



# **Implication d'EZH2 en hypertension artérielle pulmonaire**

**Thèse**

**Karima Habbout**

**Doctorat en médecine moléculaire**  
Philosophiæ doctor (Ph. D.)

Québec, Canada



## Implication d'EZH2 en hypertension artérielle pulmonaire

### **Thèse de doctorat en Médecine Moléculaire**

Karima HABBOUT

Université Laval

Directeur de thèse : Olivier BOUCHERAT

Co-directeur de thèse : Sébastien BONNET

Groupe Hypertension Artérielle Pulmonaire CRIUCPQ

2725 Chemin Ste Foy, G1V4G5 Québec

## Résumé

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP), caractérisée par une pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP) supérieure à 20mmHg au repos, est une pathologie progressive et létale. L'augmentation progressive de la pression artérielle pulmonaire est la résultante d'une vasoconstriction soutenue associée à un profond remodelage des artères pulmonaires distales. Le remodelage vasculaire est dû principalement à une prolifération anormalement élevée et une résistance importante à l'apoptose des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CMLAPs). Le remodelage vasculaire et la vasoconstriction engendre une obstruction progressive des artères pulmonaires favorisant une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Cette augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires se répercute sur le ventricule droit (VD) forçant celui-ci à s'hypertrophier pour compenser et maintenir ses fonctions. Néanmoins, à mesure que la maladie progresse, l'obstruction artérielle s'accroît, rendant la compensation cardiaque droite plus difficile ce qui mènera ultimement au décès des patients par défaillance cardiaque droite.

À ce jour les outils thérapeutiques utilisés ciblent uniquement le tonus vasculaire en favorisant la vasodilatation. Cependant, cette stratégie thérapeutique n'améliore que de façon médiocre le taux de survie des patients ce qui rend urgent le besoin de développer de nouvelles stratégies ciblant l'obstruction artérielle pulmonaire.

Le remodelage, étant la conséquence d'une prolifération et d'une survie cellulaire importante, met en exergue une certaine similitude avec le cancer. En effet, certaines voies cellulaires dérégulées dans le cancer, comme ici la prolifération ou la survie cellulaire, se retrouvent également dérégulées en hypertension artérielle pulmonaire. La littérature scientifique démontre de plus en plus l'implication de modifications épigénétiques dans le développement de cancer, notamment par la transcription de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques. Les dernières années de recherche ont démontré que des facteurs épigénétiques pouvaient être responsables du développement et de la progression de l'HTAP. En ce sens, nous nous sommes intéressés au facteur épigénétique EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) fortement impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire dans de nombreux cancers, faisant de lui une cible préférentielle des thérapies anticancéreuses. Étant donné le phénotype

pro-prolifératif et résistant des CMLAPs-HTAP, EZH2 constitue une cible à étudier dans le remodelage vasculaire.

De plus, la littérature rapporte un effet cardioprotecteur d'EZH2 face à l'hypertrophie et la fibrose dans le tissu cardiaque. Bien que l'HTAP soit une pathologie vasculaire avant tout, les patients décèdent d'une défaillance cardiaque droite. Le ventricule droit n'étant plus apte à s'adapter, accumule de la fibrose rendant la contraction laborieuse ce qui mène à la défaillance cardiaque droite. À la vue de son rôle de protecteur cardiaque décrit dans la littérature, nous avons également étudié sa potentielle implication dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque HTAP.

Dans un premier volet de l'étude, nous avons démontré qu'EZH2 est surexprimé dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires de patients HTAP et de modèles expérimentaux. *In vitro*, l'inhibition d'EZH2 diminue la prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses HTAP comparativement aux cellules contrôles. Par une approche multiomique, nous avons démontré que l'inhibition d'EZH2 diminue l'expression de nombreux facteurs impliqués dans la progression du cycle cellulaire, y compris les cibles E2F, ainsi que des protéines impliquées dans la fonction mitochondriale. De plus, nous avons également démontré que l'inhibition d'EZH2 altère la bioénergétique des CMLAPs-HTAP.

Dans le second volet de notre étude, nous avons démontré qu'EZH2 se retrouve surexprimé dans les ventricules droits compensés des patients et des modèles expérimentaux. Nous avons démontré qu'une inhibition de l'expression d'EZH2, *in vitro*, favorise l'hypertrophie cellulaire. D'un point de vue mécanisme cellulaire, EZH2 est régulé par l'ARN long non codant H19, plus précisément son micro-ARN : miR-675. Nous avons démontré que cette régulation passe par l'intermédiaire du facteur de transcription E2F1 qui est régulé par miR-675 va réguler à son tour l'expression d'EZH2.

L'inhibition d'H19 *in vivo* induit la surexpression d'E2F1 et d'EZH2 et démontre un effet thérapeutique cardioprotecteur bénéfique dans deux modèles expérimentaux de défaillance cardiaque droite.

Pour conclure, les deux volets de notre étude nous permettent de mettre en évidence une implication d'EZH2 dans le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des CMLAPs-HTAP et également un rôle protecteur de la fonction ventriculaire droite. Ainsi, cela ouvre de nouvelles possibilités de découvertes thérapeutiques.

## **Abstract**

Pulmonary arterial hypertension (PAH), characterized by a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) greater than 20mmHg at rest, is a progressive and fatal condition. The progressive increase in pulmonary artery pressure is the result of sustained vasoconstriction associated with a deep remodeling of the distal pulmonary arteries. Vascular remodeling is mainly due to abnormal proliferation and increased survival of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). Vascular remodeling and vasoconstriction cause progressive obstruction of the pulmonary arteries, promoting an increase in pulmonary vascular resistance. This progressive increase in pulmonary vascular resistance affects the right ventricle (RV) forcing it to compensate by hypertrophy to maintain its functions. However, as the disease progresses, the arterial obstruction worsens, making right cardiac compensation more difficult, which will ultimately lead to the death of patients from right heart failure.

To date, the therapeutic tools used only target vascular tone by promoting vasodilation. However, this therapeutic strategy poorly improves patient survival rates, which makes the need to develop new strategies targeting pulmonary artery obstruction urgent.

The remodeling being the consequence of a high proliferation and an important cell survival highlights some similarities with cancer. Indeed, some deregulated cell pathways in cancer, such as cell proliferation or survival, are also deregulated in pulmonary arterial hypertension. The scientific literature increasingly demonstrates the involvement of epigenetic modifications in the development of cancer, through the transcription of pro-proliferative and anti-apoptotic genes. The last years of research have shown that epigenetic factors could be responsible for the development and progression of the PAH. In this sense, we were interested in the epigenetic factor EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) strongly involved in cell proliferation and survival in many cancers, making it a preferential target for anticancer therapies. Given the hyper-proliferative and resistant phenotype of PAH-PASMCs, EZH2 constitutes a target to be studied in vascular remodeling.

In addition, the literature reports a cardioprotective effect of EZH2 against hypertrophy and fibrosis in heart tissue. Although PAH is primarily a vascular disease, patients die of right heart failure. As the right ventricle is no longer able to adapt, fibrosis accumulates making

ventricular contractility difficult which leads to right heart failure. In view of its role as a cardiac protector described in the literature, we investigated its potential involvement in cardiac hypertrophy and fibrosis in PAH.

In a first part of our study, we demonstrated that EZH2 is overexpressed in PAH-PASMCs from patients and in experimental models. *In vitro*, EZH2 inhibition decreases the proliferation and resistance to apoptosis of PAH-PASMCs compared to control cells. A multi-omic approach has made it possible to highlight multiple targets of EZH2, like targets of the transcription factor E2F1, involved in the regulation of the cell cycle, as well as proteins involved in mitochondrial function. In addition, we have also shown that inhibition of EZH2 alters PAH-PASMCs bioenergetics.

In a second part of our study, we demonstrated that EZH2 is overexpressed in compensated right ventricles in PAH patients and in experimental models. We have shown that inhibition of EZH2 expression *in vitro* promotes cell hypertrophy. From a cellular mechanism point of view, EZH2 is regulated by the long non-coding RNA H19, more precisely its microRNA: miR-675. We have demonstrated that this regulation is mediated by the transcription factor E2F1 which, regulated by miR-675, will in turn regulate the expression of EZH2.

Inhibition of H19 *in vivo* induces E2F1 and EZH2 overexpression and demonstrates a beneficial cardioprotective therapeutic effect in two experimental models of right heart failure.

In conclusion, the two parts of our study allow us to demonstrate an involvement of EZH2 in the pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype of PAH-PASMCs and a protective role of right ventricular function. Thus, these results open new possibilities for therapeutic discoveries.

