiateurs sont impliqués dans l'étiologie de l'HTAP. De nombreuses cytokines et chimiokines sont surexprimées dans le sang des patients HTAP, ceci incluant les interleukines (IL)-2, 6, 8, 10, 12p70 et le TNF- α (tumor necrosis factor alpha)^{48,49}. En plus de se retrouver dans le sang, ils sont également décrits dans les poumons. En effet, au niveau des vaisseaux remodelés chez des patients HTAP sévère, il y a présence d'infiltrats inflammatoires et de lymphocytes^{50,51}. La quantification des médiateurs de l'inflammation va notamment pouvoir renseigner sur la sévérité, l'évolution et le pronostic de l'HTAP^{49,52,53}. La cytokine pro-inflammatoire qu'est l'interleukine 6 (IL-6) en est un bon exemple. L'activation du récepteur de l'IL-6 par sa cytokine mène à la prolifération des CMLAP ce qui peut être dû, par exemple, à l'induction du facteur de transcription STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3)⁵⁴. Il a été montré chez le rongeur que l'administration chronique d'IL-

6 recombinant est suffisante pour engendrer un remodelage vasculaire et favoriser la progression d'HTAP induite par l'hypoxie chronique⁵⁵. Une souris déficiente en IL-6 (IL-6^{-/-}) est protégée contre la maladie alors qu'une souris transgénique présentant une surexpression d'IL-6 développe spontanément l'HTAP⁵⁶⁻⁵⁸. Bien que l'inflammation possède un rôle évident dans la pathogénèse de la maladie, seulement quelques patients répondent positivement aux traitements anti-inflammatoires et immunosuppresseurs, souvent en comorbidité avec des maladies auto-immunes^{59,60}. Toujours est-il que les thérapies ciblant l'inflammation sont encore d'actualité et il y a présentement une drogue immunosuppressive, le Rituximab, en phase clinique (NCT01086540).

Facteur de transcription

Un facteur de transcription est une protéine qui se fixe à une séquence d'ADN spécifique promotrice et il peut ainsi contrôler la transcription du gène associé. Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la physiopathologie de l'HTAP⁶¹.

Suite à l'activation des récepteurs à cytokines, leurs protéines associées telles Src (sarcoma inducing kinase) ou JAK (Janus kinase) vont s'activer à leur tour. Elles peuvent alors activer le facteur de transcription STAT3 en le phosphorylant sur son résidu tyrosine 705. STAT3 phosphorylé est alors transloqué au noyau où il permet la transcription de gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire^{62,63}. Il a été montré que STAT3 était impliqué dans la régulation des gènes du cycle cellulaire tels c-Myc et la cycline D1 contribuant à la prolifération des CMLAP-HTAP^{64,65}. L'inhibition de STAT3 par la DHEA (déhydroépiandrostérone) reverse l'HTAP d'un modèle murin⁶⁶ et ces travaux ont mené à une étude clinique de phase III (NCT00581087).

NFAT (nuclear factor activated T cells) est un facteur de transcription des lymphocytes T permettant la modulation de l'expression de nombreux médiateurs de l'inflammation, mais il est également présent dans les CML. Surexprimé dans les CMLAP et les cellules inflammatoires circulantes en HTAP, NFAT contribue au

remodelage vasculaire⁶⁷. NFAT est activé de manière dépendante à la voie du Ca²⁺ où l'augmentation du calcium intracellulaire active la calcineurine. La calcineurine possède une activité sérine-thréonine phosphatase menant à la déphosphorylation de NFAT aboutissant à sa translocation nucléaire et à sa liaison à l'ADN⁶⁸⁻⁷⁰. De plus, la fixation de l'IL-6 sur son récepteur est un autre mécanisme d'activation de NFAT via l'intermédiaire de la modulation du Ca²⁺ intracellulaire⁷¹. NFAT régule la prolifération des CML en favorisant leur contraction et en diminuant l'expression des canaux potassiques voltage-dépendants^{67,72}. Chez un modèle animal de souris, l'inhibition de NFAT par VIVIT ou Cyclosporine améliore les paramètres hémodynamiques et le remodelage vasculaire⁶⁷.

Résistance à l'apoptose

L'apoptose ou mort cellulaire programmée est un phénomène naturel génétiquement programmé permettant la dégradation de la cellule suite à divers processus finement régulés. Il existe un équilibre étroit entre l'apoptose et la prolifération cellulaire. Quand l'apoptose est dérégulée ou encore résistante, les cellules se multiplient de façon anarchique contribuant par exemple, au développement du cancer⁷³ et de l'HTAP⁷⁴.

Les deux grandes voies apoptotiques des cellules sont la voie dite extrinsèque, définie par les récepteurs de mort cellulaire et la voie mitochondriale intrinsèque⁷⁵. Lorsque la cellule débute le processus d'apoptose, il y a une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondriale conduisant à la libération du cytochrome-c et à l'activation des caspases, qui sont nécessaires à l'apoptose, donc à la dégradation cellulaire.

Role of the STAT3/Pim1 axis in PAH

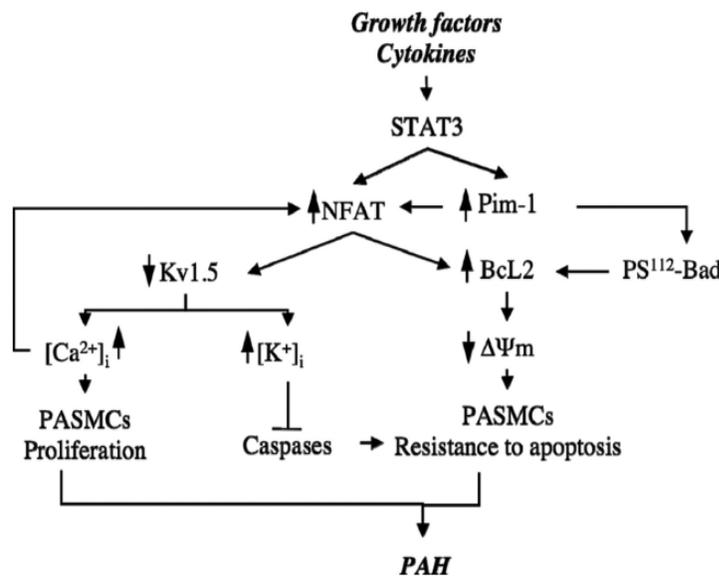


Figure 1-6 Mécanismes cellulaires de STAT3 impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire en HTAP (79)

En plus de son rôle dans la prolifération cellulaire, STAT3 joue également un rôle sur la survie cellulaire en HTAP. En effet, l'activation de STAT3 induit l'expression des gènes impliqués dans la résistance à l'apoptose tels Bcl-2 (B-cell lymphoma protein-2) et Bcl-XL (B-cell lymphoma-extra large). Effectivement, ce sont deux protéines anti-apoptotiques ralentissant normalement le mécanisme de l'apoptose, mais qui peuvent aussi engendrer la survie de la cellulaire si leurs expressions demeurent. Cela entraîne une augmentation de la polarisation de la membrane mitochondriale empêchant le relargage des facteurs favorisant l'apoptose⁷⁶⁻⁷⁸.

NFAT est également impliqué dans la régulation de la résistance à l'apoptose en HTAP via son activation qui favorise aussi l'expression de Bcl-2. Un résumé des

voies de signalisation de STAT3 favorisant la prolifération et la survie en HTAP est décrit dans la figure 1-6⁷⁹. La présence de PIM1 dans le mécanisme est très intéressante et très importante, car c'est principalement de cette protéine dont il sera question par la suite.

Rôle de PIM1 en HTAP

PIM1 (provirus integration site for Moloney murine leukemia virus) est un proto-oncogène à l'activité sérine/thréonine kinase impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire, et est un acteur connu dans le cancer en raison de son implication dans la tumorigénèse^{80,81}. Il a été démontré par le Dr Roxane Paulin que la protéine PIM1 est surexprimée dans les poumons ainsi que dans le sang des patients HTAP et que sa concentration corrèle avec la sévérité de la maladie⁷⁹. Tandis que PIM1 apparaît plus tardivement en HTAP, l'augmentation de son expression est fortement liée à l'élévation de la PAPm et de la RVP. De plus, PIM1 est très peu exprimée dans les cellules saines faisant de cette protéine une cible thérapeutique de choix, car sa présence est spécifique et seules les cellules malades seront touchées suite à un traitement menant à leur apoptose. Une autre étude menée par le Dr Paulin et ses collaborateurs démontre le potentiel d'inclure PIM1 en tant que biomarqueur de l'HTAP afin d'améliorer la détection de la maladie et la prédiction de la survie grâce à un simple prélèvement sanguin⁸². PIM1 joue un rôle clé dans le remodelage vasculaire via son activation par la voie STAT3/NFAT/PIM1. L'expression de PIM1 est liée à l'activation de STAT3 et elle agit en parallèle à l'activation de NFAT. PIM1 joue sur la prolifération grâce à l'activation de NFAT et inhibe l'apoptose grâce à son activité kinase sur Bad (Bcl-2-associated death promoter). PIM1 phosphoryle la protéine pro-apoptotique Bad, ce qui entraîne une augmentation de Bcl-2 menant à une hyperpolarisation de la membrane de la mitochondrie comme expliqué précédemment. L'inhibition de PIM1 par son ARN interférence améliore les paramètres hémodynamiques et le remodelage chez le modèle animal monocrotaline, et diminue *in vitro* la prolifération et la résistance à l'apoptose.

Modèle animal

Plusieurs modèles animaux sont utilisés pour étudier l'HTAP. Bien qu'aucun modèle préclinique ne corresponde exactement à l'Homme, chaque modèle permet de mimer différents facteurs clés retrouvés chez l'HTAP humaine. Donc, en ciblant ces caractéristiques, il est possible d'explorer des avenues thérapeutiques. Il sera question, en bref, du modèle utilisé pour les données *in vivo* de l'étude présentée dans le prochain chapitre.

Le modèle de rat monocrotaline (MCT) développe une hypertension pulmonaire sévère suite à l'injection sous-cutanée d'un alcaloïde appelé crotaline à 60mg/kg⁸³. La MCT est bio-activée dans le foie par les cytochromes P-450 entraînant une toxicité endothéliale hépatique et cardio-pulmonaire conduisant à une augmentation de la PAPm après deux semaines. À la troisième semaine, l'hypertrophie ventriculaire droite est installée⁸⁴ et le protocole animal se termine à quatre semaines. L'approche thérapeutique peut débuter lorsque les animaux sont symptomatiques, c'est-à-dire dès la semaine deux.

L'hypertrophie ventriculaire, le remodelage massif des vaisseaux pulmonaires de petits calibres et une mortalité s'apparentant à l'HTAP humaine sont des caractéristiques retrouvées chez ces animaux sur une courte période de temps^{84,85}. Ce modèle peu coûteux et reproductible permet donc l'obtention de paramètres hémodynamiques et histopathologiques similaires. Il sert également de modèle inflammatoire car la MCT détruit les CE des vaisseaux sanguins menant à une perte de leur intégrité entraînant ainsi une réponse massive de cellules inflammatoires. Or, il est bien de noter qu'il présente un profil d'inflammation différent de celui retrouvé chez les patients HTAP⁸⁴. De plus, il ne permet pas d'obtenir des lésions complexes ni la formation de la néointima comme cela est décrit chez l'Homme. Comme la MCT affecte d'autres organes, dont le foie, ces rats servent aussi de modèle à la maladie veino-occlusive (MVO) hépatique.

Ce modèle est souvent critiqué comme étant une pâle imitation de la pathologie humaine puisque plusieurs études montrent qu'un arsenal d'approches

thérapeutiques permet de prévenir et/ou de renverser l'HTAP chez les animaux⁸⁶. À sa défense, ce modèle a permis l'introduction des traitements utilisés présentement pour les patients HTAP tels que décrit antérieurement⁸³.

LE DOMMAGE À L'ADN

La transmission conforme du matériel génétique nécessite le maintien d'un faible niveau de mutations. Durant la réplication à chaque division cellulaire, chaque gène peut être altéré par un changement dans sa propre séquence ou dans la séquence de l'ARN messager qu'il code ou encore présenter une mutation dans la séquence de la protéine traduite. La vie et la biodiversité dépendent d'une balance subtile entre mutations et réparation de l'ADN, car la variation génétique est nécessaire à l'évolution. Le taux de mutation doit être limité sinon il y aura accumulation d'altérations génétiques menant à des mutations somatiques importantes comme par exemple dans les gènes du cycle cellulaire gouvernant une croissance et une prolifération incontrôlées des cellules retrouvées dans le cancer.

La cellule peut être également soumise à de nombreux stress au cours de sa vie, qu'ils soient endogènes ou exogènes. Les sources endogènes peuvent provenir de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) venant du métabolisme cellulaire normal, à l'origine de nombreux dommages à l'ADN. D'autre part, l'environnement engendre en permanence des facteurs de stress tels les rayons ultraviolets (UV), les radiations ionisantes ou les agents génotoxiques. Les lésions ainsi générées sont de natures diverses présentant des bases altérées ou perdues, des liens intra- ou inter-brins, des dimères de thymines, des cassures simples ou doubles brins. Ces altérations sont prises en charge par un ensemble complexe de voies de signalisation, différent selon le type de lésion, connu sous le nom de réponse au dommage à l'ADN (DDR)^{87,88}. La DDR permet de prévenir l'apparition des dommages et, en cas d'échec, de les reconnaître et de les réparer.

Les cassures doubles brins de l'ADN

Les cassures doubles brins (CDB) sont l'une des lésions les plus délétères et mutagènes que l'ADN peut subir. Une telle cassure provoque l'arrêt du cycle cellulaire, car la cellule doit absolument réparer cette cassure afin de continuer sa division cellulaire. La réparation peut se faire de façon optimale et la cellule reprend son cycle normal de division. Sinon, le dommage est irréparable et enclenche le processus de mort cellulaire ou alors la cassure ne sera pas réparée correctement, ce qui a pour conséquence de provoquer l'apparition d'anomalies chromosomiques pouvant entraîner plusieurs maladies, dont notamment des cancers. La réponse aux CDB est complexe et comporte deux grandes voies de réparation distinctes : la recombinaison homologue (HR) et la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ)^{89,90}. Le choix de réparation dépend de l'état des brins d'ADN au niveau de la cassure et de la phase du cycle cellulaire pendant laquelle apparaît la lésion⁹¹. Les CDB réparées par le système du NHEJ sont celles n'ayant pas de brin homologue (i.e. chromatide sœur), la réparation sera alors non conservatrice car elle ne restaure pas la séquence initiale. Cela conduit généralement à une mutation, le plus souvent à une délétion dans le gène.

La jonction d'extrémités non-homologues

Les cellules post-mitotiques et en phase G1 du cycle cellulaire présentant une CDB vont utiliser le mécanisme du NHEJ. Il existe deux mécanismes identifiés, l'un est dit classique (C-NHEJ) et l'autre est qualifié d'alternatif (A-NHEJ) puisqu'il n'emprunte pas exactement la même voie de signalisation.

Le NHEJ classique

La reconnaissance de la lésion double brin est faite par l'hétérodimère Ku, composé de Ku70 et Ku80, qui va ensuite recruter et activer la DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase, sous-unité catalytique). Par la suite viendront des nucléases afin de permettre une modification de l'ADN endommagé (*processing*), des polymérases pour la synthèse de nouveaux nucléotides ainsi qu'une ligase pour sceller le brin

d'ADN réparé incluant Artemis, XRCC4 et ligase IV⁹². Le NHEJ est un système d'une grande flexibilité^{93,94} et il agit très rapidement. Conséquemment, c'est un processus de réparation sujet aux erreurs.

Le NHEJ alternatif

La protéine ATM (ataxia telangiectasia mutated) est une protéine kinase de la famille des phosphatidylinositol 3'-kinase-like kinase (PIKK) (tout comme DNA-PKcs et ATR)⁹⁵ qui est activée spécifiquement par les cassures doubles brins⁹⁶. Face à ce type de cassure, l'activation d'ATM est déclenchée par sa phosphorylation. Suite à son activation, ATM phosphoryle à son tour de nombreuses cibles afin de transmettre un signal permettant soit l'arrêt du cycle cellulaire, soit la réparation de la cassure ou l'apoptose. Une étude montre qu'ATM est capable d'activer les protéines réparatrices du NHEJ sans passer par le complexe Ku70/Ku80⁹⁷. ATR (ATM and Rad3-related) agit sensiblement comme ATM sur les cassures doubles brins, puisqu'elle permet de phosphoryler certaines protéines afin de réparer le bris. C'est plutôt la nature de la lésion ainsi que la structure du dommage sur l'ADN qui déterminera l'activation d'ATM ou ATR⁹⁸.

Phosphorylation du variant d'Histone H2AX

La phosphorylation du variant d'histone H2AX, appelé plus communément γ H2AX est un substrat de la famille des PIKK soit ATM, ATR et DNA-PKcs⁹⁹⁻¹⁰¹. Les complexes de la DDR interagissent avec γ H2AX et cela permet la réparation des CDB¹⁰²⁻¹⁰⁶. Les souris H2AX^{+/-} et H2AX^{-/-} montrent une aberration chromosomique plus élevée et les cellules souches embryonnaires des souris déficientes en γ H2AX présentent une altération dans leurs mécanismes de réparation comme le NHEJ et la recombinaison homologe (HR). Une déficience dans les mécanismes de réparation augmente la sensibilité aux dommages à l'ADN¹⁰⁷⁻¹¹². Cela suggère que γ H2AX sert à la reconnaissance des dommages en étant l'ancrage pour le recrutement des protéines de réparation, mais agit également comme un marqueur des CDB car sa phosphorylation est un évènement relativement précoce face à

l'apparition des dommages^{113,114}. En HTAP, il a été démontré que ce facteur est augmenté en comparaison aux cellules saines^{115,116}.

La figure 1-7 est tirée d'une étude⁹⁷ démontrant l'interaction entre les différents facteurs de la réponse aux dommages à l'ADN par les cassures doubles brins où la phosphorylation d'ATM permet également d'activer la voie du NHEJ. Cette figure, adaptée pour ce mémoire, montre aussi la formation de foyers sur l'ADN notamment par γ H2AX suite à la reconnaissance des dommages par le C-NHEJ et ATM.