# Table des matières

Résumé .....	ii
Abstract .....	v
Table des matières .....	vii
Liste des figures .....	x
Liste des abréviations .....	xi
Remerciements .....	xv
Avant-propos .....	xvii
Introduction .....	1
1. Le système pulmonaire et le système cardio-vasculaire.....	1
1.1 Le système pulmonaire .....	1
1.2 Le système cardio-vasculaire .....	3
2. L'hypertension pulmonaire .....	12
2.1 Introduction.....	12
2.2 Groupe 1 : Hypertension artérielle pulmonaire.....	14
2.3 Groupe 2 : L'hypertension pulmonaire due à une maladie cardiaque gauche .....	17
2.4 Groupe 3 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une maladie pulmonaire chronique ou hypoxique .....	18
2.5 Groupe 4 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une thromboembolique chronique .....	18
2.6 Groupe 5 : L'hypertension pulmonaire dont les mécanismes sont incertains .....	19
3. HTAP, l'hypertension pulmonaire de groupe 1 .....	19
3.1 Épidémiologie .....	19
3.2 Symptômes cliniques et diagnostic .....	20
3.3 Physiopathologie poumon - cœur.....	25
3.4 Altérations moléculaires et cellulaires.....	40
3.5 Les modèles animaux de l'HTAP .....	75
3.6 Thérapies actuelles de l'HTAP .....	80
3.7 HTAP, analogie avec le cancer .....	90
4. EZH2: Enhancer of Zeste Homologue 2.....	91
4.1 Fonction biologique d'EZH2 .....	92
4.2 EZH2 dans le cancer.....	97
4.3 EZH2 dans le développement et la physiologie cardiaque .....	99
4.4 EZH2 et son implication dans d'autres pathologies .....	100

Objectifs et hypothèses de recherche .....	102
Méthodologie générale.....	103
Tissus et cellules humaines.....	103
Les modèles animaux et la mesure des paramètres hémodynamiques.....	103
Chapitre I: Implication of EZH2 in the pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells in PAH: a transcriptomic and proteomic approach .....	106
Résumé .....	107
Abstract.....	108
Introduction.....	109
Results .....	111
EZH2 Levels in Human PAH and Experimental Models .....	111
Effects of EZH2 Loss- and Gain-of-Function Approaches on PASMC Proliferation and Resistance to Apoptosis.....	111
Impact of Molecular Inhibition of EZH2 on the PAH-PASMC Transcriptome.....	112
Analysis of siEZH2-Associated Proteome Changes by Quantitative Proteomics .....	118
Discussion.....	122
Materials and Methods .....	125
Human Lung Samples and Animal Models.....	125
Cell Culture and Treatments.....	125
Real-Time Quantitative PCR.....	127
RNA Sequencing.....	127
Proteomics .....	128
Bioinformatic Analysis.....	130
Western Blotting and Immunoprecipitation .....	130
Immunofluorescence Studies.....	131
In Vitro Metabolism (Seahorse XF24) Assays.....	132
Statistical Analysis .....	132
References.....	133
Supplemental Data .....	136
Chapitre II : L'ARN long non codant H19, <i>via</i> miR-675, régule EZH2 par l'intermédiaire d'E2F1.....	146
Avant-propos.....	146
Résumé .....	147
Abstract.....	148

Introduction.....	149
Méthodes.....	150
Tissus humains.....	150
Modèles animaux .....	151
Traitement au GapmeR.....	153
Culture cellulaire et traitement.....	153
Mesure de la surface cellulaire <i>in vitro</i> .....	155
RT-qPCR .....	155
Immunobuvardage (Western blot) .....	156
Analyse statistique .....	157
Résultats.....	158
H19 est surexprimé dans le ventricule droit décompensé et corrèle avec la fibrose et l'hypertrophie chez les patients HTAP .....	158
H19 est surexprimé dans le ventricule droit décompensé des modèles expérimentaux .....	160
L'inhibition d'H19 protège le cœur droit et en améliore les fonctions.....	164
<i>In vitro</i> , l'inhibition H19 empêche l'hypertrophie PE dépendante <i>via</i> la surexpression d'EZH2.....	169
H19 <i>via</i> miR675 régule EZH2 par l'intermédiaire d'E2F1 .....	174
H19 favorise l'activation des fibroblastes cardiaques.....	176
Discussion et perspectives .....	178
Références :.....	181
Conclusion.....	184
Compréhension de la physiopathologie .....	184
Avenue thérapeutique potentielle.....	186
Références : .....	188
Annexes.....	232
Annexe I.....	232
Annexe II. ....	284
Annexe III. ....	290
Annexe IV.....	355
Annexe V.....	385
Annexe VI.....	391
Annexe VII.....	404

## Liste des figures

Figure 1. Les poumons humains.....	1
Figure 2. Anatomie cardiaque. ....	4
Figure 3. La structure de la paroi cardiaque.....	6
Figure 4. Structure histologique de la paroi des vaisseaux. ....	11
Figure 5. Classification des différents groupes d'hypertension pulmonaire.....	13
Figure 6. Groupe 1 de la classification : Hypertension artérielle pulmonaire.....	14
Figure 7. Cathétérisme cardiaque droit et tracé représentatif.....	24
Figure 8. Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire.....	30
Figure 9. Progression de l'HTAP et les effets sur le ventricule droit.....	31
Figure 10. Evolution du ventricule droit à la suite de l'établissement de l'HTAP.....	32
Figure 11. Coupes transversales de cœurs de patients HTAP.....	34
Figure 12. Changements cellulaires dans le ventricule droit.....	40
Figure 13. Implication de STAT3 en hypertension artérielle pulmonaire. ....	46
Figure 14. Les microARN et l'HTAP. ....	60
Figure 15. Les différents mécanismes épigénétiques. ....	62
Figure 16. Implication de BRD4 dans l'hypertension artérielle pulmonaire.....	64
Figure 17. L'effet Warburg. ....	66
Figure 18. Rôle de PARP-1 en HTAP. ....	74
Figure 19. Les différentes thérapies ciblées en HTAP.....	82
Figure 20. Nombre de transplantations pulmonaires mondiales. ....	85
Figure 21. HTAP et cancer.....	91
Figure 22. Le complexe PRC2. ....	93
Figure 23. Fonction répressive et activatrice d'EZH2.....	94
Figure 24. Cathétérisme cardiaque droit. ....	105

## Liste des abréviations

ANP	Atrial natriuretic peptide
APD	Artère pulmonaire distale
ARNlnc	ARN long non codant
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BET	Bromodomain and extra-terminal motif
BMPR2	Bone morphogenetic protein receptor type II
BNP	Peptide natriurétique de type B
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cGMP	Guanosine monophosphate cyclique
CI	Cardiac index
CM	Cellule musculaire
CMLAP	Cellule musculaire lisse des artères pulmonaires
CO	Cardiac output
Col1 $\alpha$ 1	Collagène de type I, alpha 1
Col3 $\alpha$ 1	Collagène de type III, alpha 1
cRV	compensated right ventricle
DNMT	ADN méthyltransférases
dRV	decompensated right ventricle
E2F1	E2F transcription factor 1
ET-1	Endothéline 1
ET <sub>A</sub>	Récepteur A de l'endothéline
ET <sub>B</sub>	Récepteur B de l'endothéline
EZH2	Enhancer of Zeste Homologue 2
FC	fréquence cardiaque
FHR	Fawn hooded rats
HAT	Histones acétyltransférases
HDAC	Histones désacétylases
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1-alpha
HIV	Virus de l'immunodéficience humaine
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire

IC index cardiaque  
IL-1 Interleukine 1  
IL-6 Interleukine 6  
KLF5 Krüppel-like factor 5  
LV Left ventricle  
MAPK Mitogen-activated protein kinases  
MCT Monocrotaline  
miR microARN  
mPAP Pression artérielle pulmonaire moyenne  
mTOR Mammalian target of rapamycin  
Myh6 Myosin heavy chain 6  
Myh7 Myosin heavy chain 7  
NFAT Nuclear factor of activated T-cells  
NF- $\kappa$ B Nuclear factor-kappa B  
NO Oxyde nitrique  
Nppa Natriuretic Peptide A  
Nppb Natriuretic Peptide B  
NRCM Neonate rat cardiac myocyte  
O<sub>2</sub> Oxygène  
OGG1 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1  
PAB Pulmonary artery banding  
PAEC Cellules endothéliales des artères pulmonaires  
PAH Hypertension artérielle pulmonaire  
PARP-1 Poly (ADP-ribose) polymerase 1  
PASMC Pulmonary artery smooth muscle cell  
PDE5 Phosphodiesterase de type 5  
PDGF Platelet-derived growth factor  
PDGFR Platelet-derived growth factor receptor  
PH Hypertension pulmonaire  
PPAR $\gamma$  Peroxisome proliferator-activated receptor gamma  
PRC2 Polycomb repressor complex 2

ROS Espèces réactives de l'oxygène  
RV Right ventricle  
RVEDP Right ventricle end diastolic pressure  
RVSP Pression systolique du ventricule droit  
Six1 Sineoculis homeobox homolog 1  
SOD2 Superoxide dismutase 2  
STAT3 Signal transducer and activator of transcription  
VD Ventricule droit  
VDc Ventricule droit compensé  
VDd Ventricule droit décompensé  
VEGF Vascular endothelial growth factor  
VEGFR Vascular endothelial growth factor receptor  
VG Ventricule gauche

*« Par ton éternel soutien, cette belle aventure fut possible. »*

***À Tinam***

*« Tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis. Victor Hugo »*

***À mon père***

## Remerciements

Tout d'abord je souhaite remercier mon directeur de thèse, Dr Olivier Boucherat, ainsi que mon co-directeur de thèse, Dr Sébastien Bonnet. Merci de m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce doctorat. Merci de m'avoir encadrée tout au long de ces années et de m'avoir donnée les moyens de réaliser ce projet.

Je souhaite remercier sincèrement les membres du jury.

Merci au Dr Yohan Bossé d'avoir été présent durant tout mon cursus doctoral. D'avoir été présent pour mon pré-doctorat, mon séminaire et d'être présent pour l'évaluation de ma thèse. Merci également au Dr Hadri Lahouaria ainsi qu'au Dr Côté Andréanne d'avoir accepté d'évaluer ma thèse.

Ensuite, j'aimerais remercier les membres de mon équipe qui ont été présent du début à la fin de ce projet. Merci aux professionnels de recherche pour avoir été toujours là quand j'en avais besoin. Merci pour votre patience, votre disponibilité tout au long de ces années. Merci à Sandra B pour m'avoir aidé et conseillé à chaque fois que j'en avais besoin.

Merci aux membres du laboratoire avec qui j'ai eu l'opportunité de collaborer de près ou de loin durant toutes ces années. Merci à toutes les personnes qui ont contribué à l'avancement de mon projet de recherche et qui ont fait qu'il aboutisse. Merci de votre patience et de votre aide. Merci à Géraldine pour ton soutien et ta créativité scénaristique. A special thanks to Dr Junichi Omura for the late evenings we spent working, dancing and laughing in the lab, どうもありがとうございます.

Merci à mon entourage proche d'avoir fait de toutes ces années des années passionnantes.

-Jon, merci de m'entourer comme toi seul peux le faire, merci de m'avoir soutenue, relevée, motivée durant toutes ces années. Sans toi je ne serai pas arrivée là.

-Merci à Bebert de m'avoir toujours soutenue malgré la distance qui nous sépare.

-Nano, Maggie et ma fleur de lys, merci d'avoir toujours su comment rendre mes journées ensoleillées.

Enfin, merci également aux organismes subventionnaires pour leur soutien financier; le Réseau de recherche en Santé Respiratoire du Québec (RSRQ), le Fonds de recherche du Québec – Santé (FRQS) ainsi que l’association d’hypertension pulmonaire (AHTP) du Canada pour la bourse de recherche famille Mohammed.

## Avant-propos

Cette thèse présente mes travaux effectués au cours de mon doctorat en médecine moléculaire. Au cours de mes études, j'ai eu l'opportunité de publier 2 articles, en tant que première auteure et co-premier auteur, qui seront présentés dans les chapitres I et II. Ainsi que 6 articles référencés en annexe, pour lesquels j'ai participé à l'acquisition de données.

### Chapitre I

Publié dans Int. J. Mol. Sci. 2021, 22

#### **Implication of EZH2 in the pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells in PAH: a transcriptomic and proteomic approach.**

**Karima Habbout**, Junichi Omura, Charifa Awada, Alice Bourgeois, Yann Grobs, Vinod Krishna, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Ghada Mkannez, Sandra Martineau, Valérie Nadeau, Florence Roux-Dalvai, Mark Orchowski, Jey Jeyaseelan, David Gutstein, François Potus, Steeve Provencher, Sébastien Bonnet, Roxane Paulin, and Olivier Boucherat.

Pour ce projet, j'ai effectué la majorité de l'acquisition et l'analyse des données. Quelques données *in vitro* ont été réalisées par certains membres de l'équipe. Le Dr. Boucherat a supervisé l'ensemble des travaux et rédigé la version finale du manuscrit.

### Chapitre II

Ce chapitre présentera certains résultats extraits de l'article suivant :

Publié dans Circulation. 2020 Oct 13;142(15):1464-1484.

#### **Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension.**

Junichi Omura, # **Karima Habbout**, # Tsukasa Shimauchi, Wen-Hui Wu, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, Valérie Nadeau, Kassandra Gagnon, Florence Mazoyer, Jean Perron, Francois Potus, Jian-Hui Lin, Hamza Zafar, David G. Kiely, Allan Lawrie, Stephen L. Archer, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Olivier Boucherat, Sébastien Bonnet. #*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente au projet.*

Pour ce projet, j'ai effectué l'acquisition et l'analyse de données *in vitro* en relation avec EZH2. Dr Omura Junichi a contribué à l'acquisition et l'analyse des données *in vivo* en lien avec H19 ainsi qu'à la réalisation des figures et la rédaction du manuscrit. De nombreuses personnes ont contribué à l'avancement du projet, dans la réalisation et l'acquisition de données. Les Dr Bonnet et Boucherat ont supervisé l'ensemble des travaux.

L'article intégral est inséré en annexe I.

Articles en annexe

Annexe I

Publié dans *Circulation*. 2020 Oct 13;142(15):1464-1484.

**Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension.**

Junichi Omura, # **Karima Habbout**, # Tsukasa Shimauchi, Wen-Hui Wu, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, Valérie Nadeau, Kassandra Gagnon, Florence Mazoyer, Jean Perron, Francois Potus, Jian-Hui Lin, Hamza Zafar, David G. Kiely, Allan Lawrie, Stephen L. Archer, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Olivier Boucherat, Sébastien Bonnet. #*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente au projet.*

Annexe II

Publié dans *Eur Respir J*. 2021 Jan 14;2003271.

**(R)-Crizotinib Predisposes to and Exacerbates Pulmonary Arterial Hypertension in Animal Models.**

Charifa Awada, Yann Grobs, Wen-Hui Wu, **Karima Habbout**, Charlotte Romanet, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, Roxane Paulin, Sébastien Bonnet, Steeve Provencher, François Potus and Olivier Boucherat. Potus and O. Boucherat contributed equally to this article as lead authors and supervised the work.

Annexe III

Publié dans *Am J Respir Crit Care Med* 2020.

**Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH.**

Vitry G, Paulin R, Grobs Y, Lampron MC, Shimauchi T, Lemay SE, Tremblay E, **Habbout K**, Awada C, Bourgeois A, Nadeau V, Paradis R, Breuils-Bonnet S, Roux-Dalvai F, Orcholski M, Potus F, Provencher S, Boucherat O, Bonnet S.

Annexe IV

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

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

Alice Bourgeois, Sébastien Bonnet, Sandra Breuils-Bonnet, **Karima Habbout**, Renée Paradis, Eve Tremblay, Marie-Claude Lampron, Mark E Orcholski, Francois Potus, Thomas Bertero, Thibaut Peterlini, Stephen Y Chan, Karen A Norris, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Olivier Boucherat.

Annexe V

Publié dans *Int J Biochem Cell Biol.* 2018 Nov;104:9-13.

**Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets.**

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

Annexe VI

Publié dans *J Mol Med (Berl).* 2018 Feb;96(2):223-235.

**FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension.**

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

Annexe VII

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

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

Diederik E Van der Feen, Kondababu Kurakula, Eve Tremblay, Olivier Boucherat, Guido P L Bossers, Robert Szulcek, Alice Bourgeois, Marie-Claude Lampron, **Karima Habbout**, Sandra Martineau, Roxane Paulin, Ewelina Kulikowski, Ravi Jahagirdar, Ingrid Schalijs, Harm Jan Bogaard, Beatrijs Bartelds, Steeve Provencher, Rolf M F Berger, Sébastien Bonnet 3, Marie-José Goumans.

# Introduction

## 1. Le système pulmonaire et le système cardio-vasculaire

Les poumons et le cœur travaillent de concert afin d'acheminer l'oxygène à tout l'organisme. Ces deux systèmes ont des rôles bien définis dans ce partenariat, nous nous proposons de les présenter ci-après.

### 1.1 Le système pulmonaire

#### 1.1.1 Anatomie des poumons

Les poumons sont contenus dans la cage thoracique et sont essentiels aux échanges gazeux<sup>1</sup>. Il s'agit d'organes pairs enveloppés dans deux feuillets protecteurs constituant la plèvre (figure 1). La plèvre est constituée d'un feuillet viscéral et d'un feuillet pariétal.

Les deux poumons sont séparés l'un de l'autre par le médiastin (contenant le cœur et les grands vaisseaux). À leur base, les poumons sont en rapport avec le diaphragme qui sépare la cage thoracique de l'abdomen.

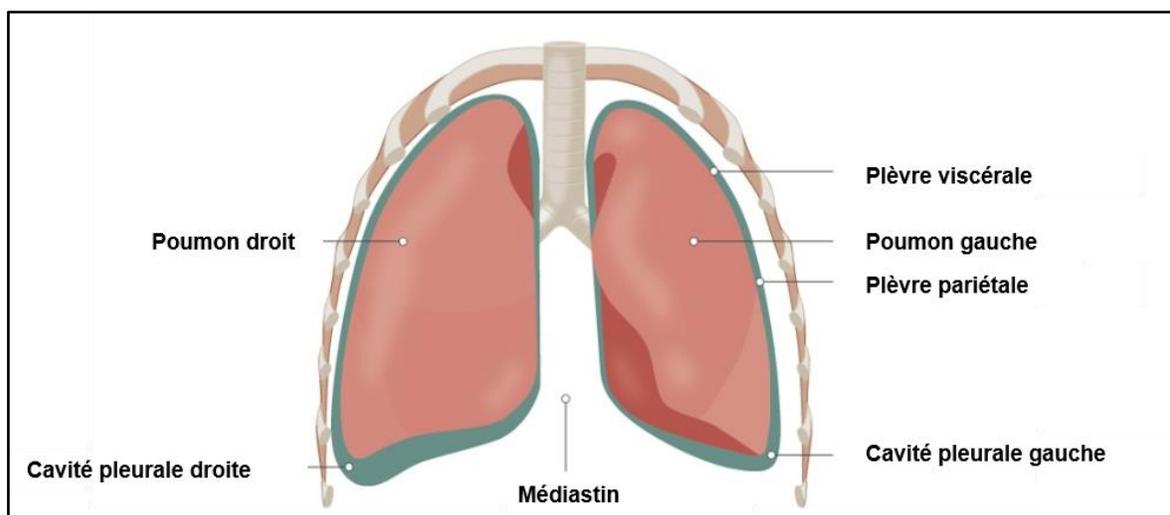


Figure 1. Les poumons humains.