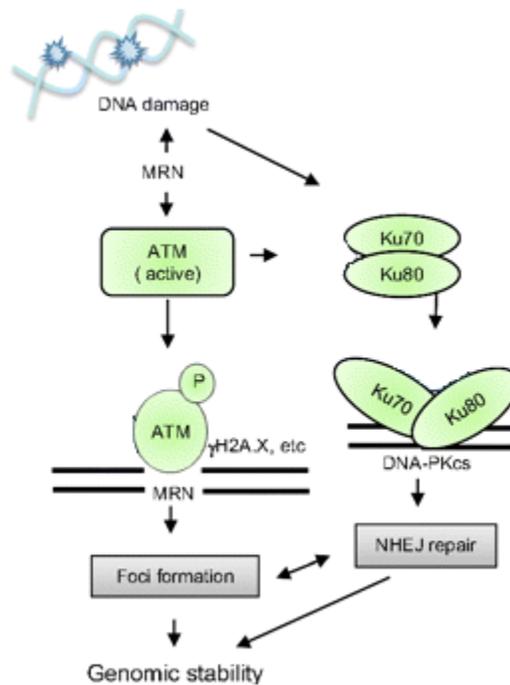


Figure 1-7 Détection et réparation des dommages à l'ADN via le NHEJ (97)

PIM1 et la réparation du dommage à l'ADN

Comme mentionné antérieurement, PIM1 est impliqué dans différentes voies de signalisation et sa surexpression est liée à diverses maladies. En plus d'être un marqueur potentiel de l'HTAP, PIM1 pourrait également être un marqueur de tumeur pour le cancer de la prostate, le cancer gastrique et le cancer du pancréas¹¹⁷⁻¹¹⁹. Depuis, plusieurs inhibiteurs ont été développés¹²⁰⁻¹²² et ils s'avèrent efficaces contre la croissance cellulaire de plusieurs types de cellules cancéreuses^{123,124}. Afin de contrer l'environnement stressant dans lequel les cellules tumorales prolifèrent,

diverses voies de survie cellulaire sont enclenchées dont la surexpression de PIM1. Hsu et *al.*¹²⁵ ont démontré l'implication nouvelle de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN. En effet, l'inhibition par son ARN interférence ou de son activité kinase provoque l'apoptose de cellules cancéreuses de la prostate causée par la diminution de la voie de réparation du NHEJ. Il est important de mentionner qu'une cellule ne pouvant pas réparer son ADN suite à une CDB déclenche son autodestruction par apoptose. L'inhibition de PIM1 affecte l'hétérodimérisation du complexe Ku70/Ku80 et diminue l'expression nucléaire de Ku70¹²⁵. L'étude rapporte également une diminution de l'activité des protéines ATM et DNA-PKcs et que cela entraîne une augmentation des dommages à l'ADN par la surexpression de γ H2AX¹²⁵. Cela suggère que PIM1 joue un rôle crucial dans la régulation du mécanisme de réparation du NHEJ et lorsqu'elle est inhibée, la cellule perd sa capacité de réponse face aux lésions.

La réponse aux dommages à l'ADN en HTAP

Le stress oxydatif et l'inflammation prolongée sont reconnus comme des facteurs contribuant au remodelage vasculaire des cellules HTAP et ils sont autant réputés pour leur contribution aux dommages à l'ADN^{74,126}. Malgré cet environnement hostile, les CMLAP-HTAP survivent et prolifèrent. Cependant, cela a pour conséquence d'entraîner une augmentation des dommages à l'ADN chez les patients atteints d'HTAP par rapport aux sujets sains^{115,116,127}. Une étude faite par Meloche et *al.*¹¹⁶ démontre une adaptation cellulaire face à ces dommages par une sur-activation de la DDR via l'activité de la poly (ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1). Ces travaux ont permis de montrer *in vitro* la présence d'une élévation des marqueurs de dommage à l'ADN ainsi qu'une augmentation de PARP-1 dans les CMLAP-HTAP et les tissus humains en comparaison aux contrôles. Afin de démontrer que l'inflammation, entre autres, est capable d'induire des dommages à l'ADN et d'augmenter l'activité de PARP-1, des cellules contrôles ont été traitées avec différents facteurs inflammatoires, et effectivement, ce traitement permet d'inférer un phénotype malade chez ces cellules. L'activation de PARP-1 est associée à une augmentation de NFAT, impliqué dans le phénotype pro-survie des

CMLAP-HTAP permettant ainsi d'y voir un potentiel thérapeutique à l'inhibition de PARP-1. L'inhibition de PARP-1 chez deux modèles animaux permet d'améliorer les fonctions hémodynamiques liées à l'HTAP et de rétablir la balance entre la prolifération et l'apoptose. Cela est très intéressant, car une altération dans la DDR, ici par la surexpression de l'activité de PARP-1, participe au remodelage vasculaire et son inhibition réverse l'HTAP dans les études *in vivo*. Le groupe de recherche en Hypertension Pulmonaire a présentement débuté une étude clinique (NCT03251872) sous la supervision de Steeve Provencher, M.Sc, MD utilisant un inhibiteur de PARP-1 (Olaparib) comme thérapie pour l'HTAP.

PROBLÉMATIQUE

La compréhension du développement de l'HTAP et l'effort déployé à trouver des traitements sont en plein essor. Tel que mentionné, l'HTAP est une maladie complexe, multifactorielle et fatale. Bien que beaucoup de progrès aient été faits, plusieurs questions demeurent sans réponse. Les patients réagissent différemment aux traitements actuels et cela est dû à l'expression d'acteurs moléculaires distincts propres aux cellules malades et du degré de sévérité de la maladie chez le patient. Aucun traitement actuel n'est curatif, il est donc indispensable de continuer les recherches. Cela va permettre de trouver de nouveaux facteurs, de nouvelles voies moléculaires et d'explorer d'autres inhibiteurs dans le but éventuel de se tourner vers la médecine spécialisée.

HYPOTHÈSES

Le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires est bien établi et demeure une cible thérapeutique de choix dans le but premier de diminuer le remodelage vasculaire et déboucher les artères pulmonaires. Le SGI-1776 est un imidazo[1,2-b] pyridazine permettant l'inhibition de l'activité kinase de PIM1, agissant comme un compétiteur d'ATP. Le SGI-1776 est également entré en phase clinique pour le cancer (NCT00848601). Plusieurs nouvelles molécules ont pu être développées grâce au SGI-1776 et l'inhibition de PIM1 est toujours un sujet d'actualité comme cible anti-tumorale¹²⁸. L'utilisation des inhibiteurs de PIM en clinique pour les patients atteints d'HTAP sera ainsi grandement facilitée par tous les efforts fournis en oncologie pour le développement d'inhibiteurs de PIM1 spécifiques et sans effets secondaires.

Nous avons donc émis les hypothèses de travail suivantes :

- PIM1 est surexprimée dans les poumons, les artères pulmonaires distales et les CMLAP en culture issus de patients HTAP
- PIM1 est impliquée dans la réparation du dommage à l'ADN par le mécanisme du NHEJ

- L'inhibition de PIM1 va entrainer l'accumulation des dommages et l'entrée en apoptose des CMLAP-HTAP
- Le traitement *in vivo* sur un modèle préclinique d'HTAP possède la capacité d'améliorer les paramètres hémodynamiques liés à la réduction du remodelage vasculaire des APD
- L'inhibition de l'activité de PIM1 par le SGI-1776 représente un potentiel thérapeutique

OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'objectif général de ma maîtrise fut de déterminer le rôle de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN et quel mécanisme est touché lors de son inhibition. Les objectifs sous-jacents ont été de :

1- Démontrer que le niveau d'expression de PIM1 et de γ H2AX est augmenté dans les CMLAP-HTAP et dans les poumons des patients HTAP en comparaison de sujets sains.

2- Déterminer le niveau d'expression des protéines du NHEJ en HTAP *in vitro* comparativement aux cellules saines.

3- Vérifier l'effet de l'inhibition de PIM1 sur ces protéines de réparation et l'impact sur les dommages à l'ADN en eux-mêmes.

4- Confirmer l'efficacité du traitement et son potentiel thérapeutique sur les CMLAP malades en ce qui a trait au rétablissement de la balance entre la prolifération et l'apoptose.

5- Tester l'inhibition de PIM1 par le SGI-1776 sur le modèle animal monocrotaline et vérifier l'effet sur le remodelage vasculaire.

INSERTION D'ARTICLE

Pim-1 inhibition decreases DNA damage repair signaling pathways in pulmonary hypertension.

Marie-Claude Lampron, Renée Paradis, Ève Tremblay, Jolyane Meloche, Nolwenn Samson and Roxane Paulin*.

*Pulmonary hypertension and vascular biology research group, Heart and Lung Institute of Quebec, Department of Medicine, Université Laval.

Corresponding author: Roxane Paulin

2725 Chemin Sainte-Foy, office A2136

Québec (Qc) G1V 4G5

Phone: (1)-418-656-8711 ext. 1486

E-mail: roxane.paulin@criucpq.ulaval.ca

RÉSUMÉ

Introduction : L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie caractérisée par une augmentation des pressions pulmonaires menant à une défaillance cardiaque droite. Les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CMLAP) sont exposées à un niveau de stress accru notamment dû à l'inflammation des tissus et du milieu pseudo-hypoxique. Malgré cet environnement hostile, elles arrivent à proliférer et à survivre. Toutefois, cela entraîne une augmentation anormale du dommage à l'ADN. Il existe, cependant, un équilibre entre les dommages à l'ADN et les mécanismes de réparation. PIM1, une onco-protéine à l'activité kinase, est surexprimée en HTAP. Elle est impliquée dans plusieurs voies de signalisation cellulaire, telles la survie et la prolifération, mais la voie de réparation du dommage à l'ADN n'a jamais été explorée en HTAP. De plus, l'inhibiteur de PIM1, le SGI-1776, a été testé en essai clinique en cancer, ainsi l'évaluation de son efficacité pour les patients HTAP pourrait rapidement être mise en place.

Objectifs : Évaluer le potentiel thérapeutique du SGI-1776 et élucider l'implication de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN en HTAP.

Méthodes/Résultats : Nous démontrons premièrement que les poumons de patients HTAP (n=10) ainsi que les CMLAP-HTAP (n=5) présentent une surexpression de PIM1. Sur ces mêmes tissus et lignées cellulaires, le précurseur de la reconnaissance des dommages à l'ADN (γ H2AX) est également augmenté comparativement aux sujets sains. Ce précurseur est essentiel à l'initiation de la réparation à l'ADN et l'inhibition de PIM1 par SGI-1776 (1,3 et 5 μ M) diminue la capacité de la réponse au dommage à l'ADN via la voie de la jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) : le traitement cause une diminution des facteurs du NHEJ comme Ku70, DNA-PKcs et γ H2AX (n=4). Par essai comet, nous démontrons que les dommages sont toujours présents et que ceci diminue la prolifération (Ki67 n=3; p<0.05) et augmente l'apoptose (AnnexinV n=3; p<0.05). *In vivo*, le SGI-1776 diminue les pressions pulmonaires (n=30, 30 \pm 2mmHg vs 49 \pm 5mmHg) et diminue le remodelage des artères pulmonaires distales (H&E, 45% vs 65%), ce qui est principalement dû à la restauration de la balance entre la prolifération (Ki67 n=25; p<0.05) et l'apoptose (TUNEL n=25; p<0.05) des artères pulmonaires distales.

Conclusion : Nous avons démontré pour la première fois l'implication de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN en HTAP et que l'inhibition de son activité renverse *in vitro* et *in vivo* l'HTAP.

ABSTRACT

BACKGROUND: Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a fatal disease characterized by the narrowing of pulmonary arteries (PAs) due to vascular remodeling. It is now established that this phenotype is associated with enhanced pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) proliferation and suppressed apoptosis. This phenotype is sustained in part by the activation of several DNA repair pathways allowing PASMC to survive despite the environmental stresses seen in PAH. Pim1 is an oncoprotein upregulated in PAH and that has been implicated in many pro-survival pathways in cancer, including DNA repair. Pim1 inhibitors, like SGI-1776, are already in clinical trials in cancer and could thus be beneficial to PAH patients.

OBJECTIVES: The aim of this study is to demonstrate the implication of Pim1 in the DNA damage response and the beneficial effect of its inhibition by SGI-1776 in human PAH-PASMC and in rat preclinical model of PAH.

METHODS/RESULTS: Using western blot we showed in both human PAH lungs (n=10) and PAH-PASMC (n=5) a significant upregulation of Pim1 compared to control donor (n=5). Pim1 upregulation in PAH was associated with a significant activation of DNA damage sensor (γ H2AX), which is critical for DNA repair initiation. We showed that Pim1 inhibition using SGI-1776 (1,3, and 5 μ M) significantly impaired DNA repair capacity in PASMC (n=4) with a significant repression of Ku70, DNA-PKcs, and γ H2AX and decreased ATM expression. We showed no diminution of DNA damage with SGI-1776 treatment (Comet Assay, n=3). As expected, the lack of DNA repair in SGI-1776 treated PAH-PASMC lead to a significant reduction in proliferation (Ki67 n=3; p<0.05) and resistance to apoptosis (AnnexinV assay n=3; p<0.05). *In vivo*, SGI-1776 10mg*kg⁻¹ given 3 times a week, improves significantly (n=30; p<0.05) monocrotaline-induced PH (decreased RVSP, mean PA pressures and vascular remodeling).

CONCLUSION: We demonstrated for the first time that Pim1 is implicated in DNA repair signaling in PAH-PASMC and that repressing its activity reverses PAH both *in vitro* and *in vivo*.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disease characterized by elevated pulmonary arterial pressure (PAP) and pulmonary vascular resistance (PVR) leading to right ventricular failure and death¹. PAH is marked by an obliterative vascular remodeling that is due to increased proliferation and suppressed apoptosis in the resistance pulmonary artery (PA) vascular cells, including smooth muscle cells (PASMC). We demonstrated few years ago, that the serine threonine kinase Pim1 is involved in PAH^{2, 3}, contributing to the sustainability of the proproliferative and antiapoptotic phenotype by activating the nuclear factor of activated T-cells (NFAT)². We found that STAT3 plays a role in the regulation of Pim1 expression in PAH. Pim-1 can also phosphorylate Bad, a BH3-containing Bcl-2 family member protein, leading to this pro-apoptotic protein to be sequestered by 14-3-3 proteins and blocking the apoptotic effect⁴. We found that Pim1 inhibition is beneficial in pre-clinical models and that Pim1 KO mice are resistant to monocrotaline and hypoxia induced PAH. Because Pim1 is poorly expressed in healthy blood vessels and has limited and nonlethal implication in physiological processes, it actually represents an ideal therapeutic target. Our findings have been pushed into clinic and we demonstrated that Pim-1 plasma levels are higher in PAH patients than in controls. Pim-1 appropriately discriminated proliferative PAH from controls, revealing Pim-1 levels as an independent predictor of mortality and a promising new biomarker in PAH.

Since our findings in 2008, several new properties have been attributed to Pim1 that could be also applicable to PAH pathogenesis. For instance, data suggest that Pim-1 plays a crucial role in the regulation of the Non-homologous end joining (NHEJ) repair⁵, a pathway that repairs double-strand breaks (DSBs) in DNA. NHEJ is initiated when free DNA ends are bound by Ku70 and Ku80, which recruit the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase (DNA-PKcs). The resulting complex phosphorylates downstream targets leading to activation of the DNA damage response and initiation of NHEJ. Pim-1 knockdown dramatically decreased

the DNA end-binding of both Ku70 and Ku80 resulting in reduced activity of the DNA-PKcs⁵.

We recently described that DNA repair is increased in PAH, with activation of the Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) that allow proliferation despite the presence of DNA-damaging insults⁶. PARP-1 is an abundant nuclear enzyme that synthesizes poly(ADP-ribose) polymer when activated by DNA nicks or breaks. Evidences suggest that there is interplay between NHEJ components and PARP1. In particular, PARP1 interacts with the Ku proteins *in vitro* and *in vivo*⁷. Moreover, Ku70, Ku80, and DNA-PKcs are capable of binding poly(ADP-ribose) polymer⁸⁻¹⁰. In addition, PARP1 and Ku80 compete for DNA ends *in vitro*¹¹. Pim1 knockdown has also been associated with PARP-1 cleavage and associated apoptosis, suggesting that Pim1 decreases DNA repair⁵. **Therefore, we hypothesized that Pim1 is involved in DNA repair in PAH, in part through the activation of Ku70.**

Interestingly, new Pim1 specific inhibitors, such as the SGI-1776¹², have been recently developed and could be revealed as new therapeutic options for PAH. We propose therefore to study the implication of Pim1 in DNA repair in PAH and to test whether SGI-1776 reverses PAH *in vitro* and *in vivo*. SGI-1776, an imidazo pyridazine compound initially found through virtual screening, that has already entered phase I of clinical trials^{13, 14}.

MATERIAL AND METHODS

All experiments were performed with the approval of Laval University and the IUCPQ Biosafety and Ethics Committees.

Human Tissue Samples

Experimental procedures using human tissues or cells conform to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Tissues were obtained from patients who had previously given signed consent. Controls lung tissues were obtained during lung resection for tumors and demonstrated normal lung parenchyma. All the PAH tissues

were from lung explants from transplant or autopsy. All PAH patients had right catheterization that confirmed pulmonary hypertension (mean PAP \geq 25 mmHg at rest), PAH and control donor were matched for age and sex.¹⁵

Cell Culture and Treatments

PAH-PASMCs were isolated from small pulmonary arteries (<1000 μ m diameter) from 6 PAH patients. Controls PASMCs (n=4 cells lines) were either purchased from Cell Application (San Diego, CA) or isolated from non-PAH patients as previously described.^{6, 16} PASMC phenotype was confirmed as previously described.^{6, 16, 17} siRNAs were transfected at a final concentration of 20nM with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fischer Scientific).

Proliferation and apoptosis measurements

Cultured human control and PAH-PASMCs were exposed to 10% FBS (a condition that is known to promote proliferation) or 0.1% FBS (a starvation condition that promotes apoptosis). PASMC proliferation was measured by Ki67 labeling and apoptosis by AnnexinV assay. The percentage of cells with nuclear Ki67 was calculated by dividing the number of the total number of nuclei (DAPI), thus permitting the determination of percent values for each condition. At least 250 cells by cell line in 3 cell lines were counted.

Immunoblots

For Western blotting, protein lysates were prepared from healthy and PAH tissues or PASMCs in a 2% Chaps protein extraction buffer containing protease Inhibitor (Roche) and phosphatase Inhibitor Cocktails (Sigma). The protein concentration of the extracts was determined using Bradford Assay (Bio-Rad). Equal amounts of protein were separated by SDS gel electrophoresis, transferred to PVDF membranes and incubated with either 5% non-fat dry milk or 10% goat serum in TBS-T buffer, then membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in 3% BSA. Next, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 2 hours at room

temperature in 5% non-fat milk or in 3% BSA. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin–Elmer) and using the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to Amidoblack.

Antibody	species	reference	dilution
γH2AX	Mouse	Abcam, ab26350	1:1000
Pim1	Rabbit	Cell Signaling, 3247S	1:1000
Ku70 (A-9)	Mouse	Santa Cruz, SC-5309	1:300
Bad (S112)	Rabbit	Cell Signaling, 9291	1:1000
Bad	Rabbit	Cell Signaling, 9292	1:1000
ATR (Thr1989)	Rabbit	Gene Tex, GTX128145	1:1000
ATR	Rabbit	Cell Signaling, 2790S	1:1000
ATM (S1981)	Rabbit	R&D system, AF1655	1:1000
ATM	Mouse	Abcam, ab78	1:1000
DNA-PKcs (S2056)	Rabbit	Abcam, ab18192	1:1000
DNA-PKcs	Rabbit	Abcam, ab70250	1:1000
TCTP	Rabbit	Novus Biological, NB100-92315	1:1000
STAT3 (Y705)	Rabbit	Cell Signaling, 9131S	1:1000
STAT3 (124H6)	Mouse	Cell Signaling, 9139S	1:1000

Immunohistochemistry and Immunofluorescence Studies

Paraffin-embedded lungs were serially sectioned at 5µm. Following citrate-based antigen retrieval, the sections were blocked with goat serum (5%) for 1 hour. Then, sections were incubated with primary antibodies at 4°C overnight. Rabbit polyclonal anti-Ki67 (1:400, Millipore), and mouse monoclonal anti alpha smooth muscle actin (αSMA, 1:200, Sigma) were used as primary antibodies. Proteins were detected using appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies. Apoptosis was detected by *in situ* direct DNA fragmentation (TUNEL) assay, according to manufacturer’s instructions. Images were obtained with a Zeiss Axio Observer microscope with ApoTome. Arterial wall thickness, medial proliferation and apoptosis were assessed using standard protocols as previously described.^{6, 16, 18}

The percentage of Ki67 or TUNEL-positive PASMCs was calculated by examining randomly 25 selected distal pulmonary arteries (<500µm) from 6 to 8 rats from each experimental group.

Comet assay

Individual cells were embedded in a thin agarose gel on a microscope slide and lysed to remove cellular proteins. DNA was allowed to unwind under alkaline/neutral conditions. Following the unwinding, DNA undergone electrophoresis, allowing the broken DNA fragments or damaged DNA to migrate away from the nucleus (Comet Assay #4250-050-K). The gel was stained with Silver Staining Components (4254-200-K) and the length of tail was evaluated. The extent of DNA liberated from the head of the comet is directly proportional to the amount of DNA damage.

Animal Models

Male 250–350g Sprague-Dawley rats were injected subcutaneously with 60 mg/kg of crotonaline (Sigma). Once PAH was established (15 days post MCT injection), SGI-1776 (10mg/kg) or vehicle (Dextrose 5%) was administered by gavage 3 times a week for 2 weeks.

At the time of sacrifice, rats were anesthetized with 3%-4% isoflurane and maintained under 2% isoflurane during procedures. Hemodynamic parameters, including right ventricular (RV) systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), RV cardiac output (CO) and total pulmonary resistance (TPR) were measured blindly by closed chest right heart catheterization (SciSence catheters), as previously described.^{6, 16, 19} Right ventricular hypertrophy was measured as a ratio of right ventricular weight to left ventricular plus septal weight (RV/LV+S). Arterial wall thickness was quantified using Hematoxylin and Eosin (H&E) stain, by subtracting the lumen area from total pulmonary artery area and reported on % over total artery area. 2 measurements per artery in 15 arteries(<500µm) per animal in at least 6 animals per group were performed.

Statistical Analysis

Values were expressed in fold changes or mean±SEM. Unpaired Student t test was used for comparisons between 2 groups and 1-way ANOVA followed by a Holm–Sidak multiple comparisons was used for >2 groups when n≥5 per group. We performed nonparametric analyses for groups with n<5 (Mann–Whitney test for 1 or 2 groups or Kruskal–Wallis test for >2 groups). If the variances of different groups were not equal and depended on the mean of the data, statistical analyses were performed on log transformation of the data. Probability values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed using Prism 6 (GraphPad Software Inc).

RESULTS

Pim1 is increased in PAH and its expression is stimulated by DNA damage

In order to confirm our previous findings, we studied the expression of Pim1 in the lung of healthy patients and patients with PAH, as well as in isolated control and PAH-PASMCs cells. In both lungs and cell lines lysates, we found a strong increase in Pim1 expression, confirming the results obtained few years ago (**Figure 1A**). We also measured the level of DNA damage. In the same samples, we evaluated the level of phosphorylation of the histone variant H2AX (γ H2AX), a well-known marker of DNA double strand breaks. We detected γ H2AX expression increased in PAH-PASMCs and PAH-lungs (**Figure 1B**), suggesting that PAH patients have more DNA damages than controls one. We then evaluated the DNA damage index using a comet assay. In this assay, loops containing a break lose their supercoiling properties and become free to migrate toward the anode, creating a comet tail for which the length is relative to the number of DNA breaks. We found that the DNA damage index (DDI) is higher in PAH-PASMCs compared to controls (**Figure 1C**). Indeed, control-PASMCs have more grades 0 to 2 DDI, suggesting they have no or few DNA DSB whereas PAH-PASMCs have more grade 2-4 DDI, showing they have

a lot of damages and that these damages are severe. This suggests a susceptibility to DNA damage in patients with PAH and these results are in keeping with previous research from our lab showing that the inhibition of DNA damage repair machinery in PAH is beneficial by inducing apoptosis of the damaged cells in affected pulmonary arteries⁶. We previously demonstrated that Pim1 expression is regulated by STAT3 in PAH². STAT3 activity and pim1 expression are known to be stimulated by growth factor, cytokines²⁰ (TNF and IL-6), hypoxia²¹ and also by cancer chemotherapeutic drugs such as tubulin-binding agents that are also known to increase DNA damage²². Therefore, we wondered if DNA damage itself can stimulate Pim1 expression, through STAT3 activation. To answer this question, we stimulated control-PASMCs with increased doses of Etoposide and looked at STAT3/Pim1 axis activation by Western Blot. The increased doses of Etoposide first induced a dose response in γ H2AX expression, suggesting that the treatments caused a croissant level of DNA damages in the cells (**Figure 1D**). Pim1 expression was also increased after Etoposide treatments, in a dose-dependent manner confirming that Pim1 expression is stimulated by DNA damages (**Figure 1D**). STAT3 expression and activation (P-Y705-STAT3) was however maximally increased with the lower dose of etoposide, suggesting that STAT3 might not be the only transcription factor responsible for Pim1 expression in response to DNA damaging agents (**Figure 1D**).

Pim1 inhibition by SGI-1776 decreases DNA damage repair

In order to study the effect of Pim1 inhibition on the DNA damage response, PAH-PASMCs were treated with vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5 μ M) for 48h. Treatment efficiency was evaluated by Western Blot using the phosphorylation statute of Bad, a well-known Pim1 kinase activity target. SGI-1776 decreased in a dose dependent manner the phosphorylation of BAD (**Figure 2A**), without affecting the expression of total BAD, showing that Pim1 kinase activity was indeed gradually inhibited by the increasing doses of SGI-1776. Pim1 inhibition was clearly associated with a strong dose-dependent decrease in γ H2AX (**Figure 2A**). To determine whether this decrease in γ H2AX was due to a decrease in DNA damage or a

decrease in DNA repair, we performed a comet assay to measure DSBs and the DDI. SGI-1776 treatments were not associated with a decrease in DNA damage as the number of grade 2 to 4 DDI was not significantly affected (**Figure 2B**) by SGI-1776 treatments. This result suggests that Pim1 might play a role in DNA damage recognition and in the primary events involved in DNA repair, before H2AX phosphorylation.

DSBs are predominantly repaired by the canonical NHEJ pathway²³. The initial step is the recognition and binding of the Ku heterodimer (Ku70 and Ku80) to the DSBs²⁴,²⁵ maintaining the stability of DNA ends by protecting them from non-specific processing. Then, DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) is recruited by the Ku heterodimer to the site of damage to help for the recruitment of XRCC4/DNA ligase IV complex, which is responsible for the ligation step²⁶. DNA-PK, along with ATM (ataxia teleangiectasia mutated), ATR (ATM and Rad3-related), is a member of the phosphatidylinositol 3'-kinase-like kinase (PIKK) family, which is predominantly responsible for H2AX phosphorylation²⁷. Considering that Pim-1 knockdown has been shown to dramatically decrease the DNA end-binding of both Ku70 and Ku80 resulting in reduced activity of the DNA-PKcs⁵, we hypothesized that Pim1 inhibition in PAH is associated with a decrease in the cNHEJ DSB repair. We therefore studied whether Ku70 and DNA-PKcs expression are changed in PAH patients compared to healthy donors. We found that both Ku70 and DNA-PKcs expressions are increased in PAH-PASMCs compared to controls (**Figure 3A**). Moreover, in PAH PASMCs, we found that the nuclear expression of Ku70 was increased compared to control cells (**Figure 3B**, negative controls presented in **Supplemental Figure 2**). Treatments with SGI-1776 were associated with a small but not significant decrease in Ku70 expression and a decrease in its nuclear localization compared to vehicle treated cells (**Figure 3B**). Next, we studied whether SGI-1776 treatments affected DNA-PKcs expression and activity. By western Blot we found that DNA-PKcs expression and phosphorylation were decreased upon SGI-1776 treatments. (**Figure 3C**).

In order to ensure that the inhibition of cNHEJ was not due to an off-target effect of SGI-1776, we inhibited specifically Pim1 using a siRNA. In PAH-PASMCs treated with siPim1 (20nM, 48h), we indeed found a 50% decrease in Ku70 expression and a 50% decrease in DNA-PK expression and phosphorylation (**Figure 4**). This was also associated with a 90% decrease in H2AX phosphorylation (**Figure 4**). Next, to determine whether Ku70 was the only Pim1 downstream target involved in H2AX phosphorylation, we treated cells with siKu70. PAH-PASMCs treated with siKu70 had a 50% decrease in DNA-PKcs expression while H2AX phosphorylation was only affected by 50% (**Supplemental Figure 2A**). This result suggests that Ku70 is not the probably not the only Pim1 downstream target to be involved in H2AX phosphorylation. We therefore studied whether Pim1 inhibition could affect other kinases that phosphorylate H2AX, i.e. ATM, ATR. First, we measured that ATM and ATR expression and phosphorylation were slightly increased in PAH cells compared to control cells (**Figure 5A**). Upon Pim1 inhibition by either SGI-1776 treatments or siRNA, both ATM and ATR expression and phosphorylation were decreased (**Figure 5B and Supplemental Figure 3**). In seek of a common mechanism by which Pim1 could control Ku70, ATM and ATR, we were particularly interested in the translationally controlled tumor protein (TCTP). TCTP was described as an upstream mediator of Ku70²⁸, ATM²⁹ and DNA-PKcs³⁰ signaling. Moreover, a recent report showed that TCTP can associates with the C-terminus region of Pim3 (sharing more than 60% homology with Pim1 and Pim2), suggesting that TCTP could be a Pim1 target. We studied whether TCTP expression was changed in PAH cells and whether Pim1 inhibition was affecting TCTP in any way. TCTP expression was strongly increased in PAH-PASMCs compared to control cells and Pim1 inhibition by either SGI-1776 treatments or siRNA decreased TCTP expression in a dose-dependent manner.

Pim1 inhibition by SGI-1776 decreases PAH-PASMCs proliferation and induces apoptosis

SGI-1776 has been shown to induce apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells³¹ and to effectively reduce renal cell carcinoma cell clonogenic

survival when used at 5-10 μ M in RCC cell lines.¹⁴. We exposed PAH-PASMCs to 10% serum for 48h and treated them with vehicle or SGI-1776 (1, 3, and 5 μ M) for 48h. Cell proliferation was quantified by Ki-67 labeling (**Fig. 3A**, negative controls presented in **Supplemental Figure 2**), as previously published by our group^{2, 6, 16, 19, 32-34}. While the optimal concentration of SGI-1776 on cancer cells seemed to be between 5 and 10 μ M, our results show that a concentration of 3 μ M decreases PAH-PASMCs proliferation already by 50% (**Figure 6**). Then we exposed PAH-PASMCs to 0.1% FBS, a “starvation” condition that promotes apoptosis, for 24h. Cells undergoing apoptosis were detected by IF using Annexin V assays, as previously described^{2, 6, 16, 19, 32-34}. SGI-1776 treatments induced a 3-fold increase in PAH-PASMCs apoptosis compare to vehicle treated ones that are still resistant to apoptosis (**Figure 6**).

As expected, SGI-1776 did not affect significantly the proliferation or apoptosis in Control cells (**Figure 6**). Indeed, Pim1 is not expressed in control cells, therefore SGI-1776 is not supposed to have an effect. This is an important point; as such therapy will not affect healthy cells in PAH.

SGI-1776 reduces pulmonary pressures and improves RV function in animal models of PAH

We next tested the effect of Pim1 inhibition by SGI-1776 in vivo in animal models of PAH. 40 rats were first injected with 60mg.kg⁻¹ of monocrotaline to induce PAH. Two weeks post-monocrotaline injection, they were randomly assigned to receive either no treatment, the vehicle alone or SGI-1776 (10mg.kg⁻¹) by gavage, 3 days a week for 2 weeks. Inhibition of Pim1 with SGI-1776 significantly improved hemodynamic measurements with a decrease in the mean pulmonary pressure (35mmHg vs 52mmHg \pm 2mmHg, n=15) and the right ventricular systolic pressure compared to vehicle treated rats (**Figure 7A**). Despite the improvement of mPAP, we did not measure any changes in RV hypertrophy (Fulton index), probably due to the fact the mPAP pressures were still >30mmHg(**Figure 7A**). Vascular remodeling assessed by the percent medial wall thickness was improved by SGI-1776 treatments (**Figure 7B**). Proliferation and apoptosis resistance of PASMCs within the arterial wall were

evaluated by immunofluorescence. The percentage of PSMCs with nuclear Ki67 was decreased by SGI-1776 compared to vehicle treated rats and the percentage of cells with a nuclear TUNEL staining was increased, suggesting a decrease in proliferation and an increase in the apoptosis of PSMCs (**Figure 7C**). The efficiency of treatments was evaluated by measuring Bad phosphorylation in the lung of treated rats. Bad phosphorylation was significantly reduced (around a 3-fold decrease) in SGI-1776 treated rats compared to vehicle treated rats (n=8 to 10 rats/group) (**Supplemental Figure 4**). Moreover, DNA-PKcs and H2AX phosphorylations were also decreased by about 50% in SGI-1776 treated rats (n=8 to 10 rats/group) (**Supplemental Figure 4**).

DISCUSSION

In the present study, we found that the serine threonine kinase Pim1 plays a role in the regulation of DNA damage repair in the pathogenesis of PAH. We showed that Pim1 inhibition by either SGI-1776 or siRNA decreased the expression and phosphorylation status of several proteins implicated in DSB repair by the NHEJ, including Ku70, and DNPKcs. This study therefore confirms previous work done by Hsu et al.⁵ and showing a potential implication of Pim1 in the regulation of Ku70 recruitment on damaged DNA sites. We however failed to prove that Ku70 is the principal target of Pim1 kinase activity. Experiments using Ku70 siRNA showed a smaller decrease in H2AX phosphorylation despite the same degree of DNA-PKcs inhibition in comparison with Pim1 inhibitors, suggesting that Pim1 might also act through other targets. We therefore further focused our study on the phosphatidylinositol 3-kinase-related kinases (PIKK), the major kinases involved in H2AX phosphorylation. DNA-PKcs and ATM are primarily involved in DSB repair, whereas ATR responds to a wide range of DNA lesions, especially those associated with DNA replication³⁵ making ATR essential for the viability of proliferating cells³⁶⁻³⁹. Although ATM and ATR have distinct DNA-damage specificities, they are known to cross talk with each other to a certain extent: ATM can promote the activation of ATR by enhancing DNA end resection⁴⁰⁻⁴², on the other hand H2AX phosphorylation by ATR can influence the recruitment of ATM to the chromatin⁴³; ATM and ATR may

also directly phosphorylate each other⁴⁴. Therefore, it is unclear whether ATM and ATR inhibition following Pim1 decreased activity is direct or indirect through their crosstalk. In search of a potential unique Pim1 target, we were interested in TCTP that has been shown to regulate/interact with Ku70, ATM and DNA-PKcs. TCTP expression and phosphorylation was also affected by Pim1 inhibition, increasing even more the complexity of the mechanism and making it unlikely that Pim1 regulates this pathway in a direct manner.

We previously demonstrated that one of the mechanisms involved in the Pim1-driven apoptosis inhibition involves the pro-apoptotic protein Bad. Therefore, another limit of our study resides in the fact that we didn't explore the proportion of Pim1-driven apoptosis that is Bad-dependent vs DNA-repair dependent. It is also unknown whether the inhibition of both signaling pathways is required and synergistic, whether one of the pathways dominates or whether these 2 pathways are interconnected. For example, c-MYC or p53 that have been involved in both mitochondrial apoptosis^{45, 46} and DNA damage⁴⁷⁻⁴⁹ could be a link between the 2 pathways.