Les poumons droit et gauche sont enveloppés dans les feuillets pleuraux (viscéral et pariétal) et sont séparés par le médiastin. Figure adaptée de la figure initiale<sup>2</sup>.

Le poumon droit compte trois lobes (supérieur, moyen et inférieur) tandis que le poumon gauche n'en compte que deux (supérieur et inférieur). Les lobes sont séparés par des scissures au nombre de deux à droite et une seule à gauche. Chaque lobe pulmonaire est divisé en plusieurs segments selon son orientation (antérieure-postérieure et apical-médial-basal)<sup>2</sup>.

La partie respiratoire proprement dite est constituée des bronches qui se divisent en bronchioles à mesure qu'elles s'insinuent dans le tissu pulmonaire pour finir en alvéoles<sup>3,4</sup>. Les alvéoles sont des structures sous forme de petits polygones aux bords plats<sup>5,6</sup> (souvent représentées sous forme de grappe) au contact des vaisseaux sanguins, permettant l'échange gazeux. La surface totale que représente les alvéoles est d'environ 130m<sup>2</sup> permettant un échange gazeux efficace.

### 1.1.2 Physiologie pulmonaire

Les poumons permettent l'oxygénation du sang qui alimente tout l'organisme. Le sang pauvre en oxygène est acheminé du cœur droit aux poumons par l'artère pulmonaire<sup>7</sup>. Celle-ci se divise en un réseau de capillaires au niveau des alvéoles et permet les échanges gazeux. Une fois le sang réoxygéné, les veines pulmonaires vont apporter le sang au cœur gauche qui redistribuera celui-ci à tous les organes<sup>7</sup>. Ce circuit nommé, circulation pulmonaire ou petite circulation, a été découvert en 1242 par le médecin égyptien Ibn Nafis<sup>8,9</sup>.

#### 1.1.2.a La mécanique ventilatoire

La respiration, mécanisme inconscient et rythmique, est régulée par la composition chimique du sang détectée par des chémorécepteurs et par des centres respiratoires nerveux<sup>10,11</sup>. La fréquence respiratoire est de 14 à 18 mouvements respiratoires par minute.

L'inspiration est la résultante de la contraction des muscles ventilatoires (intercostaux et diaphragme) qui crée un gradient de pression favorisant l'entrée d'air dans les poumons<sup>10</sup>. La pression négative régnant dans le thorax, créée par la contraction des muscles, aide à remplir les poumons. En effet, la pression négative dans le thorax au moment de l'inspiration est plus basse que la pression atmosphérique, l'air est alors attiré dans les poumons afin d'équilibrer les pressions. L'inspiration est active et nécessite la contraction des muscles alors

que l'expiration est passive car elle est due au relâchement des muscles<sup>10</sup>. L'expiration crée une pression positive forçant l'air à quitter les poumons. Cependant, une expiration forcée peut être réalisée en faisant intervenir les muscles intercostaux et abdominaux. En parallèle, les centres respiratoires nerveux et les chémorécepteurs transmettent au cerveau les signaux nécessaires à la modulation de la respiration en fonction de la demande métabolique<sup>10</sup>. Cette coopération permet de maintenir une oxygénation adéquate et une élimination du dioxyde de carbone de façon optimale<sup>12</sup>.

#### 1.1.2.b Les échanges gazeux

Les alvéoles sont les unités respiratoires pulmonaires, celles-ci sont en contact étroit (environ 1 micromètre d'épaisseur) avec le réseau vasculaire amenant le sang pauvre en oxygène aux poumons. Les échanges gazeux entre les alvéoles et les capillaires se font suivant un gradient de pression (de la plus haute à la plus basse). Pour assurer un bon échange gazeux il est primordial que les alvéoles soient à la fois ventilées et perfusées<sup>13</sup>.

La pression partielle du dioxygène dans les alvéoles est d'environ 100mmHg alors que dans les capillaires elle est de 40mmHg, le dioxygène va donc diffuser dans le capillaire<sup>14</sup>. À contrario, la pression partielle du dioxyde de carbone dans les alvéoles est de 40mmHg et de 46mmHg dans les capillaires, le dioxyde de carbone va donc diffuser dans les alvéoles suivant le gradient de pression<sup>14</sup>. À noter que le temps de contact entre les alvéoles et le sang est d'environ 0,75 seconde mais seulement un tiers de ce temps-là est nécessaire pour atteindre l'équilibre des pressions.

## 1.2 Le système cardio-vasculaire

### 1.2.1 Structure cardiaque

#### 1.2.1.a Anatomie interne

Le cœur est un muscle creux, situé dans le centre du thorax en arrière du sternum<sup>15</sup>. Celui-ci est composé de quatre chambres : deux oreillettes et deux ventricules. Il recueille le sang et le propulse ensuite dans les artères<sup>15</sup> (figure 2).

Les oreillettes sont séparées des ventricules par des valves auriculo-ventriculaires ayant pour rôle d'éviter le reflux sanguin. Sous l'effet des contractions cardiaques, le sang ne peut donc circuler que dans un seul sens.

La valve entre l'oreillette droite et le ventricule droit est nommée la valve tricuspide tandis que la valve côté cœur gauche est la valve mitrale<sup>15,16</sup>. Des valves sont aussi présentes à la sortie des ventricules, la valve aortique entre le ventricule gauche et l'aorte ainsi que la valve pulmonaire entre le ventricule droit et l'artère pulmonaire<sup>16</sup>.

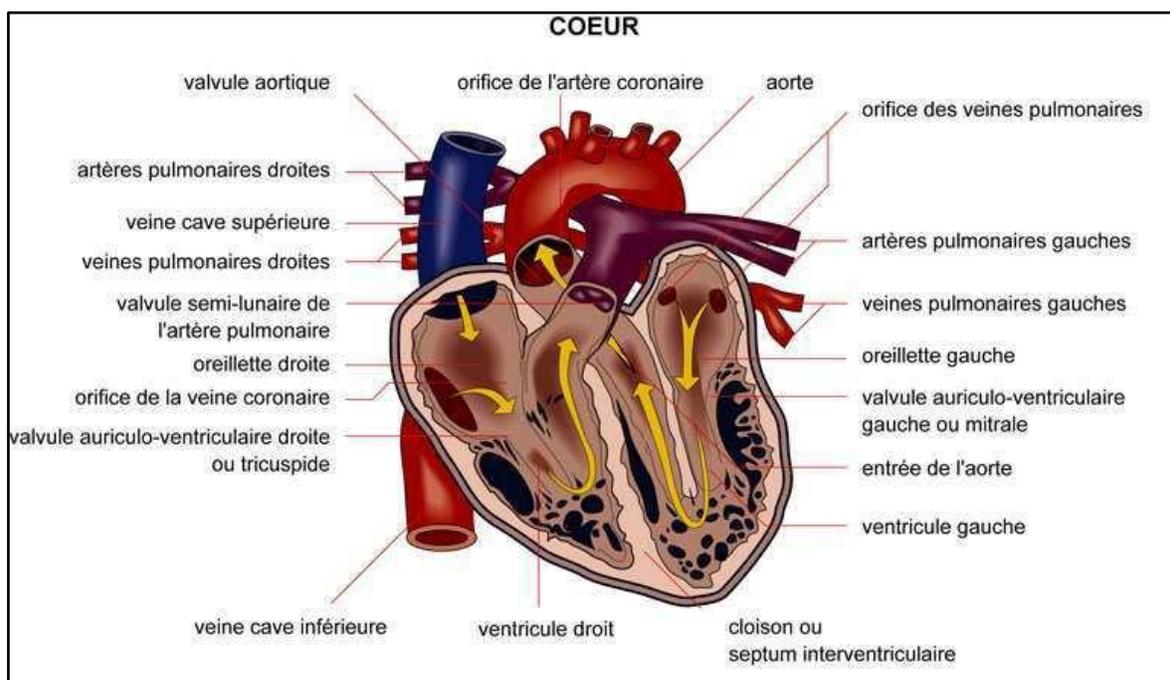


Figure 2. Anatomie cardiaque.

Nous retrouvons les quatre chambres cardiaques ainsi que plusieurs éléments vasculaires tel que l'artère aorte, la veine cave supérieure et inférieure. Image extraite de<sup>17</sup>.