Beside Bad, another well-established Pim1 target is Mdm2, an E3 ubiquitin ligase that mediates ubiquitylation and proteasome-dependent degradation. Mdm2 has been shown to regulate ubiquitination and degradation of several proteins implicated in DNA damage including Ku70⁵⁰ and p53⁵¹. Pim1 has been shown to phosphorylate Mdm2 on Ser(166) and Ser(186)⁵² which controversially seem to inhibit Mdm2 self-ubiquitination and induce Mdm2 stabilization^{53, 54} as well as increase p53 levels⁵². Moreover, Mdm2 has been shown to be phosphorylated by DNA-PKcs at Ser(17)⁵⁵, by ATM at Ser(395)⁵⁶, by ATR at Ser(407)⁵⁷ and to interact with TCTP⁵⁸. While the mechanism by which Mdm2-mediated Pim1 regulation of DNA repair is at that point really unclear, it offers another potential explanation for the results we observed.

SGI-1776 is part of the first generation of Pim-1 inhibitors and is able to inhibit Pim-1S, Pim-1L, Pim-2 and Pim-3 kinases⁴⁶. Additionally, it has been shown that at the concentrations used in our study (1 to 5 μ M) SGI-1776 can inhibit FLT3, cyclin D1, MCL and Myc⁴⁶. We therefore used Pim1 siRNA to distinguish off target SGI-1776

effects. Regarding Ku70, DNA-PKcs, ATM, ATR and TCTP, we found similar results between SGI-1776 and Pim1 siRNA treatments, suggesting that the results we observed were really attributable to Pim1 inhibition. Phase I clinical trials using SGI-1776 revealed cardiotoxicity of that molecule due to suppression of the cardiac potassium channel *human ether-à-go-go-related gene* (hERG)⁵⁹. The development of a new generation of Pim1 inhibitors began with TP-3654 (SGI-9481), which can also inhibit all isoforms of Pim kinase (Pim-1, Pim-2 and Pim-3), but with a small effect on FLT3 and hERG⁵⁹. The next promising second generation Pim kinase inhibitor is AZD1208, an orally available, potent and highly selective Pim inhibitor that effectively inhibits all three isoforms⁶⁰. Despite this specificity, AZD1208 caused inhibition of the Myc pathway *in vitro* and *in vivo* in tumor cells⁶¹ and inhibition of p53 tumor suppressor signaling pathway, which is stabilized by overexpression of Pim-1 kinase through a Mdm2 dependent mechanism⁵². Therefore, not only the Pim1-Mdm2-p53 pathway once again appears as a potentially really important pathway for DNA damage repair, but AZD1208 is also confirmed as a really promising Pim-1 inhibitor that could have very beneficial results for the treatment of pulmonary hypertension.

ACKNOWLEDGMENT

We are really grateful to Dr. Olivier Boucherat, Dr. Sebastien Bonnet and Dr. Steeve Provencher for the support and all the help they have been given during the realization of this study.

SOURCES OF FUNDING

This work is supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research and the Heart and stroke foundation of Canada attributed to RP.

REFERENCES

1. Galie N, Torbicki A, Barst R, Dartevelle P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G, Piro S, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Barbera JA, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R, Pepke-Zaba J and Task F. Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J*. 2004;25:2243-78.
2. Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J, Simard MJ and Bonnet S. Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011;208:535-48.
3. Renard S, Paulin R, Breuils-Bonnet S, Simard S, Pibarot P, Bonnet S and Provencher S. Pim-1: A new biomarker in pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2013;3:74-81.
4. Macdonald A, Campbell DG, Toth R, McLauchlan H, Hastie CJ and Arthur JS. Pim kinases phosphorylate multiple sites on Bad and promote 14-3-3 binding and dissociation from Bcl-XL. *BMC Cell Biol*. 2006;7:1.
5. Hsu JL, Leong PK, Ho YF, Hsu LC, Lu PH, Chen CS and Guh JH. Pim-1 knockdown potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through inhibition of NHEJ DNA repair. *Cancer Lett*. 2012;319:214-22.
6. Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulin A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Couture C, Michelakis ED, Provencher S and Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2014;129:786-97.
7. Galande S and Kohwi-Shigematsu T. Poly(ADP-ribose) polymerase and Ku autoantigen form a complex and synergistically bind to matrix attachment sequences. *J Biol Chem*. 1999;274:20521-8.

8. Pleschke JM, Kleczkowska HE, Strohm M and Althaus FR. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins. *J Biol Chem.* 2000;275:40974-80.
9. Li B, Navarro S, Kasahara N and Comai L. Identification and biochemical characterization of a Werner's syndrome protein complex with Ku70/80 and poly(ADP-ribose) polymerase-1. *J Biol Chem.* 2004;279:13659-67.
10. Gagne JP, Isabelle M, Lo KS, Bourassa S, Hendzel MJ, Dawson VL, Dawson TM and Poirier GG. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. *Nucleic Acids Res.* 2008;36:6959-76.
11. Wang M, Wu W, Wu W, Rosidi B, Zhang L, Wang H and Iliakis G. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:6170-82.
12. Yang Q, Chen LS, Neelapu SS, Miranda RN, Medeiros LJ and Gandhi V. Transcription and translation are primary targets of Pim kinase inhibitor SGI-1776 in mantle cell lymphoma. *Blood.* 2012;120:3491-500.
13. Batra V, Maris JM, Kang MH, Reynolds CP, Houghton PJ, Alexander D, Kolb EA, Gorlick R, Keir ST, Carol H, Lock R, Billups CA and Smith MA. Initial testing (stage 1) of SGI-1776, a PIM1 kinase inhibitor, by the pediatric preclinical testing program. *Pediatr Blood Cancer.* 2012;59:749-52.
14. Mahalingam D, Espitia CM, Medina EC, Esquivel JA, 2nd, Kelly KR, Bearss D, Choy G, Taverna P, Carew JS, Giles FJ and Nawrocki ST. Targeting PIM kinase enhances the activity of sunitinib in renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2011;105:1563-73.
15. Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, Hassoun PM, Rabinovitch M, Nicolls MR and Humbert M. Translating Research into Improved Patient Care in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016.
16. Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Nadeau V, Lambert

- C, Paradis R, Provencher S and Bonnet S. Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2015;117:525-35.
17. Potus F, Malenfant S, Graydon C, Mainguy V, Tremblay È, Breuils-Bonnet S, Ribeiro F, Porlier A, Maltais F, Bonnet S and Provencher S. Impaired Angiogenesis and Peripheral Muscle Microcirculation Loss Contribute to Exercise Intolerance in Pulmonary Arterial Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2014;190:318-328.
 18. Courboulin A, Barrier M, Perreault T, Bonnet P, Tremblay VL, Paulin R, Tremblay E, Lambert C, Jacob MH, Bonnet SN, Provencher S and Bonnet S. Plumbagin reverses proliferation and resistance to apoptosis in experimental PAH. *Eur Respir J*. 2012;40:618-29.
 19. Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, Courboulin A, Boucherat O, Potus F, Meloche J, Pflieger A, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Tremblay E, Girerd B, Hautefort A, Montani D, Fadel E, Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Paulin R, Provencher S and Bonnet S. Role for RUNX2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2016.
 20. Bachmann M and Moroy T. The serine/threonine kinase Pim-1. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37:726-30.
 21. Teh BG. [Pim-1 induced by hypoxia is involved in drug resistance and tumorigenesis of solid tumor cells]. *Hokkaido Igaku Zasshi*. 2004;79:19-26.
 22. Zemskova M, Sahakian E, Bashkirova S and 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;283:20635-44.
 23. Lieber MR. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J Biol Chem*. 2008;283:1-5.
 24. Mari PO, Florea BI, Persengiev SP, Verkaik NS, Bruggenwirth HT, Modesti M, Giglia-Mari G, Bezstarosti K, Demmers JA, Luider TM, Houtsmuller AB and van Gent DC. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18597-602.

25. Uematsu N, Weterings E, Yano K, Morotomi-Yano K, Jakob B, Taucher-Scholz G, Mari PO, van Gent DC, Chen BP and Chen DJ. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol.* 2007;177:219-29.
26. Gonzalez-Marin C, Gosalvez J and Roy R. Types, causes, detection and repair of DNA fragmentation in animal and human sperm cells. *Int J Mol Sci.* 2012;13:14026-52.
27. Podhorecka M, Skladanowski A and Bozko P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J Nucleic Acids.* 2010;2010.
28. Kategaya LS, Hilliard A, Zhang L, Asara JM, Ptacek LJ and Fu YH. Casein kinase 1 proteomics reveal prohibitin 2 function in molecular clock. *PLoS One.* 2012;7:e31987.
29. Hong ST and Choi KW. TCTP directly regulates ATM activity to control genome stability and organ development in *Drosophila melanogaster*. *Nat Commun.* 2013;4:2986.
30. Zhang J, Shim G, de Toledo SM and Azzam EI. The Translationally Controlled Tumor Protein and the Cellular Response to Ionizing Radiation-Induced DNA Damage. *Results Probl Cell Differ.* 2017;64:227-253.
31. Chen LS, Redkar S, Bearss D, Wierda WG and Gandhi V. Pim kinase inhibitor, SGI-1776, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood.* 2009;114:4150-7.
32. Meloche J, Le Guen M, Potus F, Vinck J, Ranchoux B, Johnson I, Antigny F, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, Perros F, Provencher S and Bonnet S. miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2015;309:C363-72.
33. Potus F, Malenfant S, Graydon C, Mainguy V, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, Ribeiro F, Porlier A, Maltais F, Bonnet S and Provencher S. Impaired angiogenesis and peripheral muscle microcirculation loss contribute to exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;190:318-28.
34. Potus F, Ruffenach G, Dahou A, Thebault C, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Nadeau V, Paradis R, Graydon C, Wong R, Johnson I, Paulin R, Lajoie AC, Perron

J, Charbonneau E, Joubert P, Pibarot P, Michelakis ED, Provencher S and Bonnet S. Downregulation of MicroRNA-126 Contributes to the Failing Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2015;132:932-43.

35. Cimprich KA and Cortez D. ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9:616-27.

36. Brown EJ and Baltimore D. ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*. 2000;14:397-402.

37. Brown EJ and Baltimore D. Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*. 2003;17:615-28.

38. de Klein A, Muijtjens M, van Os R, Verhoeven Y, Smit B, Carr AM, Lehmann AR and Hoeijmakers JH. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. *Curr Biol*. 2000;10:479-82.

39. Cortez D, Guntuku S, Qin J and Elledge SJ. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*. 2001;294:1713-6.

40. Jazayeri A, Falck J, Lukas C, Bartek J, Smith GC, Lukas J and Jackson SP. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*. 2006;8:37-45.

41. Myers JS and Cortez D. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. *J Biol Chem*. 2006;281:9346-50.

42. Shiotani B and Zou L. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell*. 2009;33:547-58.

43. Ward IM and Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*. 2001;276:47759-62.

44. Stiff T, Walker SA, Cerosaletti K, Goodarzi AA, Petermann E, Concannon P, O'Driscoll M and Jeggo PA. ATR-dependent phosphorylation and activation of ATM in response to UV treatment or replication fork stalling. *EMBO J*. 2006;25:5775-82.

45. Juin P, Hunt A, Littlewood T, Griffiths B, Swigart LB, Korsmeyer S and Evan G. c-Myc functionally cooperates with Bax to induce apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2002;22:6158-69.

46. Jiang P, Du W and Wu M. p53 and Bad: remote strangers become close friends. *Cell Res*. 2007;17:283-5.

47. Guerra L, Albiñan A, Tronnersjö S, Yan Q, Guidi R, Stenerlow B, Sterzenbach T, Josenhans C, Fox JG, Schauer DB, Thelestam M, Larsson LG, Henriksson M and Frisan T. Myc is required for activation of the ATM-dependent checkpoints in response to DNA damage. *PLoS One*. 2010;5:e8924.
48. Cui F, Fan R, Chen Q, He Y, Song M, Shang Z, Zhang S, Zhu W, Cao J, Guan H and Zhou PK. The involvement of c-Myc in the DNA double-strand break repair via regulating radiation-induced phosphorylation of ATM and DNA-PKcs activity. *Mol Cell Biochem*. 2015;406:43-51.
49. Nakamura Y. ATM: the p53 booster. *Nat Med*. 1998;4:1231-2.
50. Gama V, Gomez JA, Mayo LD, Jackson MW, Danielpour D, Song K, Haas AL, Laughlin MJ and Matsuyama S. Hdm2 is a ubiquitin ligase of Ku70-Akt promotes cell survival by inhibiting Hdm2-dependent Ku70 destabilization. *Cell Death Differ*. 2009;16:758-69.
51. Kubbutat MH, Jones SN and Vousden KH. Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature*. 1997;387:299-303.
52. Hogan C, Hutchison C, Marcar L, Milne D, Saville M, Goodlad J, Kernohan N and Meek D. Elevated levels of oncogenic protein kinase Pim-1 induce the p53 pathway in cultured cells and correlate with increased Mdm2 in mantle cell lymphoma. *J Biol Chem*. 2008;283:18012-23.
53. Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D and Hemmings BA. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279:35510-7.
54. Wood NT, Meek DW and Mackintosh C. 14-3-3 Binding to Pim-phosphorylated Ser166 and Ser186 of human Mdm2--Potential interplay with the PKB/Akt pathway and p14(ARF). *FEBS Lett*. 2009;583:615-20.
55. Mayo LD, Turchi JJ and Berberich SJ. Mdm-2 phosphorylation by DNA-dependent protein kinase prevents interaction with p53. *Cancer Res*. 1997;57:5013-6.
56. Maya R, Balass M, Kim ST, Shkedy D, Leal JF, Shifman O, Moas M, Buschmann T, Ronai Z, Shiloh Y, Kastan MB, Katzir E and Oren M. ATM-dependent

phosphorylation of Mdm2 on serine 395: role in p53 activation by DNA damage. *Genes Dev.* 2001;15:1067-77.

57. Shinozaki T, Nota A, Taya Y and Okamoto K. Functional role of Mdm2 phosphorylation by ATR in attenuation of p53 nuclear export. *Oncogene.* 2003;22:8870-80.

58. Amson R, Pece S, Lespagnol A, Vyas R, Mazzarol G, Tosoni D, Colaluca I, Viale G, Rodrigues-Ferreira S, Wynendaele J, Chaloin O, Hoebeke J, Marine JC, Di Fiore PP and Telerman A. Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med.* 2011;18:91-9.

59. Foulks JM, Carpenter KJ, Luo B, Xu Y, Senina A, Nix R, Chan A, Clifford A, Wilkes M, Vollmer D, Brenning B, Merx S, Lai S, McCullar MV, Ho KK, Albertson DJ, Call LT, Bearss JJ, Tripp S, Liu T, Stephens BJ, Mollard A, Warner SL, Bearss DJ and Kanner SB. A small-molecule inhibitor of PIM kinases as a potential treatment for urothelial carcinomas. *Neoplasia.* 2014;16:403-12.

60. Keeton E, McEachern K, Alimzhanov M, Wang S, Cao Y, Bao L, Palakurthi S, Grondine M, Chen Y and Dillman K. Efficacy and biomarker modulation by AZD1208, a novel, potent and selective pan-Pim kinase inhibitor, in models of acute myeloid leukemia. *Cancer Res.* 2012;72:2796.

61. Kirschner AN, Wang J, van der Meer R, Anderson PD, Franco-Coronel OE, Kushner MH, Everett JH, Hameed O, Keeton EK, Ahdesmaki M, Grosskurth SE, Huszar D and Abdulkadir SA. PIM kinase inhibitor AZD1208 for treatment of MYC-driven prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2015;107.