La partie droite du cœur est reliée à la circulation pulmonaire (décrite précédemment) et la partie gauche à la circulation systémique (voir 1.2.2.a La circulation systémique). Les deux parties cardiaques sont séparées par le septum interventriculaire. À noter que la paroi ventriculaire gauche est plus épaisse et plus musclée que celle du ventricule droit. Cette musculature supplémentaire est due au fait que ce ventricule gauche fournit le sang à tous les organes *via* l'aorte et celui-ci est soumis à des contraintes de pressions élevées favorisant son hypertrophie physiologique.

Le cœur est irrigué par les artères coronaires pour l'apport en nutriment et par les veines coronaires pour l'élimination des déchets<sup>15,16,18</sup>. Ce réseau d'artères et de veines court sur la surface du muscle cardiaque<sup>15</sup>.

L'artère coronaire principale gauche permet de fournir 80% du flux sanguin au muscle cardiaque<sup>15</sup> tandis que l'artère coronaire droite fournit principalement le ventricule et l'oreillette droite ainsi que la partie inférieure du ventricule gauche<sup>15,16,18</sup>. Le sang veineux est récupéré par les veines coronaires pour ensuite se jeter dans l'oreillette droite<sup>15,16,18</sup> à des fins de réoxygénation.

#### 1.2.1.b Structure de la paroi cardiaque

Le cœur est composé de trois couches distinctes ayant un rôle précis : le péricarde, le myocarde et l'endocarde<sup>19,20</sup> (figure 3).

Le péricarde, couche la plus externe, représente l'enveloppe qui protège le cœur<sup>19</sup> et le maintient en place dans le thorax. Cette enveloppe est composée de deux feuillets, le péricarde fibreux (ou péricarde épais) et le péricarde séreux<sup>20</sup>. Le péricarde séreux est lui-même composé de deux feuillets : le feuillet viscéral qui enveloppe le cœur (aussi nommé épicarpe), et le feuillet pariétal qui recouvre la face interne du péricarde fibreux<sup>20</sup>. Le péricarde fibreux et séreux forme un espace nommé l'espace péricardique contenant du liquide<sup>20</sup> pour éviter les frottements lors du cycle cardiaque.

Le myocarde est composé de fibres musculaires striées, appelées cardiomyocytes<sup>19</sup>, ainsi que de fibroblastes et permet la contraction cardiaque.

L'endocarde, composé de cellules endothéliales, tapisse la face interne du myocarde<sup>19,20</sup> et est directement au contact du sang.

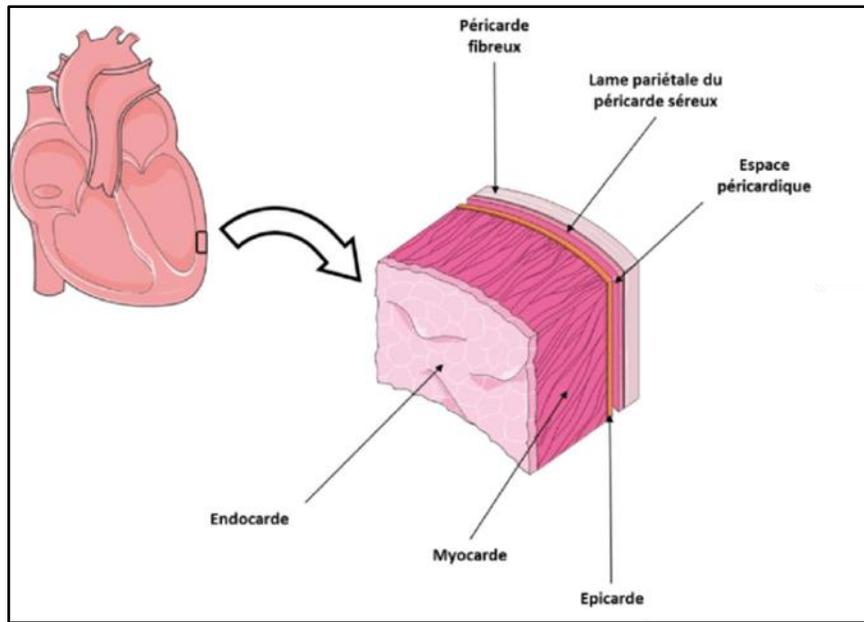


Figure 3. La structure de la paroi cardiaque.

Image tirée de<sup>21</sup> et initialement adaptée des images de la base Servier Medical Art.

### 1.2.2 Physiologie cardiaque

De façon schématique, le cœur comporte deux pompes propulsives à fonctionnement alternatif. La pompe droite assurant la circulation pulmonaire et la pompe gauche assurant la circulation systémique.

#### 1.2.2.a La circulation systémique

À la sortie du ventricule gauche le sang est propulsé dans tout l'organisme par l'artère aorte. L'artère aorte se divise en plusieurs branches et alimente tous les organes en oxygène et en nutriments. Le sang issu de ces organes est pauvre en oxygène et riche en déchets et dioxyde de carbone. Celui-ci est collecté par les veines caves supérieure et inférieure ramenant le sang dans l'oreillette droite puis dans le ventricule droit. Le sang veineux sera finalement propulsé dans l'artère pulmonaire pour être oxygéné par le tissu pulmonaire. Au niveau pulmonaire, le sang passe des artères aux capillaires en contact avec les alvéoles, permettant de réoxygéner le sang. Le sang riche en oxygène revient à l'oreillette gauche par les veines

pulmonaires (au nombre de 4) puis rentre dans le ventricule gauche après contraction de l'oreillette pour ensuite reprendre le même circuit<sup>22</sup>.

#### 1.2.2.b La révolution cardiaque ou cycle cardiaque

Le cœur enchaîne par alternance des phases de contraction et de relaxation. La phase de contraction cardiaque, nommée systole, correspond à la contraction des cardiomyocytes entraînant une diminution du volume des cavités cardiaques favorisant l'éjection du sang. La phase de relaxation, nommée diastole, correspond à la relaxation du myocarde favorisant un remplissage des cavités. Le cœur assure un débit pulsatile et cyclique, d'où le terme de cycle cardiaque. Celui-ci est décomposé en 4 temps <sup>23,24</sup>:

1. *La contraction isovolumétrique* : survient après la contraction de l'oreillette, le sang se retrouve dans le ventricule. L'onde de stimulation myocardique atteint le ventricule, celui-ci se contracte, c'est le début de la systole ventriculaire. Le sang se retrouve comprimé, la pression intra-ventriculaire augmente rapidement et dépasse la pression qui règne dans l'oreillette. Cela induit la fermeture des valves auriculo-ventriculaires empêchant tout reflux dans l'oreillette. Il faut un certain temps pour que la pression dans le ventricule gauche atteigne puis dépasse la pression aortique (ou pulmonaire) entraînant ainsi une ouverture de la valve aortique (ou pulmonaire). Ainsi, durant le début de la systole ventriculaire, le volume de sang emprisonné dans le ventricule par la fermeture de la valve mitrale ne peut pas sortir par l'aorte, il y a contraction sans pour autant que le volume ne change, c'est la contraction isovolumétrique.

2. *La systole ventriculaire* débute lorsque la pression dans le ventricule devient supérieure à celle dans l'aorte (ou dans l'artère pulmonaire) permettant l'ouverture de la valve aortique (ou pulmonaire). Le volume de sang éjecté par le ventricule à chaque contraction, nommé volume d'éjection systolique (VES), ne constitue qu'une fraction du volume contenu dans les ventricules. Le volume résiduel constitue un volume de réserve pour augmenter le volume d'éjection si nécessaire.

3. *La relaxation isovolumétrique* : juste après la fermeture des valves aortique et pulmonaire, le sang ne peut ni sortir, ni entrer dans les ventricules. La pression dans les ventricules diminue très rapidement. Durant quelques centièmes de secondes la pression intraventriculaire reste trop élevée pour que les valves auriculo-ventriculaires puissent s'ouvrir. Cette étape constitue le premier temps de la diastole ventriculaire

4. *Le remplissage ventriculaire*, divisé en 2 phases, rapide et lente. Lorsque la pression intraventriculaire devient inférieure à la pression dans les oreillettes, les valves auriculo-ventriculaires s'ouvrent et le sang est propulsé dans les ventricules.

Lors d'une auscultation cardiaque nous pouvons entendre deux bruits cardiaques bien distincts. Le premier correspond à la fermeture des valves auriculo-ventriculaire. Celui-ci, nommé B1 (bruit 1), est plus sourd que le second, et marque le début de la systole ventriculaire. Le second bruit (B2), est plus court et correspond à la fermeture des valves aortique et pulmonaire. Il marque la fin de la systole ventriculaire et le début de la diastole.

### 1.2.2.c La fonction cardiaque et les paramètres hémodynamiques

#### **Le débit cardiaque**

Le débit cardiaque représente le volume de sang expulsé par unité de temps et est exprimé en L/min. Il est calculé à partir de la fréquence cardiaque (battements par minute) multipliée par le volume de sang éjecté par les ventricules au cours d'une systole (volume d'éjection systolique)<sup>25-27</sup>.

$$\begin{array}{rcl} Q & = & \text{Fréquence Cardiaque} \quad \times \quad \text{Volume éjection systolique} \\ \text{L / min} & & \text{battements / min} \quad \quad \quad \text{L / battement} \end{array}$$

L'être humain à un débit cardiaque moyen de 5 L/min au repos. Le débit cardiaque peut être influencé par l'exercice physique, la contractilité cardiaque ou encore la capacité de remplissage et d'éjection des ventricules<sup>27</sup>.