FIGURE 1:

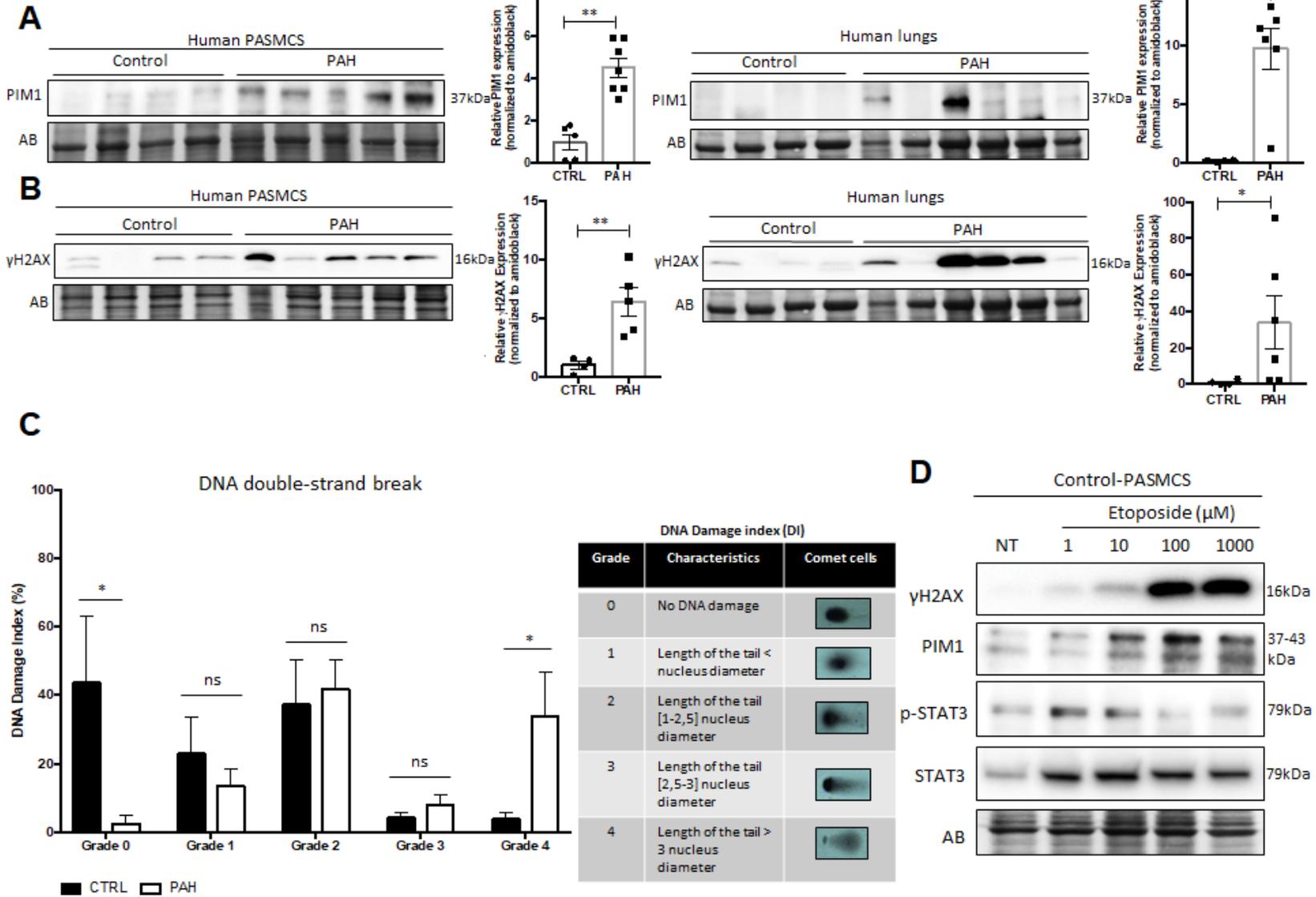


FIGURE 2:

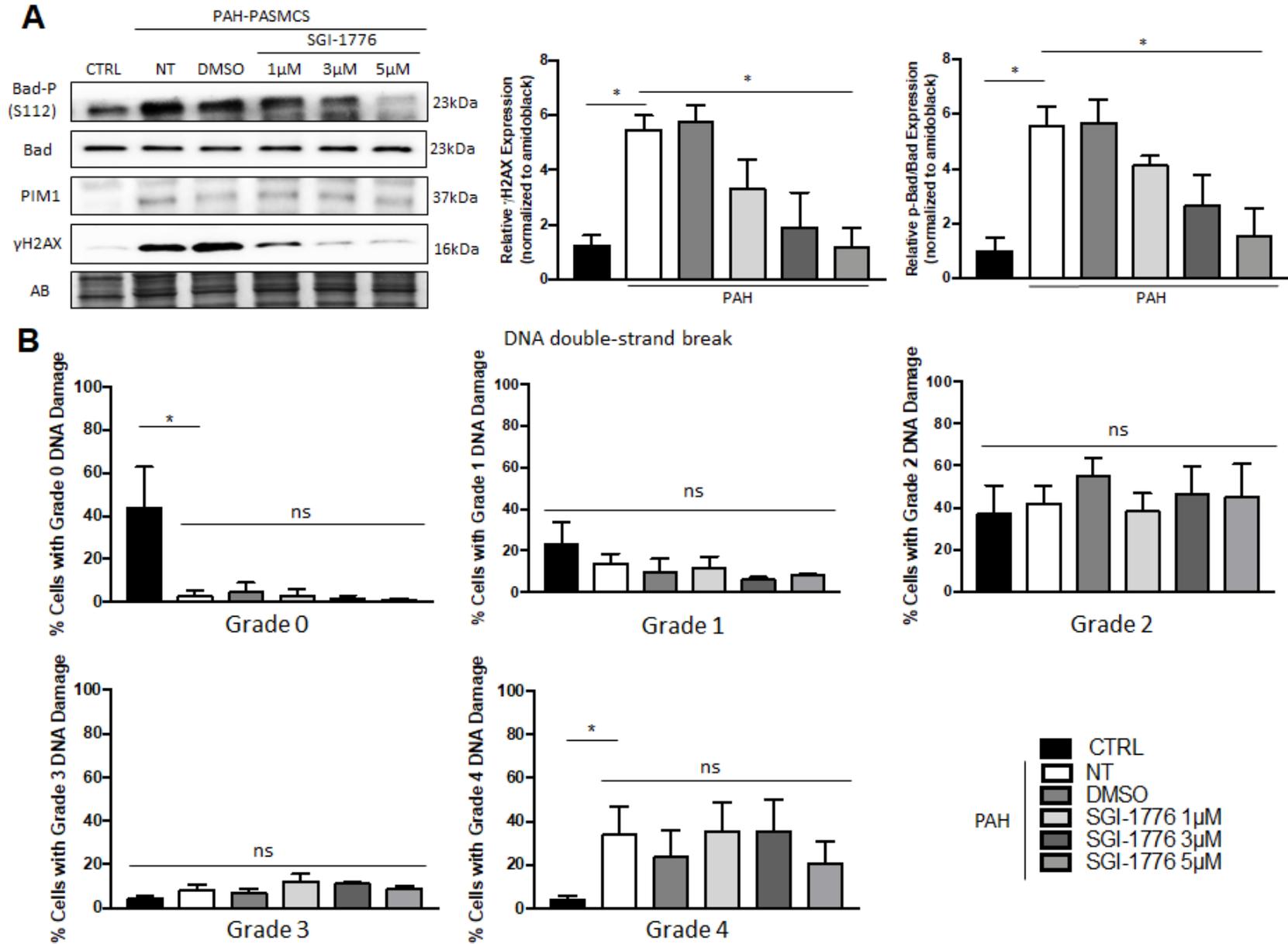


FIGURE 3:

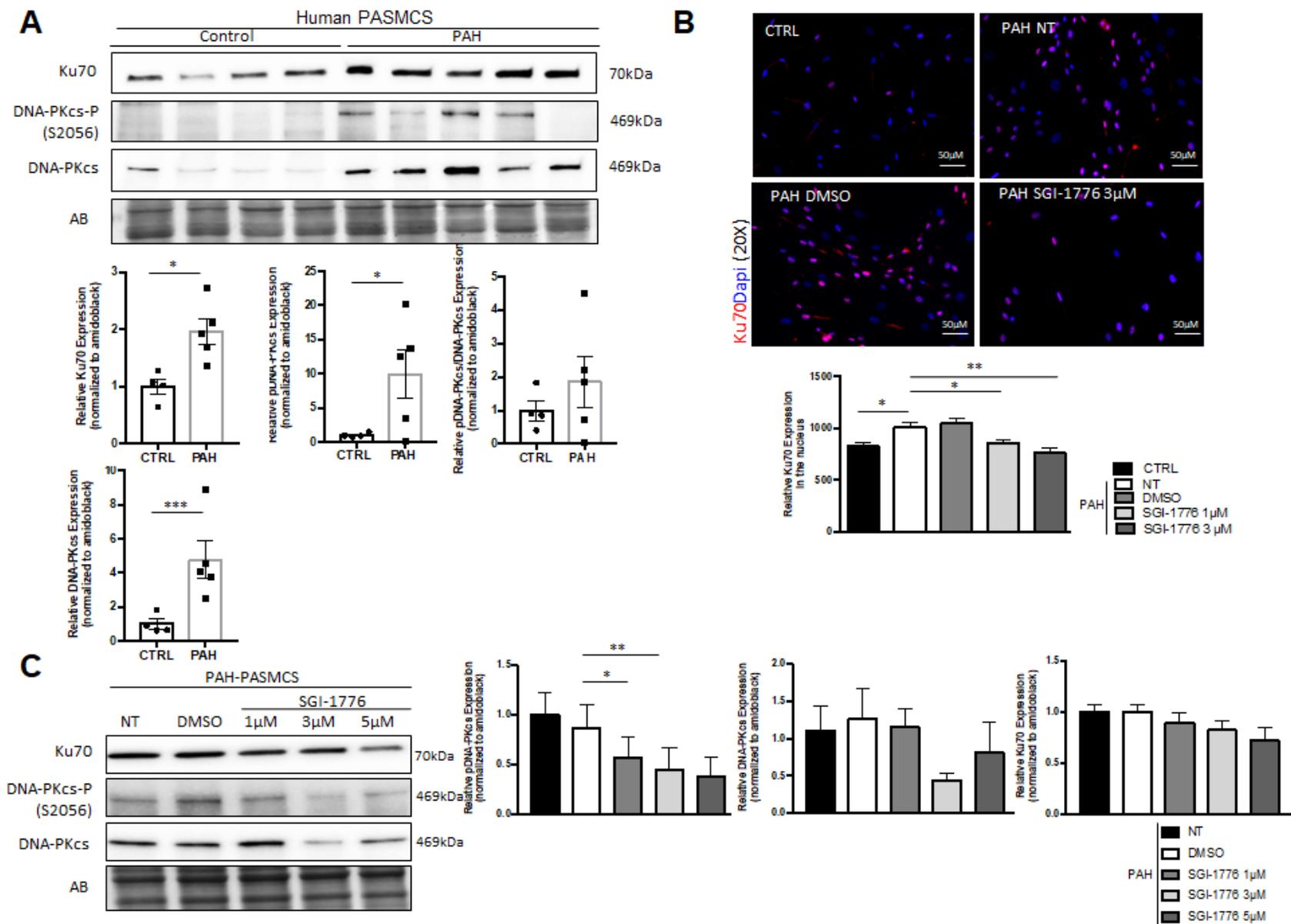


FIGURE 4:

A

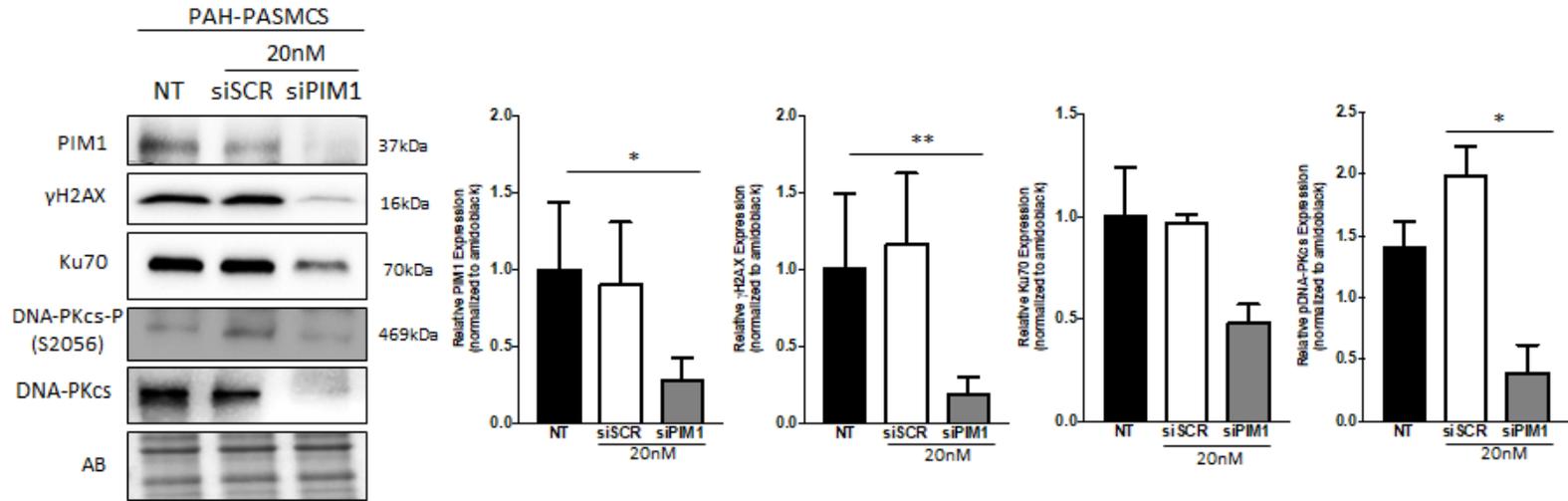


FIGURE 5:

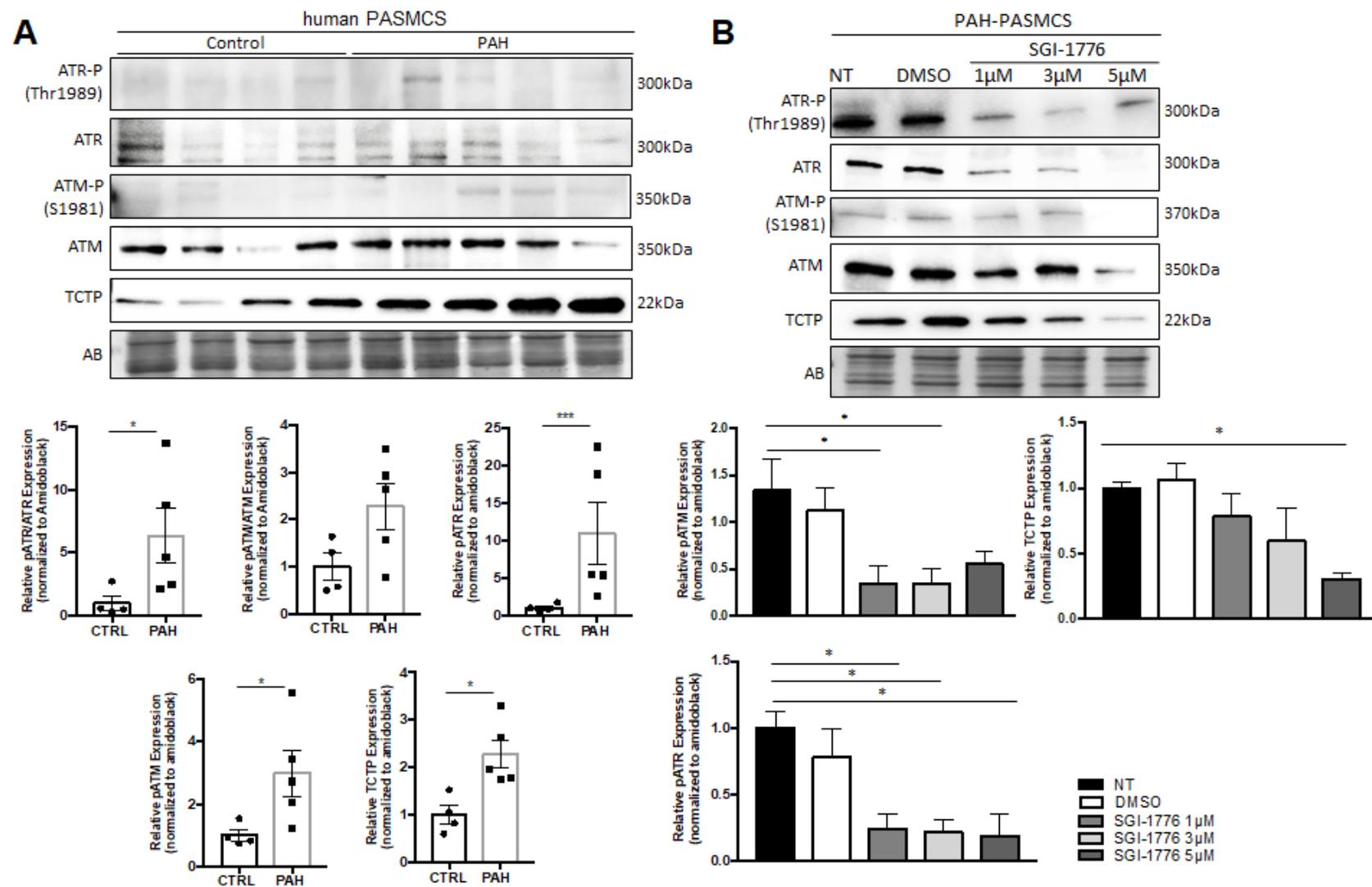


FIGURE 6:

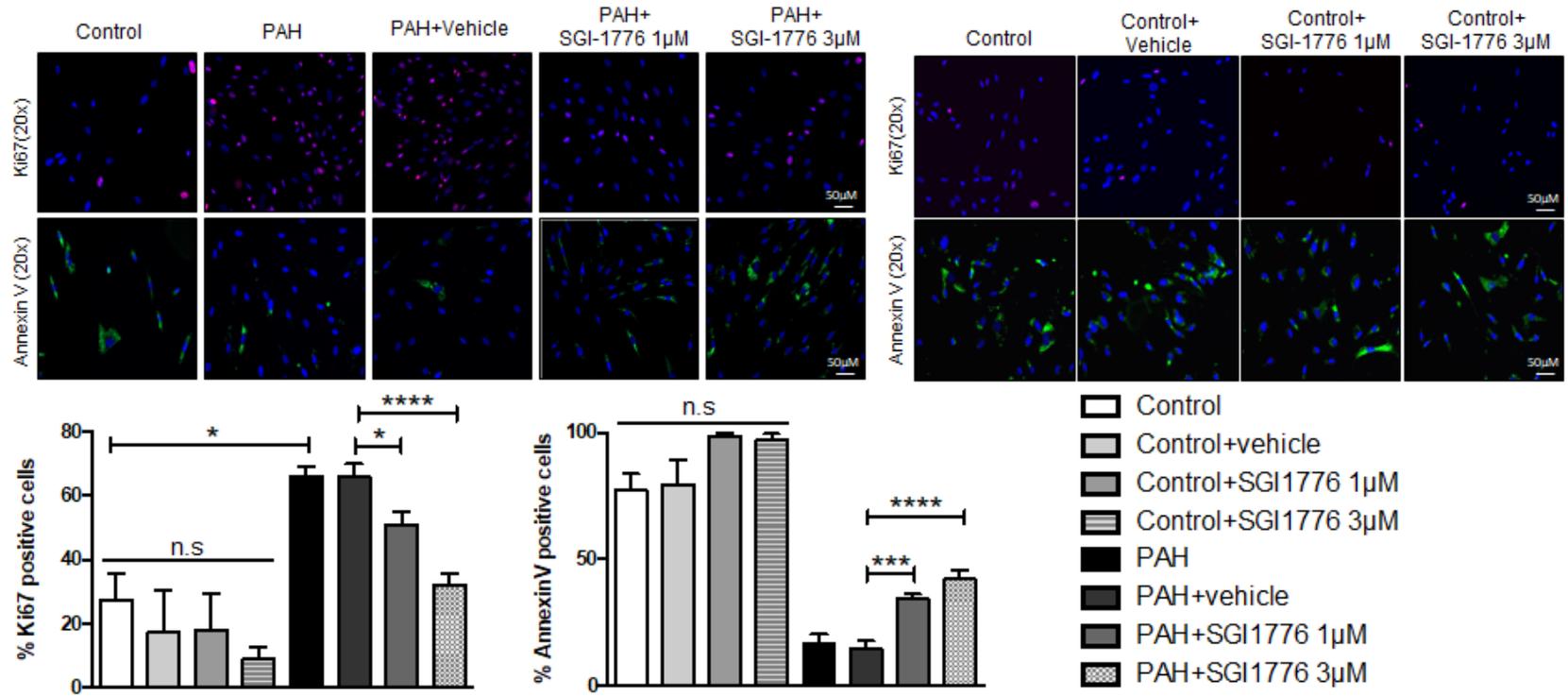
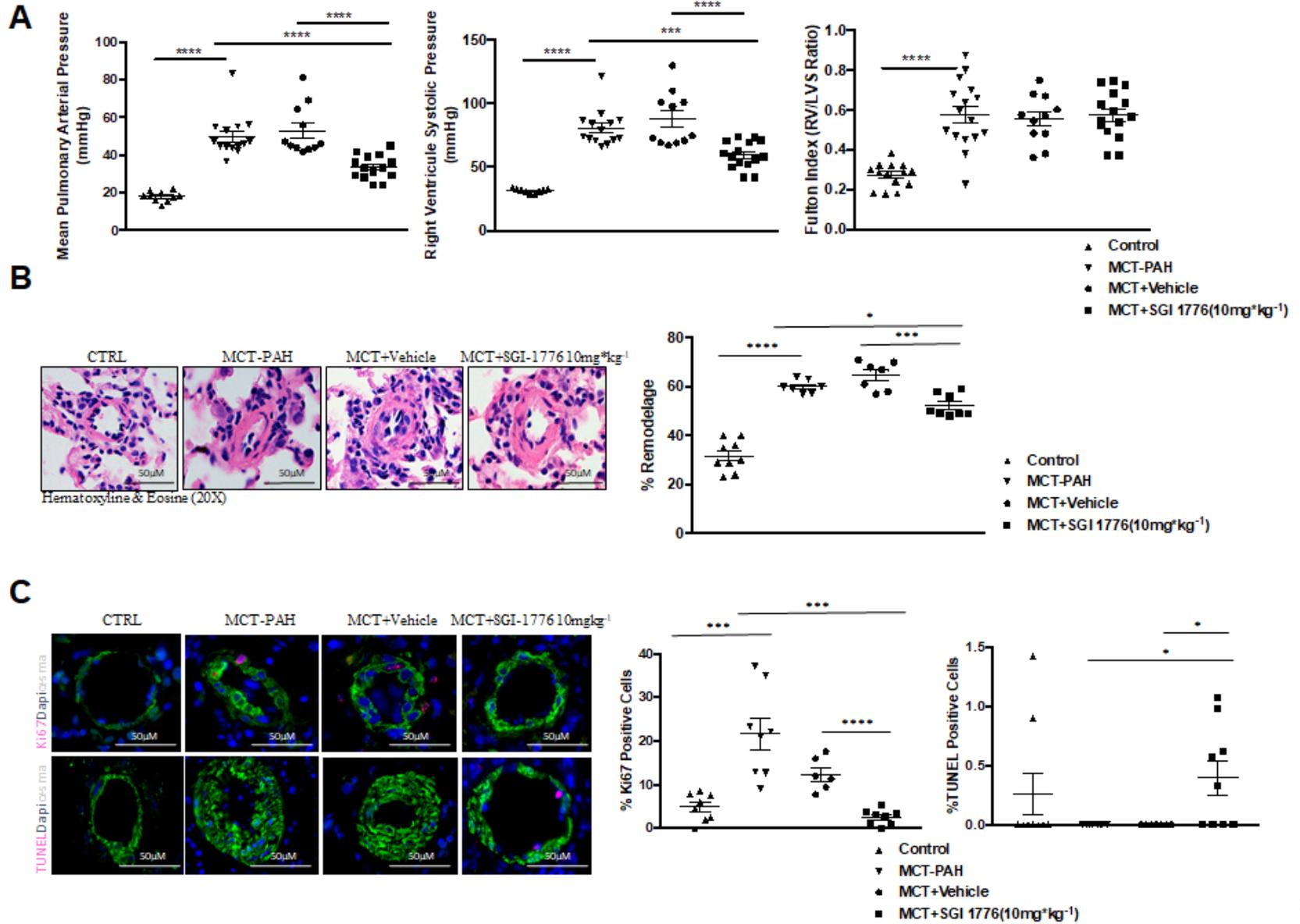
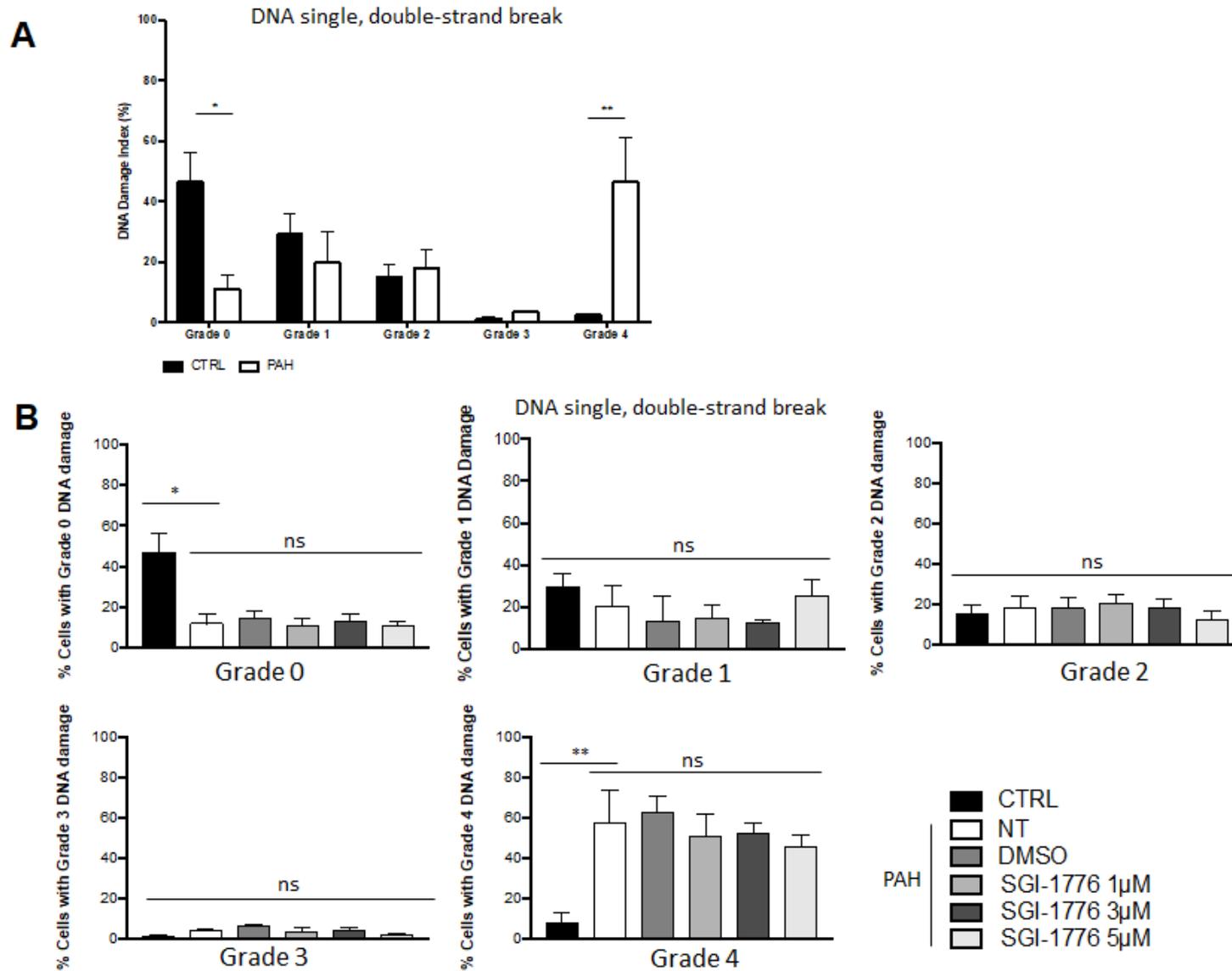


FIGURE 7:

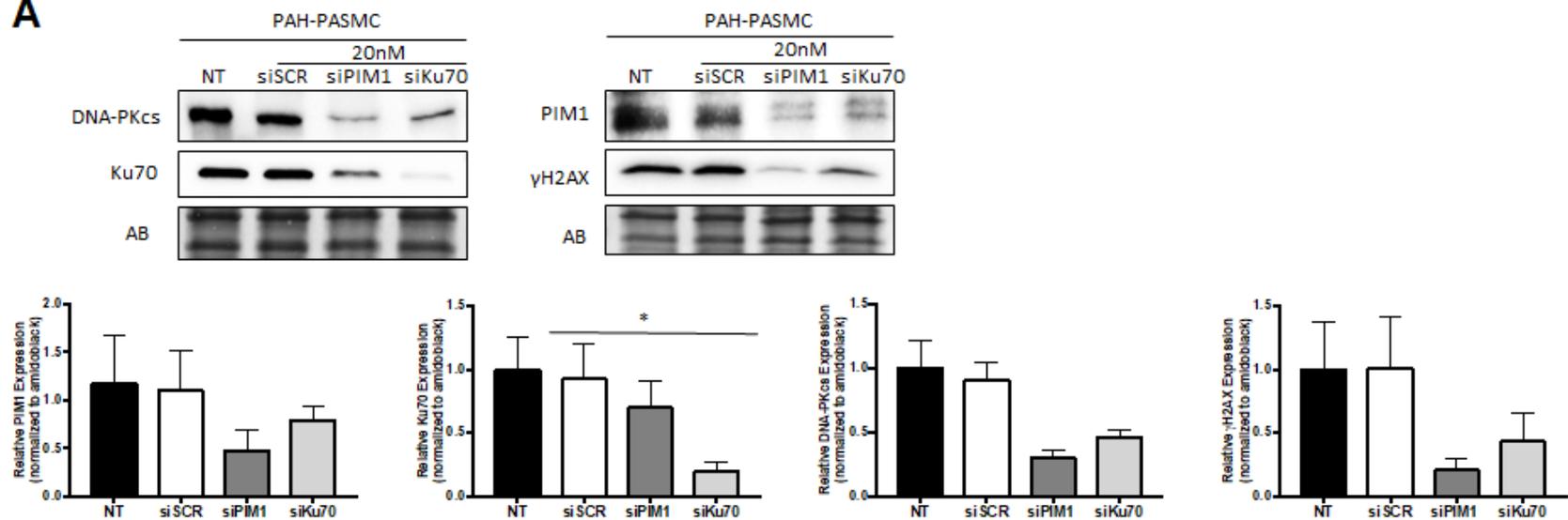


Supplemental Figure 1

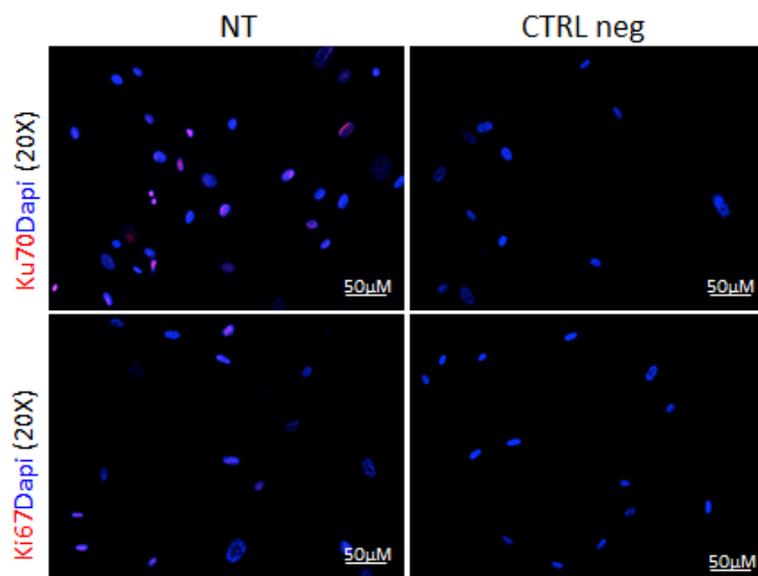


Supplemental Figure 2

A

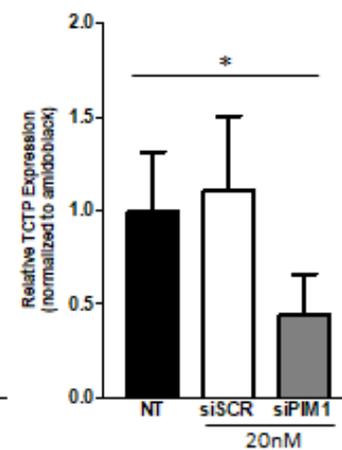
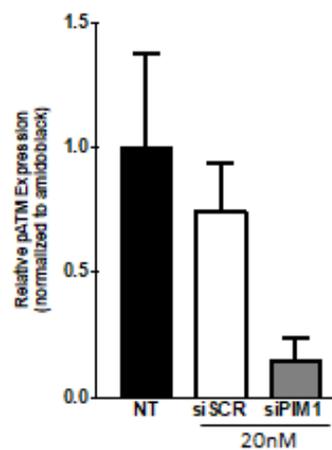
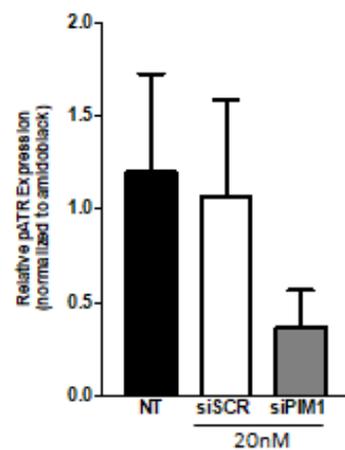
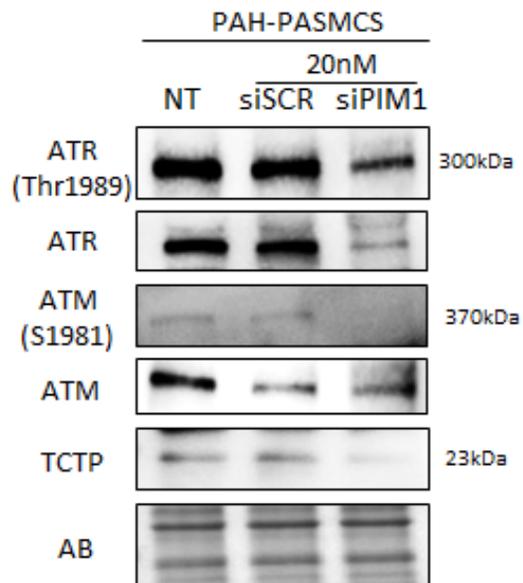


B



Supplemental Figure 3

A



Supplemental Figure 4

A

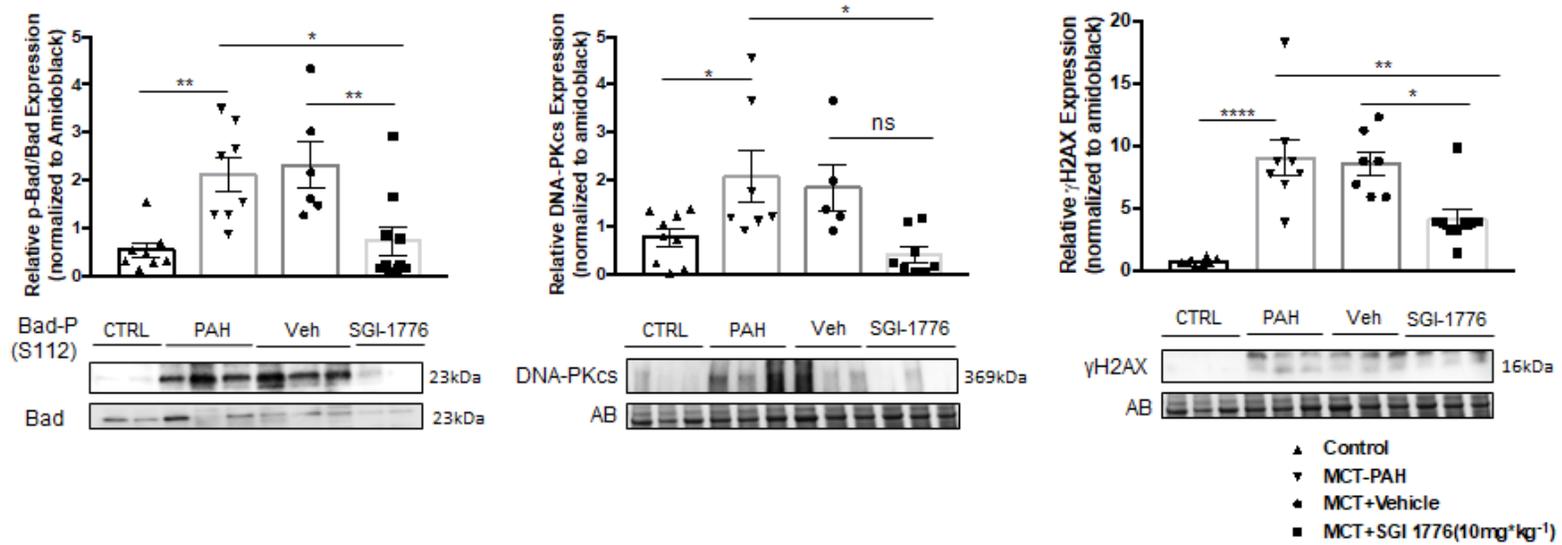


FIGURE LEGENDS

Figure 1: Pim1 is increased in PAH and its expression is stimulated by DNA damage

A. Pim1 expression and **B.** phosphorylation of the histone variant H2AX (γ H2AX) were assessed by immunoblot in lung and PASCs from control (n=4) and PAH patients (n=5). **C.** DNA damage index (DDI) was calculated using a comet assay in control and PAH-PASCs (n=3 per group). The length of the comet tail was used to determine the DNA damage grade as described in the table. **D.** Control-PASCs were stimulated with increased doses of Etoposide (1 to 1000 μ M) and STAT3/Pim1 axis activation was assessed by Western Blot. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05, **P<0.01.