### **La précharge et la postcharge**

La précharge correspond au degré d'étirement du muscle cardiaque au moment où le sang rentre dans les ventricules, alors que la postcharge correspond à la force qui s'oppose à l'écoulement du sang lors de son éjection des ventricules<sup>26,27</sup>. Le débit cardiaque va varier en fonction de ces deux paramètres. En effet, si la postcharge augmente (par exemple dans des cas d'hypertension artérielle) et la précharge diminue (par exemple lors d'une importante déshydratation) le débit cardiaque tendra à diminuer<sup>26,27</sup>.

### 1.2.3 Le système vasculaire

Les vaisseaux sont des tubes flexibles permettant la circulation du sang à travers tout l'organisme en circuit fermé. Ceux-ci permettent l'approvisionnement en oxygène et nutriments aux organes et le rapatriement des déchets et du sang désoxygéné aux poumons.

#### 1.2.3.a Les artères et les capillaires

Les artères conduisent le sang oxygéné du cœur aux différents organes<sup>28-30</sup> exceptés les artères pulmonaires qui conduisent le sang pauvre en oxygène aux poumons. Le sang est ensuite remis aux organes par les capillaires.

D'un point de vue structurale les artères sont composées de 3 couches<sup>28-30</sup> (figure 4) :

- L'intima, couche au contact direct du sang, composée de cellules endothéliales entourée d'une fine couche élastique nommée limitante élastique interne. Cet endothélium, d'une épaisseur comprise entre 0,1 à 1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, joue un rôle dans l'inhibition de la formation de thrombus *via* la présence d'une couche d'une glycoprotéine, le glycocalyx.
- La media, constituée principalement de cellules musculaires lisses arrangées de façon circulaire autour du vaisseau ainsi que de fibres de collagène. La media est entourée d'une limitante élastique externe. Les cellules musculaires lisses permettent de modifier le diamètre de l'artère en fonction de la demande physiologique.

- L'adventice (ou tunique externe) est constituée de fibres de collagène et d'élastine permettant d'ancrer le vaisseau aux tissus environnants.

L'intérieur d'une artère est nommé lumen ou lumière artérielle.

D'un point de vue fonctionnelle, les artères distribuent le sang oxygéné du cœur aux organes ainsi que le sang désoxygéné du cœur droit aux poumons. Celles-ci du fait de leur structure sont aptes à supporter une forte pression sanguine en leur bord.

Les artères dont le diamètre dépassent 1mm sont irriguées par des vaisseaux nommés *vasa vasorum*, ceux-ci ont pour rôle d'apporter les nutriments et l'oxygène aux grosses artères<sup>31</sup>.

Les capillaires sont les plus petits vaisseaux de l'organisme et facilitent les échanges (gazeux et nutritifs) entre les tissus et le sang<sup>32</sup>. Elles sont composées d'une seule couche de cellules endothéliales. Dans le système circulatoire, les capillaires vont merger en veinules puis en veines afin de ramener le sang pauvre en oxygène au cœur droit<sup>28</sup>.

#### 1.2.3.b Les veines

Après avoir traversé les organes, le sang est récolté dans des veinules pour ensuite rejoindre des veines et être ramené au cœur droit.

La composition des veines ressemble à celle des artères (figure 4) mais avec très peu de cellules musculaires lisses ce qui les rend inaptées à la constriction. Néanmoins celles-ci peuvent se dilater de façon importante permettant ainsi d'être un réservoir de sang. En effet, il est à noter qu'environ 70% du volume sanguin est contenu dans le système veineux.

L'intima composée de cellules endothéliales se retrouve au contact du sang. La media, plus fine que dans les artères, est composée de cellules musculaires lisses avec peu de fibres élastiques. L'adventice est plus épaisse dans les veines afin d'éviter à la veine de collapser et assure un rôle de protection car celle-ci se trouve plus en superficie.

Les veines des membres inférieures sont munies de valves permettant de prévenir le retour sanguin vers le bas par gravité<sup>29</sup>. De plus, le retour veineux est uniquement réalisé par les veines car les battements cardiaques n'interviennent pas dans ce processus.

Pour les veines aussi de gros diamètre, les vasa vasorum sont responsables de leurs apports en nutriments et oxygène.

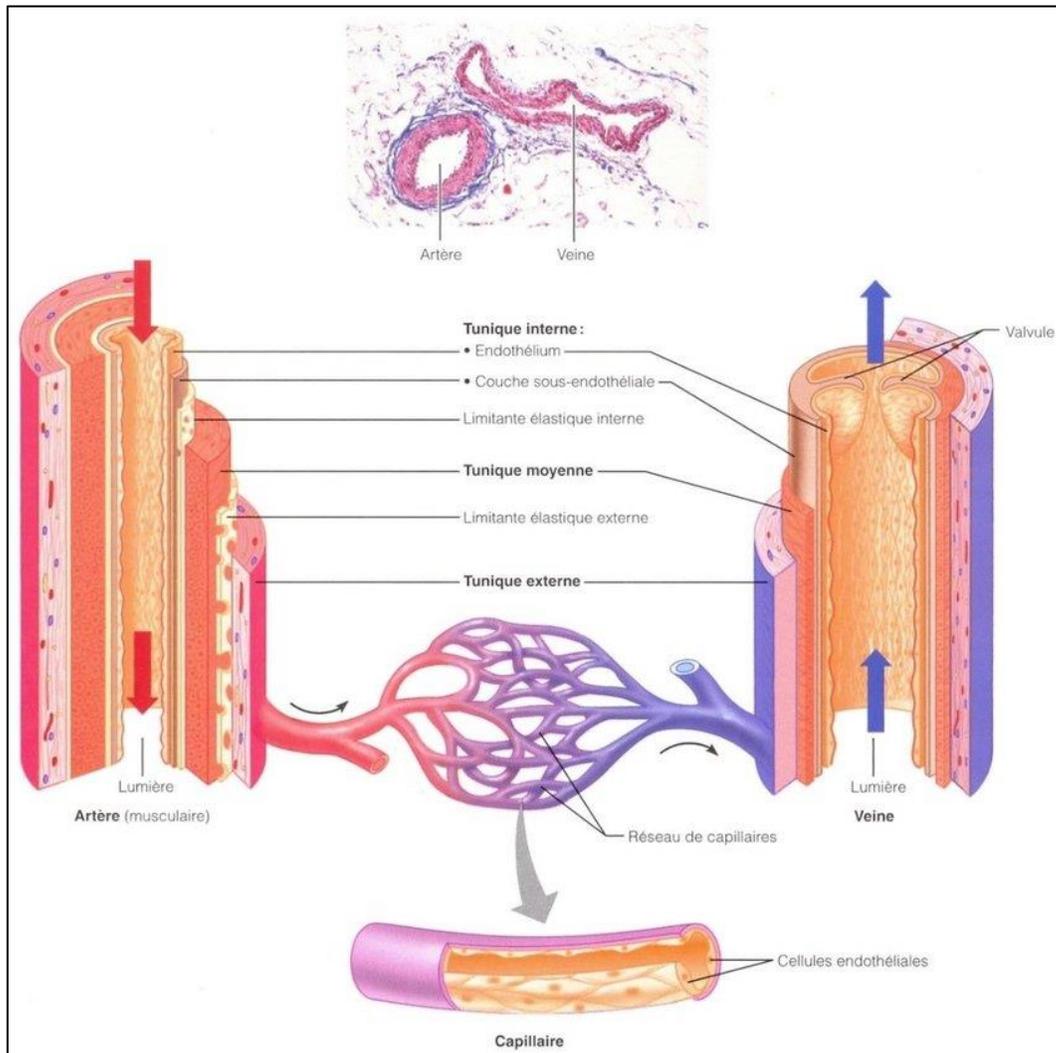


Figure 4. Structure histologique de la paroi des vaisseaux.

Schéma de la structure histologique des artères et veines ainsi que des capillaires<sup>33</sup>.

## 2. L'hypertension pulmonaire

### 2.1 Introduction

L'hypertension pulmonaire (HP) est un terme général englobant plusieurs groupes de pathologies progressives ayant en commun une augmentation de la pression dans la circulation pulmonaire. À Genève en 1973, durant le premier symposium mondial sur l'hypertension pulmonaire, celle-ci a été définie comme une pathologie présentant une pression pulmonaire moyenne  $\geq 25$  mmHg et fut catégorisée en 2 groupes :

- 1) l'hypertension pulmonaire primaire, dont la cause était connue
- 2) l'hypertension pulmonaire secondaire, dont la cause n'avait pas été identifiée<sup>34</sup>.

Cependant, avec l'avancement des recherches et des découvertes la classification a subi des changements et c'est ainsi que la classification la plus récente compte 5 groupes d'hypertension pulmonaire. Cette classification permet de regrouper les HP en fonction de leurs caractéristiques hémodynamiques, physiopathologiques ou encore en fonction de leur prise en charge<sup>35</sup> (figure 5).

Cette classification comprend donc les cinq groupes suivants que nous nous proposons de décrire :

Groupe 1 : L'hypertension artérielle pulmonaire

Groupe 1' : Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire

Groupe 1'' : Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

Groupe 2 : L'hypertension pulmonaire due à une maladie cardiaque gauche

Groupe 3 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une maladie pulmonaire chronique ou hypoxique

Groupe 4 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une thromboembolique chronique

Groupe 5 : L'hypertension pulmonaire dont les mécanismes sont incertains

<p><b>1. Hypertension artérielle pulmonaire</b></p> <p>1.1 Idiopathique</p> <p>1.2 Héritable</p> <p>1.2.1 BMPR2</p> <p>1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3</p> <p>1.2.3 Autres mutations</p> <p>1.3 Induite par des médicaments et toxines</p> <p>1.4 Associée à une</p> <p>1.4.1 Connectivite</p> <p>1.4.2 Infection au VIH</p> <p>1.4.3 Hypertension portale</p> <p>1.4.4 Cardiopathie congénitale</p> <p>1.4.5 Schistosomiase</p> <p>1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomasose capillaire pulmonaire</p> <p>1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né</p>
<p><b>2. Hypertension pulmonaire causée par à une cardiopathie gauche</b></p> <p>2.1 Insuffisance cardiaque gauche systolique</p> <p>2.2 Insuffisance cardiaque gauche diastolique</p> <p>2.3 Valvulopathie</p> <p>2.4 Obstacle gauche congénital ou acquis et cardiomyopathies congénitales</p>
<p><b>3. Hypertension pulmonaire causée par une maladie pulmonaire et/ou l'hypoxie</b></p> <p>3.1 Maladie pulmonaire obstructive chronique</p> <p>3.2 Maladie interstitielle</p> <p>3.3 Maladie pulmonaire mixte (restrictive et/ou obstructive)</p> <p>3.4 Trouble ventilatoire du sommeil</p> <p>3.5 Hypoventilation alvéolaire</p> <p>3.6 Séjour prolongé en altitude</p> <p>3.7 Anomalie du développement pulmonaire</p>
<p><b>4. Hypertension pulmonaire causée par une maladie thromboembolique chronique ou autres obstructions artérielles pulmonaires</b></p> <p>4.1 Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique</p> <p>4.2 Autre obstruction artérielle pulmonaire</p> <p>4.2.1 Angiosarcome</p> <p>4.2.2 Autre tumeur intravasculaire</p> <p>4.2.3 Artérite pulmonaire</p> <p>4.2.4 Sténose artérielle pulmonaire congénitale</p> <p>4.2.5 Parasite (hydatidose)</p>
<p><b>5. Hypertension pulmonaire dont les mécanismes sont multiples ou incertains</b></p> <p>5.1 Maladie hématologique : syndrome myéloprolifératif, splénectomie, anémie hémolytique, chronique</p> <p>5.2 Maladie systémique : sarcoïdose, histiocytose pulmonaire de Langerhans</p> <p>5.3 Maladie métabolique : désordre thyroïdien, maladie de stockage du glycogène, maladie de Gaucher</p> <p>5.4 Autre : insuffisance rénale chronique, obstruction tumorale, fibrose médiastinale, hypertension pulmonaire segmentaire</p>

Figure 5. Classification des différents groupes d'hypertension pulmonaire.

## 2.2 Groupe 1 : Hypertension artérielle pulmonaire

Ce groupe fait l'objet d'une étude plus approfondie à la partie 3.

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une pathologie progressive affectant 15 à 25 cas par millions<sup>36</sup> avec un ratio de femmes touchées plus élevé comparativement aux hommes<sup>37</sup>.

Depuis le dernier symposium mondial sur l'hypertension pulmonaire en 2018, ce groupe est maintenant caractérisé par une pression artérielle pulmonaire supérieure à 20mmHg au repos<sup>38</sup>. Cette pression élevée, due à l'obstruction progressive des artères pulmonaires, conduit à une défaillance cardiaque droite et ultimement au décès des patients<sup>39</sup>.

Dans ce groupe, plusieurs sous-groupes ont été créé en fonction des similarités physiopathologiques, histologiques et de leur pronostique (figure 6).

<b>1. Hypertension artérielle pulmonaire</b>
1.1 Idiopathique
1.2 Héritable
1.2.1 BMPR2
1.2.2 ALK-1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
1.2.3 Autres mutations
1.3 Induite par des médicaments et toxines
1.4 Associée à une
1.4.1 Connectivite
1.4.2 Infection au VIH
1.4.3 Hypertension portale
1.4.4 Cardiopathie congénitale
1.4.5 Schistosomiase
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire
1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

Figure 6. Groupe 1 de la classification : Hypertension artérielle pulmonaire.

### 2.2.1 L'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique

Le sous-groupe d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique englobe toutes les HTAP dont les causes ne sont pas connues et dont il n'y a pas de composante héréditaire ni de facteur de risques. Cette sous-catégorie fait écho au groupe de l'hypertension pulmonaire secondaire de 1973. L'HTAP idiopathique dénombre environ 4 à 6 cas par millions dans le monde avec une proportion plus élevée de femmes<sup>40</sup>. Aux États Unis, le taux de mortalité de 146 morts par années.

### 2.2.2 L'hypertension artérielle pulmonaire héréditaire

Une mutation sur le récepteur BMPR2 (Bone morphogenic protein receptor type 2), membre de la super famille des tumor growth factor (TGF)- $\beta$ , représente 70% à 80% des cas familiaux d'HTAP<sup>41,42</sup>. Parmi cette super famille des TGF- $\beta$ , des mutations rares sur certains membres comptent pour 5% des patients malades tels que ALK1 (activin-like receptor kinase-1), ENG (endogline) et SMAD9<sup>41</sup>. Un pourcentage plus faible de patients ne présente pas de mutations sur les gènes déjà référencés associés à des pathologies, cependant de nouvelles mutations ont été découvertes sur des gènes différents tels que CAV1<sup>43,44</sup> ou bien KCNK3<sup>45</sup> (codant pour un canal potassique).

### 2.2.3 L'hypertension artérielle pulmonaire induite par des drogues ou toxines

Cette catégorie inclut l'hypertension artérielle pulmonaire pouvant être induite par la prise de médicaments, drogues ou toxines<sup>46-48</sup>. Parmi les substances nous retrouvons les méthamphétamines ou encore les anorexigènes. Toutes ces substances ont été catégorisées en fonction de leur potentiel de risque, d'un risque certain et démontré à un risque faible ou nul. Parmi les molécules à risque certain, le benfluorex (connu sous le nom commercial de MEDIATOR), un agent hypolipidémiant-hypoglycémiant, a été associé à 85 cas d'HTAP identifiés en France parmi des utilisateurs de ce médicament<sup>49</sup>. Enfin, la prise de substances toxiques telles que la méthamphétamine ou la cocaïne a été également associée au développement de la pathologie<sup>50</sup>.

### 2.2.4 L'hypertension artérielle pulmonaire associées à des pathologies

#### 2.2.4.a L'hypertension artérielle pulmonaire associée à des maladies du tissu conjonctif

L'association a principalement été démontrée avec la sclérodermie et est estimée à 7-12% des cas atteints de la pathologie qui développent une HTAP<sup>51,52</sup>. La sclérodermie est une pathologie auto-immune chronique du tissu conjonctif caractérisée par une surproduction et une accumulation de collagène dans les tissus. Le pronostic pour les patients atteints d'HTAP associé à la sclérodermie est plus défavorable comparativement aux autres groupes de l'HTAP<sup>51</sup>. En effet, le taux de mortalité après un an est de 30% comparativement à 15% pour les patients atteints d'HTAP idiopathique.

#### 2.2.4.b L'hypertension artérielle pulmonaire associée une infection par le VIH

Dans les années 1990, la prévalence de patients atteints du VIH (virus d'immunodéficience acquise) et présentant une hypertension artérielle pulmonaire était de 0.5%<sup>53,54</sup>. Avec le développement des thérapies antirétrovirales, la prévalence est passée à 0.46%. L'hypertension artérielle pulmonaire apparaît comme une complication rare de l'infection. L'amélioration de la prise en charge des patients atteints du VIH-HTAP a amélioré leur pronostic vital notamment grâce à l'utilisation de trithérapie antirétrovirale ainsi que le développement des thérapies pour l'HTAP.

#### 2.2.4.c L'hypertension artérielle pulmonaire associée une hypertension portale

L'hypertension portale est caractérisée par une augmentation de la pression au niveau de la veine porte hépatique (supérieure à 15mmHg)<sup>55,56</sup>. La prévalence de l'association HTAP et hypertension portale, nommée hypertension porto-pulmonaire est de 2 à 6 %. Le cathétérisme droit est fortement recommandé dans ces cas afin de pouvoir mesurer avec exactitudes les résistances vasculaires pulmonaires. De plus, il semblerait que selon la sévérité de l'affection hépatique, le risque de développer une hypertension artérielle pulmonaire pourrait augmenter.

#### 2.2.4.d L'hypertension artérielle pulmonaire associée à une cardiopathie congénitale

Une cardiopathie congénitale est une pathologie caractérisée par une malformation cardiaque présente à la naissance. De nos jours, cette malformation peut subsister jusqu'à l'âge adulte et il est estimé que 10% de ces adultes peuvent être atteints aussi d'hypertension artérielle pulmonaire<sup>57,58</sup>. L'évolution des traitements permettent de mieux traiter la cardiopathie durant l'enfance et d'améliorer le taux de survie des personnes atteintes. Cependant, la présence d'hypertension artérielle pulmonaire diminue la survie chez ces personnes.