Figure 2: Pim1 inhibition by SGI-1776 decreases DNA damage repair

A. Pim1 expression, Bad Ser(112) phosphorylation and expression and γ H2AX were studied by western Blot in Control, PAH-PASCs as well as in PAH-PASCs treated with vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5 μ M) for 48h (n=4). Representative pictures are presented on the left, quantification is presented on the right panel. Protein expression was normalized by Amido black. **B.** DDI was calculated by comet assay in Control, PAH-PASCs as well as in PAH-PASCs treated with vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5 μ M) for 48h, *P<0.05.

Figure 3: Ku70 and DNA-PKcs are activated in PAH and inhibited by SGI-1776 treatments against Pim1

A. Ku70 expression, DNA-PKcs Ser(2056) phosphorylation and expression were studied by western Blot in Control (n=4) and PAH-PASCs (n=5). Representative pictures are presented on the top, quantification is presented on the bottom panel. **B.** Ku70 nuclear localization was visualized by immunofluorescence by the colocalization of Ku70 stained in red with nucleus stained in blue by DAPI. **C.** Ku70 expression, DNA-PKcs Ser(2056) phosphorylation and expression were studied by western Blot in Control, PAH-PASCs as well as in PAH-PASCs treated with

vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5 μ M) for 48h (n=3). Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

Figure 4: Pim1 inhibition by siRNA decreases NHEJ signaling.

A. Expressions of Pim1, Ku70, DNA-PKcs Ser(2056) phosphorylation and total DNA-PKcs were assessed by immunoblot after treatments with a siPim1 or siSCRM (20nM for 48 hours). Representative pictures are presented on the left, quantification is presented on the left panel. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05, **P<0.01.

Figure 5: ATR, ATM and TCP are activated in PAH and inhibited by SGI-1776 treatments against Pim1.

A. Phospho Thr(1989) ATR, total ATR, Phospho Ser(1981) ATM, total ATM and TCTP expressions were studied by western Blot in Control (n=4) and PAH-PASMCs (n=5) as well as in **B.** PAH-PASMCs treated with vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5 μ M) for 48h. Representative pictures are presented on the top, quantification is presented on the bottom panel. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05, ***P<0.001.

Figure 6: Pim1 inhibition by SGI-1776 decreases PAH-PASMCs proliferation and induces apoptosis.

Proliferation (10% serum, Ki67) and Apoptosis (0.1% serum, Annexin V) were measured after vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 μ M for 48h) treatments in Control and PAH-PASMCs. Representative immunofluorescence images of proliferating Ki67-positive cells (red), apoptotic Annexin V-positive (green) cells stained for DAPI (blue). n= 3 cell lines. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.001.

Figure 7: SGI-1776 reduces pulmonary pressures and improves RV function in animal models of PAH.

A. Mean pulmonary artery pressure (mPAP), Right ventricular systolic pressure (RVSP), and Fulton index were measured in control (n=14), monocrotaline (MCT,

n=16), vehicle treated monocrotaline (n=11) and SGI-1776 (10mg.kg⁻¹) treated monocrotaline rats. **B.** Vascular remodeling as assessed by the degree of arterial wall thickness was quantified using Hematoxylin and Eosin (H&E) stain. Scale bar = 50µm; n= 6 to 8 rats/group (mean of 15 arteries/rat). **C.** Proliferation (Ki67) and apoptosis (TUNEL) were studied in lungs of control, MCT, vehicle and SGI-1776 treated rats. Representative images of distal PAs labeled with Ki67 (top left) and TUNEL (bottom left) in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using alpha smooth muscle actin staining (green). The percentage of Ki67- or TUNEL-positive nuclei (DAPI in blue) in distal PAs was measured (right panel). Scale bar = 50µm; n= 6 to 8 rats/group (mean of 25 arteries/rat). *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.001.

Supplemental Figure 1: Single and double strand breaks are increased in PAH.

Single and double strand breaks measured using alkaline comet assay in **A.** Control (n=4) and PAH-PASMCs (n=5) as well as in **B.** PAH-PASMCs treated with vehicle (DMSO) or SGI-1776 (1, 3 and 5µM) for 48h.

Supplemental Figure 2: Ku70 is not the only DNA repair Pim1 target in PAH.

A. Expressions of Pim1, Ku70, Phospho Ser(2056) DNA-PKcs, total DNA-PKcs and γH2AX were assessed by immunoblot after treatments with a siPim1, siKu70 or siSCRM (20nM for 48 hours). Representative pictures (top) and quantifications (bottom) are presented. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05. **B.** Negative controls for Ki67 and Ku70 staining are displayed.

Supplemental Figure 3: Pim1 inhibition by siRNA decreases AT and ATR activation in PAH.

Phospho Thr(1989) ATR, total ATR, Phospho Ser(1981) ATM, total ATM and TCTP expressions were studied by western Blot in PAH-PASMC treated with siPim1 or siSCRM (20nM for 48 hours, n=3). Representative pictures (left) and quantifications (right) are presented. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05.

Supplemental Figure 4: SGI-1776 decreased DNA-PKcs activation and γ H2AX in vivo in the monocrotaline rat model of PAH.

Phospho Ser(112)Bad, Bad, DNA-PKcs and γ H2AX expressions were assessed by Western Blot in control (n=9), monocrotaline (MCT, n=7), vehicle treated monocrotaline (n=5) and SGI-1776 (10mg.kg⁻¹) treated monocrotaline rats (n=7). Representative pictures (bottom) and quantifications (top) are presented. Protein expression was normalized by Amido black. *P<0.05, **P<0.01 and ****P<0.001.

DISCUSSION ET CONCLUSION

DISCUSSION

Les inhibiteurs de facteurs de croissance et de leurs récepteurs sont très prisés pour les thérapies ciblées dans plusieurs types de cancer. Plus récemment encore, les familles de sérine/thréonine kinases font sensation dans le monde de la recherche¹²⁹. Plusieurs petites molécules inhibitrices sont en cours de développement et certaines entrent même en phase clinique. C'est le cas, entre autres, des kinases mTOR (mammalian target of rapamycin) et Aurora où leurs inhibitions affectent la croissance cellulaire nuisant ainsi au profil sur-prolifératif des cellules cancéreuses¹³⁰⁻¹³³. PIM1, une isoforme de la famille des PIM à l'activité sérine/thréonine kinase, est également une cible potentielle pour le traitement contre le cancer puisque PIM1 est une enzyme impliquée dans la croissance, la différenciation et la survie cellulaire en plus de jouer sur la résistance à l'apoptose et la sénescence des cellules^{80,134}. Plusieurs types de cancers montrent une élévation de l'expression de PIM1 et l'effet de son inhibition *in vitro* et *in vivo* affecte grandement la capacité proliférative et anti-apoptotique des cellules tumorales. Diverses études montrent également que PIM1 favorise la résistance aux médicaments contre le cancer grâce à sa phosphorylation et son interaction, par exemple, avec BCRP (breast cancer resistant protein)¹³⁵ et FLT3 (fms-like tyrosine kinase 3)^{136,137}. L'activité kinase de PIM1 sur différentes protéines et également son implication dans diverses voies de signalisation cellulaire font de cette protéine une importante cible anti-tumorale¹³⁸.

Tout comme dans le cancer, les travaux du Dr Roxane Paulin ont permis de démontrer que PIM1 joue un rôle important dans la pathogénèse de l'HTAP et que sa concentration corrèle avec la sévérité de la maladie^{79,82}. Le facteur de transcription STAT3, activé par l'environnement pro-inflammatoire, promeut l'expression de PIM1 dans les CMLAP-HTAP. Cette onco-protéine contribue à leur phénotype hyper-prolifératif et anti-apoptotique, en partie par son activation du facteur de transcription NFAT et son activité kinase sur Bad. La surexpression de PIM1 est ainsi impliquée dans le remodelage vasculaire et son inhibition enclenche le processus de mort cellulaire des CMLAP malades. Étant peu exprimé dans les

cellules saines, PIM1 est décrit comme une cible de choix en HTAP et son investigation mérite d'être plus approfondie. L'étude présentée dans ce mémoire a permis de conclure qu'un inhibiteur pharmacologique de PIM1, utilisé en cancer et établi sur le marché, possédait un potentiel thérapeutique en HTAP. De plus, la découverte de l'implication de PIM1 dans le mécanisme de réparation des dommages à l'ADN par le NHEJ est nouvellement décrite et reliée à l'HTAP.

L'environnement hostile créé par le milieu pseudo-hypoxique et l'inflammation des tissus sont reconnus comme des facteurs majeurs causant des dommages à l'ADN sur les cellules HTAP^{115,116}. Meloche et al.¹¹⁶ ont démontré que les CMLAP-HTAP peuvent quand même proliférer dans ce milieu défavorable grâce à la sur-activation de mécanismes de réparation de l'ADN impliquant notamment PARP-1, ce qui entraîne un équilibre entre l'augmentation des dommages et la réparation nécessaire à la survie des cellules. De plus, cette étude a démontré que l'inhibition de PARP-1, et donc la diminution de la réparation, améliore le remodelage des artères pulmonaires *in vivo*. La balance entre la prolifération et l'apoptose est également rétablie suite au traitement sur cellules. Cela a permis de relier et d'appuyer le manuscrit de ce mémoire où l'inhibition de PIM1 diminue le mécanisme de réparation du NHEJ, contribuant à l'apoptose des cellules HTAP et à l'amélioration des paramètres hémodynamiques d'un modèle préclinique.

Tel que décrit par Hsu et ses collaborateurs¹²⁵, l'inhibition de PIM1 dans les CMLAP-HTAP affecte la réparation des dommages à l'ADN par le mécanisme du NHEJ. Mais contrairement aux résultats retrouvés dans les cellules cancéreuses de la prostate, γ H2AX est diminué suite au traitement par le SGI-1776. Ce résultat apporte matière à réflexion quant au rôle que joue exactement γ H2AX dans cette étude, soit celui d'un marqueur de dommage, soit celui du marqueur de la reconnaissance des dommages à l'ADN. Pour déterminer sa fonction, les dommages à l'ADN en eux-mêmes ont été quantifiés et il s'avère qu'ils sont toujours présents, démontrant que γ H2AX joue le rôle de marqueur de reconnaissance des dommages afin que les protéines de réparation puissent se lier aux lésions et entamer le processus de réparation. La diminution de ce marqueur montre l'incapacité des protéines de

réparation d'effectuer leurs fonctions par la non-reconnaissance des dommages sur l'ADN.

L'inhibition de PIM1, par le SGI-1776, affecte son activité kinase par compétition d'ATP et il est démontré dans ce mémoire qu'il n'y a pas seulement l'inhibition de la protéine Bad qui est impliquée dans l'apoptose des cellules HTAP, puisqu'en effet plusieurs autres protéines nécessaires à l'activation du NHEJ sont diminuées. Bien que l'on ne puisse certifier par quelle molécule PIM1 agit et sur lequel des résidus, chaque protéine de la famille des PIKK montre une diminution dose-dépendante face au traitement. Ces protéines ont besoin d'être phosphorylées sur leur sérine ou leur thréonine afin de s'activer et de pouvoir phosphoryler à leur tour, suggérant que l'activation de PIM1 est nécessaire dans les cascades de phosphorylation qui ont lieu avec l'activation du NHEJ. Même la protéine Ku70 sous sa forme totale est également diminuée et significativement réduite au niveau nucléaire avec l'inhibition de PIM1, confirmant une diminution dans la reconnaissance des cassures doubles brins. Un article démontre que la phosphorylation de Ku70 sur un résidu sérine accélère la réparation des dommages à l'ADN, permettant ainsi aux cellules cancéreuses de continuer à proliférer, sans se soucier que la lésion soit correctement réparée¹³⁹. Cela pourrait également être vrai pour les CMLAP-HTAP, venant du fait que Ku70 est suractivée dans ces cellules et que l'inhibition de l'activité kinase de PIM1 affecte sa forme totale et sa localisation nucléaire. Des manipulations plus approfondies ainsi que l'élaboration d'un anticorps reconnaissant la forme phosphorylée de Ku70 seront nécessaires afin de conclure davantage quant au mécanisme exact par lequel PIM1 régule Ku70.

Le fait que les dommages à l'ADN ne soient pas augmentés de façon dose-dépendante suite au traitement par le SGI-1776 laisse à penser qu'un autre mécanisme compense l'inhibition du NHEJ et intervient dans les mécanismes de réparation des CDB. Néanmoins, comme PIM1 intervient aussi sur la phosphorylation de Bad, l'inhibition de PIM1 reste suffisante pour enclencher la mort cellulaire. Il est aussi possible que les CDB déjà présentes en très grand nombre, soient suffisantes pour déclencher l'apoptose. Comme mentionné précédemment,

une lésion double brin est fatale pour la cellule, alors même si la cellule HTAP ne présente pas une augmentation des dommages à l'ADN, les dommages déjà existants n'étant pas en mesure d'être réparés, vont signer ainsi l'arrêt du cycle cellulaire. Une étude plus approfondie permettrait de déterminer l'impact de l'inhibition seule des protéines de réparation par PIM1, par exemple en traitant au SGI-1776 des cellules où la phosphorylation de Bad est maintenue.

L'essor des inhibiteurs de PIM est toujours en progrès et permet l'élaboration de molécules encore plus spécifiques et raffinées, présentant également moins de dommages collatéraux suite au traitement. Le SGI-1776 est le premier inhibiteur de PIM1 de sa génération qui a montré assez d'effets bénéfiques pour entrer en phase clinique. L'effet du traitement montre une grande efficacité *in vitro* et *in vivo*, cependant l'étude clinique a dû être interrompue suite aux effets cardio-toxiques rapportés chez les patients de l'étude. Depuis, plusieurs autres inhibiteurs ont vu le jour, tel le TP-3654 (aussi appelé le SGI-9481) qui présente la même capacité d'inhibition de PIM1 mais qui a moins d'effet sur hERG (the Human Ether-a-go-go-related Gene), un canal potassium-voltage-dépendant jouant un rôle crucial dans la repolarisation du potentiel d'action cardiaque¹⁴⁰. Les données *in vivo* de cet inhibiteur laissent à croire en la possibilité d'une nouvelle étude clinique. Les scientifiques ne se découragent pas d'approfondir et d'améliorer leurs produits puisque PIM1 semble sincèrement être une cible potentielle pour un traitement contre le cancer et pour les patients HTAP.

L'étude de ce mémoire démontre la spécificité du SGI-1776 par l'utilisation d'un ARN interférence dirigé contre PIM1. L'obtention des mêmes résultats qu'avec l'inhibiteur pharmacologique, soit la diminution des protéines nécessaires dans le mécanisme du NHEJ, suggère que les résultats observés sont bien dû à l'inhibition de PIM1 et non à un effet hors-cible de SGI-1776. La diminution de la prolifération et la restauration de la mort cellulaire en utilisant l'ARN interférence ont déjà été démontrés dans le papier du Dr Roxane Paulin⁷⁹.

Il a également été démontré dans l'étude de Paulin et *al.*⁷⁹ que le modèle préclinique HTAP (MCT) présentait une augmentation de l'expression du facteur de transcription

STAT3 et de PIM1 à mesure de l'établissement de la maladie. La nébulisation de l'ARN interférence de PIM1 dans les poumons de rats-MCT a permis d'améliorer le remodelage vasculaire menant à une diminution significative des paramètres hémodynamiques, d'où l'intérêt de choisir ce même modèle animal pour le traitement au SGI-1776. Suite à la médication par gavage, l'inhibition de PIM1 dans les poumons a engendré une diminution de l'expression du marqueur de dommage à l'ADN, γ H2AX. Afin de s'assurer de l'efficacité du SGI-1776, l'expression de la protéine phospho-Bad a été mesurée et le traitement est associé à une inhibition de la phosphorylation de cette protéine anti-apoptotique

L'intérêt de la focalisation sur différents acteurs jouant un rôle dans la pathogénèse de l'HTAP et démontrer l'aptitude d'un nouvel inhibiteur permet de migrer tranquillement vers la médecine personnalisée puisque chaque patient est différent. PIM1 est décrit comme un potentiel biomarqueur en HTAP, alors un simple prélèvement sanguin des patients HTAP permettra de déterminer s'ils sont répondeurs ou non aux inhibiteurs de PIM1, selon sa concentration dans le sang. De plus, la combinaison thérapeutique est décrite comme étant plus efficace pour les patients atteints d'HTAP ³⁸, alors il serait très intéressant de combiner l'inhibition de PIM1 à un autre traitement. La bithérapie entre l'inhibiteur pharmacologique de PIM1 et l'inhibiteur de PARP-1 pourrait permettre une double inhibition des facteurs de réparation, créant davantage de dommages à l'ADN non réparés et menant à la mort des cellules malades. Simplement, l'inhibition de PIM1 pourrait être un ajout bénéfique chez un patient HTAP présentant la surexpression de PIM1, en combinaison à sa médication vasodilatatrice actuelle.

CONCLUSION

En conclusion, l'étude a permis de démontrer l'importance et l'avantage de cibler PIM1 en utilisant un inhibiteur pharmacologique spécifique déjà sur le marché. Comme l'HTAP est une maladie rare, le développement de nouveaux médicaments est un processus long et laborieux. Alors l'utilisation d'un médicament déjà en phase clinique et approuvé éthiquement permet d'accélérer son accès pour les patients

atteints d'HTAP. L'inhibition de PIM1 diminue le taux de prolifération et la résistance à l'apoptose des CMLAP-HTAP, sans pour autant affecter les cellules saines. De plus, les paramètres hémodynamiques d'un modèle préclinique sont améliorés suite au traitement prouvant ainsi son potentiel thérapeutique. Ces résultats consolident les travaux du Dr Paulin démontrant un grand pouvoir translationnel. En outre, la découverte de l'implication de PIM1 dans la réparation du dommage à l'ADN et la diminution du mécanisme du NHEJ suite à son inhibition fortifie l'étude liée à PARP-1 impliquée également dans la réponse aux dommages à l'ADN.

RÉFÉRENCES

1. Lampron, M.-C., Samson, N., Tremblay, È., Meloche, J. & Paulin, R. Abstract 16978: Pim1: A New Dna Repair Modulator Implicated in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **136**, A16978–A16978 (2017).
2. Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, D34-41 (2013).
3. Hoeper, M. M. Definition, classification, and epidemiology of pulmonary arterial hypertension. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **30**, 369–375 (2009).
4. Galiè, N. *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* **30**, 2493–2537 (2009).
5. Ryan, J. J. *et al.* Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. *Can. J. Cardiol.* **31**, 391–406 (2015).
6. Rubin, L. J. Primary Pulmonary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **336**, 111–117 (1997).
7. Ling, Y. *et al.* Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 790–796 (2012).

8. Humbert, M. *et al.* Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* **122**, 156–163 (2010).
9. Humbert, M. *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **173**, 1023–1030 (2006).
10. Peacock, A. J., Murphy, N. F., McMurray, J. J. V., Caballero, L. & Stewart, S. An epidemiological study of pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **30**, 104–109 (2007).
11. Humbert, M. *et al.* Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **36**, 549–555 (2010).
12. Rich, S. *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann. Intern. Med.* **107**, 216–223 (1987).
13. Bonow, R. O., Mann, D. L., Zipes, D. P. & Libby, P. *Braunwald's Heart Disease E-Book: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. (Elsevier Health Sciences, 2011).
14. Rich, J. D. & Rich, S. Clinical Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *Circulation* **130**, 1820–1830 (2014).
15. Bossone, E. *et al.* Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *J. Am. Soc. Echocardiogr. Off. Publ. Am. Soc. Echocardiogr.* **26**, 1–14 (2013).
16. Galiè, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for

- European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* **37**, 67–119 (2016).
17. Lai, Y.-C., Potoka, K. C., Champion, H. C., Mora, A. L. & Gladwin, M. T. Pulmonary arterial hypertension: the clinical syndrome. *Circ. Res.* **115**, 115–130 (2014).
18. Barst, R. J. *et al.* Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **43**, 40S–47S (2004).
19. Humbert, M., Sitbon, O. & Simonneau, G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **351**, 1425–1436 (2004).
20. Sitbon, O. *et al.* Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **12**, 265–270 (1998).
21. Rich, S., Kaufmann, E. & Levy, P. S. The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **327**, 76–81 (1992).
22. Sitbon, O. *et al.* Long-Term Response to Calcium Channel Blockers in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **111**, 3105–3111 (2005).
23. Rubens, C. *et al.* Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension. *Chest* **120**, 1562–1569 (2001).
24. Fagan, K. A., McMurtry, I. F. & Rodman, D. M. Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir. Res.* **2**, 90–101 (2001).
25. Benigni, A. & Remuzzi, G. Endothelin antagonists. *Lancet Lond. Engl.* **353**, 133–138 (1999).

26. Schneider, M. P., Boesen, E. I. & Pollock, D. M. Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 731–759 (2007).
27. Barst, R. J. *et al.* Updated evidence-based treatment algorithm in pulmonary arterial hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, S78-84 (2009).
28. Pulido, T. *et al.* Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 809–818 (2013).
29. Galiè, N. *et al.* Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ambrisentan in pulmonary arterial hypertension, randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter, efficacy (ARIES) study 1 and 2. *Circulation* **117**, 3010–3019 (2008).
30. Mehta, S. Sildenafil for pulmonary arterial hypertension: exciting, but protection required. *Chest* **123**, 989–992 (2003).
31. Giaid, A. & Saleh, D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N. Engl. J. Med.* **333**, 214–221 (1995).
32. Corbin, J. D., Beasley, A., Blount, M. A. & Francis, S. H. High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**, 930–938 (2005).
33. Wharton, J. *et al.* Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 105–113 (2005).
34. Galiè, N. *et al.* Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **119**, 2894–2903 (2009).

35. Jones, D. A., Benjamin, C. W. & Linseman, D. A. Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol. Pharmacol.* **48**, 890–896 (1995).
36. Galiè, N., Manes, A. & Branzi, A. Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Med. Drugs Devices Interv.* **2**, 123–137 (2003).
37. Sitbon, O. *et al.* Selexipag for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2522–2533 (2015).
38. Lajoie, A. C. *et al.* Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* **4**, 291–305 (2016).
39. Keogh, A. M. *et al.* Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **54**, S67-77 (2009).
40. Toyoda, Y. *et al.* Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann. Thorac. Surg.* **86**, 1116–1122 (2008).
41. de Perrot, M. *et al.* Outcome of patients with pulmonary arterial hypertension referred for lung transplantation: a 14-year single-center experience. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **143**, 910–918 (2012).
42. Ranchoux, B. *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* **131**, 1006–1018 (2015).
43. Budhiraja, R., Tuder, R. M. & Hassoun, P. M. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* **109**, 159–165 (2004).
44. Rabinovitch, M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am. J. Physiol.* **277**, L5-12 (1999).

45. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu. Rev. Physiol.* **75**, 23–47 (2013).
46. Stenmark, K. R. *et al.* The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Compr. Physiol.* **1**, 141–161 (2011).
47. Smith, R. S., Smith, T. J., Blieden, T. M. & Phipps, R. P. Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am. J. Pathol.* **151**, 317–322 (1997).
48. Humbert, M. *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1628–1631 (1995).
49. Soon, E. *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **122**, 920–927 (2010).
50. Nagashima, T. *et al.* BMPR2 is required for postimplantation uterine function and pregnancy maintenance. *J. Clin. Invest.* **123**, 2539–2550 (2013).
51. Hirose, S., Hosoda, Y., Furuya, S., Otsuki, T. & Ikeda, E. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension. *Pathol. Int.* **50**, 472–479 (2000).
52. Montani, D., Humbert, M. & Souza, R. Letter by Montani *et al* regarding article, ‘Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension’. *Circulation* **123**, e614; author reply e615 (2011).

53. Cracowski, J.-L. & Leuchte, H. H. The potential of biomarkers in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Cardiol.* **110**, 32S–38S (2012).
54. Paulin, R., Meloche, J. & Bonnet, S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAK-STAT* **1**, 223–233 (2012).
55. Steiner, M. K. *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **104**, 236–244, 28p following 244 (2009).
56. Savale, L. *et al.* Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir. Res.* **10**, 6 (2009).
57. Miyata, M. *et al.* Pulmonary hypertension in rats. 2. Role of interleukin-6. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**, 287–291 (1995).
58. Golembeski, S. M., West, J., Tada, Y. & Fagan, K. A. Interleukin-6 causes mild pulmonary hypertension and augments hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Chest* **128**, 572S–573S (2005).
59. Jais, X. *et al.* Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: a retrospective analysis of twenty-three cases. *Arthritis Rheum.* **58**, 521–531 (2008).
60. Sanchez, O., Sitbon, O., Jaïs, X., Simonneau, G. & Humbert, M. Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* **130**, 182–189 (2006).
61. Crosswhite, P. & Sun, Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol. Med. Camb. Mass* **20**, 191–201 (2014).
62. Sun, H. & Baserga, R. The role of insulin receptor substrate-1 in transformation by v-src. *J. Cell. Physiol.* **215**, 725–732 (2008).

63. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. & Jove, R. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**, 2474–2488 (2000).
64. Pensa, S., Regis, G., Boselli, D., Novelli, F. & Poli, V. *STAT1 and STAT3 in Tumorigenesis: Two Sides of the Same Coin?* (Landes Bioscience, 2013).
65. Yun, X., Jiang, H., Lai, N., Wang, J. & Shimoda, L. A. Aquaporin 1-mediated changes in pulmonary arterial smooth muscle cell migration and proliferation involve β -catenin. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **313**, L889–L898 (2017).
66. Paulin, R. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **301**, H1798-1809 (2011).
67. Bonnet, S. *et al.* The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 11418–11423 (2007).
68. Giffin, M. J. *et al.* Structure of NFAT1 bound as a dimer to the HIV-1 LTR kappa B element. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 800–806 (2003).
69. Jin, L. *et al.* An asymmetric NFAT1 dimer on a pseudo-palindromic kappa B-like DNA site. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 807–811 (2003).
70. Rao, A. Signaling to gene expression: calcium, calcineurin and NFAT. *Nat. Immunol.* **10**, 3–5 (2009).
71. Diehl, S. *et al.* Induction of NFATc2 expression by interleukin 6 promotes T helper type 2 differentiation. *J. Exp. Med.* **196**, 39–49 (2002).
72. Villalonga, N. *et al.* Cell cycle-dependent expression of Kv1.5 is involved in myoblast proliferation. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 728–736 (2008).

73. Brown, J. M. & Attardi, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat. Rev. Cancer* **5**, 231 (2005).
74. Vaillancourt, M., Ruffenach, G., Meloche, J. & Bonnet, S. Adaptation and remodelling of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension. *Can. J. Cardiol.* **31**, 407–415 (2015).
75. Burg, E. D., Remillard, C. V. & Yuan, J. X.-J. Potassium channels in the regulation of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and apoptosis: pharmacotherapeutic implications. *Br. J. Pharmacol.* **153 Suppl 1**, S99–S111 (2008).
76. Yang, C. *et al.* The roles of bcl-2 gene family in the pulmonary artery remodeling of hypoxia pulmonary hypertension in rats. *Chin. Med. Sci. J. Chung-Kuo Hsueh Ko Hsueh Tsa Chih* **16**, 182–184 (2001).
77. Shimizu, S., Narita, M. & Tsujimoto, Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* **399**, 483–487 (1999).
78. Catlett-Falcone, R. *et al.* Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**, 105–115 (1999).
79. Paulin, R. *et al.* Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **123**, 1205–1215 (2011).
80. Nawijn, M. C., Alendar, A. & Berns, A. For better or for worse: the role of Pim oncogenes in tumorigenesis. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 23–34 (2011).

81. Wang, J. *et al.* Pim1 kinase synergizes with c-MYC to induce advanced prostate carcinoma. *Oncogene* **29**, 2477–2487 (2010).
82. Renard, S. *et al.* Pim-1: A new biomarker in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **3**, 74–81 (2013).
83. Nogueira-Ferreira, R., Vitorino, R., Ferreira, R. & Henriques-Coelho, T. Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **35**, 8–16 (2015).
84. Gomez-Arroyo, J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L363-369 (2012).
85. Naeije, R. & Dewachter, L. [Animal models of pulmonary arterial hypertension]. *Rev. Mal. Respir.* **24**, 481–496 (2007).
86. Colvin, K. L. & Yeager, M. E. Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *J. Pulm. Respir. Med.* **4**, (2014).
87. Lord, C. J. & Ashworth, A. The DNA damage response and cancer therapy. *Nature* **481**, 287–294 (2012).
88. Smith, J., Tho, L. M., Xu, N. & Gillespie, D. A. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. *Adv. Cancer Res.* **108**, 73–112 (2010).
89. Cahill, D., Connor, B. & Carney, J. P. Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **11**, 1958–1976 (2006).
90. Helleday, T., Lo, J., van Gent, D. C. & Engelward, B. P. DNA double-strand break repair: from mechanistic understanding to cancer treatment. *DNA Repair* **6**, 923–935 (2007).

91. Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **40**, 179–204 (2010).
92. Kirkman, L. A. & Deitsch, K. W. Antigenic variation and the generation of diversity in malaria parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**, 456–462 (2012).
93. Lieber, M. R. The mechanism of human nonhomologous DNA end joining. *J. Biol. Chem.* **283**, 1–5 (2008).
94. Ma, Y. *et al.* A biochemically defined system for mammalian nonhomologous DNA end joining. *Mol. Cell* **16**, 701–713 (2004).
95. Rotman, G. & Shiloh, Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene* **18**, 6135–6144 (1999).
96. Savitsky, K. *et al.* A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science* **268**, 1749–1753 (1995).
97. Zhang, J. *et al.* Role of the translationally controlled tumor protein in DNA damage sensing and repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, E926-933 (2012).
98. Maréchal, A. & Zou, L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**, (2013).
99. Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S. & Bonner, W. M. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**, 5858–5868 (1998).
100. O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A. & Goodship, J. A. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat. Genet.* **33**, 497–501 (2003).

101. Falck, J., Coates, J. & Jackson, S. P. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature* **434**, 605–611 (2005).
102. Paull, T. T. *et al.* A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol. CB* **10**, 886–895 (2000).
103. Kobayashi, J., Antoccia, A., Tauchi, H., Matsuura, S. & Komatsu, K. NBS1 and its functional role in the DNA damage response. *DNA Repair* **3**, 855–861 (2004).
104. Stucki, M. & Jackson, S. P. gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair* **5**, 534–543 (2006).
105. Ward, I. M., Minn, K., Jorda, K. G. & Chen, J. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.* **278**, 19579–19582 (2003).
106. Celeste, A. *et al.* Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**, 922–927 (2002).
107. Celeste, A. *et al.* H2AX haploinsufficiency modifies genomic stability and tumor susceptibility. *Cell* **114**, 371–383 (2003).
108. Petersen, S. *et al.* AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature* **414**, 660–665 (2001).
109. Bassing, C. H. *et al.* Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 8173–8178 (2002).
110. Reina-San-Martin, B. *et al.* H2AX is required for recombination between immunoglobulin switch regions but not for intra-switch region recombination or somatic hypermutation. *J. Exp. Med.* **197**, 1767–1778 (2003).

111. Xie, A. *et al.* Control of sister chromatid recombination by histone H2AX. *Mol. Cell* **16**, 1017–1025 (2004).
112. Kao, J. *et al.* gamma-H2AX as a therapeutic target for improving the efficacy of radiation therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* **6**, 197–205 (2006).
113. Podhorecka, M., Skladanowski, A. & Bozko, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *J. Nucleic Acids* **2010**, (2010).
114. Giglia-Mari, G., Zotter, A. & Vermeulen, W. DNA damage response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, a000745 (2011).
115. Federici, C. *et al.* Increased Mutagen Sensitivity and DNA Damage in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 219–228 (2015).
116. Meloche, J. *et al.* Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **129**, 786–797 (2014).
117. Warnecke-Eberz, U. *et al.* Prognostic impact of protein overexpression of the proto-oncogene PIM-1 in gastric cancer. *Anticancer Res.* **29**, 4451–4455 (2009).
118. Reiser-Erkan, C. *et al.* Hypoxia-inducible proto-oncogene Pim-1 is a prognostic marker in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **7**, 1352–1359 (2008).
119. Xu, Y. *et al.* Overexpression of PIM-1 is a potential biomarker in prostate carcinoma. *J. Surg. Oncol.* **92**, 326–330 (2005).
120. Brault, L. *et al.* PIM serine/threonine kinases in the pathogenesis and therapy of hematologic malignancies and solid cancers. *Haematologica* **95**, 1004–1015 (2010).

121. Holder, S. *et al.* Characterization of a potent and selective small-molecule inhibitor of the PIM1 kinase. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 163–172 (2007).
122. Fedorov, O. *et al.* A systematic interaction map of validated kinase inhibitors with Ser/Thr kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20523–20528 (2007).
123. Zemsanova, 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.* **283**, 20635–20644 (2008).
124. Lin, Y.-W. *et al.* A small molecule inhibitor of Pim protein kinases blocks the growth of precursor T-cell lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Blood* **115**, 824–833 (2010).
125. Hsu, J.-L. *et al.* Pim-1 knockdown potentiates paclitaxel-induced apoptosis in human hormone-refractory prostate cancers through inhibition of NHEJ DNA repair. *Cancer Lett.* **319**, 214–222 (2012).
126. Lodish, H. *et al.* DNA Damage and Repair and Their Role in Carcinogenesis. (2000).
127. de Jesus Perez, V. A. *et al.* Whole-exome sequencing reveals TopBP1 as a novel gene in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 1260–1272 (2014).
128. Merkel, A. L., Meggers, E. & Ocker, M. PIM1 kinase as a target for cancer therapy. *Expert Opin. Investig. Drugs* **21**, 425–436 (2012).
129. Steeghs, N., Nortier, J. W. R. & Gelderblom, H. Small molecule tyrosine kinase inhibitors in the treatment of solid tumors: an update of recent developments. *Ann. Surg. Oncol.* **14**, 942–953 (2007).

130. Mabuchi, S., Hisamatsu, T. & Kimura, T. Targeting mTOR signaling pathway in ovarian cancer. *Curr. Med. Chem.* **18**, 2960–2968 (2011).
131. Sparks, C. A. & Guertin, D. A. Targeting mTOR: prospects for mTOR complex 2 inhibitors in cancer therapy. *Oncogene* **29**, 3733–3744 (2010).
132. Katayama, H. & Sen, S. Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules. *Biochim. Biophys. Acta* **1799**, 829–839 (2010).
133. Dar, A. A., Goff, L. W., Majid, S., Berlin, J. & El-Rifai, W. Aurora kinase inhibitors—rising stars in cancer therapeutics? *Mol. Cancer Ther.* **9**, 268–278 (2010).
134. Shah, N. *et al.* Potential roles for the PIM1 kinase in human cancer - a molecular and therapeutic appraisal. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **44**, 2144–2151 (2008).
135. Xie, Y. *et al.* The 44-kDa Pim-1 kinase phosphorylates BCRP/ABCG2 and thereby promotes its multimerization and drug-resistant activity in human prostate cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 3349–3356 (2008).
136. Natarajan, K. *et al.* The Pim kinase inhibitor SGI-1776 decreases cell surface expression of P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) and drug transport by Pim-1-dependent and -independent mechanisms. *Biochem. Pharmacol.* **85**, 514–524 (2013).
137. Kim, K.-T. *et al.* Pim-1 is up-regulated by constitutively activated FLT3 and plays a role in FLT3-mediated cell survival. *Blood* **105**, 1759–1767 (2005).
138. Tursynbay, Y. *et al.* Pim-1 kinase as cancer drug target: An update. *Biomed. Rep.* **4**, 140–146 (2016).

139. Bouley, J. *et al.* A new phosphorylated form of Ku70 identified in resistant leukemic cells confers fast but unfaithful DNA repair in cancer cell lines. *Oncotarget* **6**, 27980–28000 (2015).
140. Foulks, J. M. *et al.* A small-molecule inhibitor of PIM kinases as a potential treatment for urothelial carcinomas. *Neoplasia N. Y. N* **16**, 403–412 (2014).