#### 2.2.4.e L'hypertension artérielle pulmonaire associée à une schistosomiase

La schistosomiase représente la seconde endémie parasitaire mondiale due à un ver, le schistosome<sup>59</sup>. Cette pathologie est caractérisée par un profil inflammatoire très important engendrant une accumulation de collagène dans les tissus. L'hypertension artérielle pulmonaire associée à cette parasitose a été inclus dans le groupe 1 en 2008. Environ 5% des personnes atteintes schistosomiase développent une hypertension artérielle pulmonaire<sup>60,61</sup>.

### 2.2.5 Sous-groupe 1' : l'hypertension artérielle pulmonaire associée à la maladie veino-occlusive et/ou à l'hémangiomasose capillaire pulmonaire

Ces deux pathologies sont des pathologies rares et ont été associées et reconnues comme des facteurs de risques de développement de l'HTAP<sup>62</sup>. L'HTAP associée à ce sous-groupe ressemble à l'HTAP idiopathique cependant certaines différences que l'on peut observer radiologiquement expliquent que cette sous-catégorie ait été créé.

### 2.2.6 Sous-groupe 1'' : l'hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né

À la naissance, certains nouveaux nés présentent un maintien de la constriction des artères pulmonaires induisant une diminution du débit sanguin pulmonaire associée à une augmentation de la pression artérielle pulmonaire<sup>63</sup>. Au niveau cardiaque, une dérivation droite-gauche par le foramen ovale s'installe. Le foramen ovale constitue une jonction ouverte entre les deux oreillettes, à la naissance celle-ci se ferme chez les nouveaux nés sains.

## **2.3 Groupe 2 : L'hypertension pulmonaire due à une maladie cardiaque gauche**

L'hypertension pulmonaire de groupe 2 est plus répandue que l'HTAP de groupe 1. Cette hypertension pulmonaire est reconnue comme étant une complication commune d'une cardiopathie gauche ou d'une pathologie valvulaire<sup>64,65</sup>. Parmi ces cardiopathies nous trouvons les dysfonctionnements systoliques et diastoliques ainsi que les pathologies affectant les valves cardiaques<sup>66</sup>. Environ 70% des patients atteints d'une cardiopathie gauche développent une hypertension pulmonaire. L'hypertension pulmonaire due à une cardiopathie gauche connaît une augmentation des pressions pulmonaires dû à une élévation des pressions dans l'oreillette gauche qui se répercute passivement sur le réseau vasculaire pulmonaire induisant une augmentation de la pression artérielle pulmonaire (PAP)<sup>64</sup>. Pour la majorité des cas, l'hypertension pulmonaire peut être reversée si les pressions dans le cœur gauche sont normalisées notamment après l'administration de vasodilatateurs ou de diurétiques<sup>67</sup>.

#### **2.4 Groupe 3 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une maladie pulmonaire chronique ou hypoxique**

Dans ce groupe, plusieurs pathologies pulmonaires sont à l'origine du développement de l'hypertension pulmonaire. C'est le cas de la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO ou COPD chronic obstructive pulmonary disease) ou de maladies interstitielles<sup>68,69</sup> dont fait partie la fibrose pulmonaire idiopathique. D'autres maladies pulmonaires peuvent être la cause primaire de l'hypertension pulmonaire telles que : l'apnée du sommeil et l'exposition chronique à la haute altitude. Une hypoxie chronique s'installe favorisant le développement de l'hypertension pulmonaire<sup>70,71</sup>.

Bien souvent les traitements utilisés pour le groupe 1 sont inefficaces, seul le traitement de la pathologie pulmonaire sous-jacente permet une amélioration de la fonction pulmonaire. La présence d'une hypertension pulmonaire est associée à une diminution de la survie des patients ainsi qu'à une augmentation de complications<sup>72</sup>.

#### **2.5 Groupe 4 : L'hypertension pulmonaire secondaire à une thromboembolique chronique**

Ce groupe est caractérisé par la présence de caillots sanguins se formant de façon chronique dans les artères pulmonaires, favorisant ainsi leur obstruction. Cela induit l'augmentation des pressions dans les artères pulmonaires et diminue la perfusion des poumons. Environ 4% des patients présentant un embolisme pulmonaire développent une hypertension pulmonaire<sup>73,74</sup>. Le diagnostic de la pathologie se fait par imagerie en étudiant le ratio ventilation / perfusion (V/Q scan). Si la ventilation ne correspond pas la perfusion (ventilation normale mais faible perfusion) cela indique fortement la présence de caillots dans les artères. Cependant l'examen de prédilection utilisé est l'angiographie pulmonaire, durant lequel un agent de contraste est injecté au niveau des artères pulmonaires tout en prenant des radiographies afin de visualiser le trajet du sang dans les artères. Le plus souvent, ce test est réalisé en même temps que le cathétérisme cardiaque droite. Ce groupe d'hypertension pulmonaire est le seul potentiellement curable en utilisant une chirurgie invasive complexe : PTE (pulmonary thromboendarterectomy)<sup>75</sup>. La chirurgie permet de retirer les caillots sanguins dans les artères concernées. Cependant, le patient doit subir une chirurgie invasive à thorax ouvert et un by-pass cœur-poumon<sup>76</sup>.

## **2.6 Groupe 5 : L'hypertension pulmonaire dont les mécanismes sont incertains**

Ce groupe regroupe toutes les hypertension pulmonaire découvertes mais dont le mécanisme est inconnu ou incertain. C'est un groupe hétérogène dont l'hypertension pulmonaire peut être associée à des désordres hématologique, systémique, métabolique ou varié<sup>77</sup>.

Dans ce groupe, nous pouvons trouver une hypertension pulmonaire associée une anémie hémolytique chronique par exemple. La cause de cette hypertension pulmonaire reste encore peu claire à ce jour. La prévalence a été très étudiée dans l'hypertension pulmonaire associée à la drépanocytose qui est de 6 à 11% des patients<sup>78</sup>.

Jusqu'à très récemment ce groupe appartenait au groupe 1 des HP, cependant, d'un point de vue pathologique, hémodynamique et thérapeutique, cette sous-catégorie diffère des autres sous catégories du groupe 1, c'est pour cela que récemment cette sous-catégorie a été déplacée au groupe 5.

## **3. HTAP, l'hypertension pulmonaire de groupe 1**

### **3.1 Épidémiologie**

Comme cité précédemment, l'HTAP est une pathologie progressive affectant 15 à 25 cas par millions<sup>36</sup> avec un ratio de femmes touchées plus élevé comparativement aux hommes<sup>37</sup>. En effet, selon la première étude épidémiologique de la NIH (National Institutes of Health) entre 1981 et 1985, 7 femmes étaient atteintes d'HTAP pour 1 homme<sup>79</sup>. Les registres plus récents démontrent également cette prédominance féminine (environ 3,6 femmes pour 1 homme)<sup>80,81</sup>. La distribution ethnique de la maladie représente 72,8% de caucasiens, 12,2 % d'afro-américains suivi de la population hispanique 8,9% et asiatique 3,3%<sup>80</sup>.

Dans les registres, la moitié des patients HTAP présentent une forme idiopathique ou héréditaire, l'autre moitié présente une HTAP associée à des pathologies du tissu conjonctif et des cardiopathies gauches congénitales. La plus fréquente des maladies du tissu conjonctif associée à l'HTAP est la sclérodermie.

Lorsque l'on s'intéresse à la survie des patients HTAP, le registre de la NIH démontrait, avant les années 1990, une estimation de la survie à 1 an, 2 ans et 3 ans de 68%, 48% et 34% respectivement<sup>82</sup>. Le registre le plus récent, comprenant tous les types d'HTAP, démontre une amélioration de la survie qui est estimée à 85%, 68%, 57% et 49% pour 1 an, 3 ans, 5

ans et 7 ans respectivement<sup>83</sup>. La moyenne d'âge des patients recevant un diagnostic d'HTAP idiopathique selon le registre NIH était de 35 +/- 15 ans<sup>84</sup>. Cependant, avec le temps l'âge de diagnostic s'est allongé allant jusqu'à plus de 65ans dans la population européenne<sup>85</sup>.

## **3.2 Symptômes cliniques et diagnostic**

### **3.2.1 Symptômes cliniques**

Les symptômes que les patients présentent ne sont pas spécifiques à l'HTAP ce qui rend le diagnostic fastidieux à établir. Ceux-ci incluent de la fatigue, de la toux ou bien encore de la dyspnée symptômes très communs mais peu spécifiques<sup>86,87</sup>. Dans la liste des symptômes que l'on peut retrouver chez un patient nous avons aussi ceux qui indiquent un problème cardiaque droit tels que des œdèmes ou bien une distension abdominale<sup>88</sup>.

Étant donné la rareté de la maladie, plusieurs autres diagnostics, plus communs, peuvent être envisagés avant, tel que l'asthme par exemple, et de ce fait les patients sont bien souvent diagnostiqués avec un retard d'environ 2 à 3 années. Les patients sont donc pris en charge à des stades avancés de la maladie ce qui implique une détérioration majeure de la qualité de vie de ceux-ci durant ce temps de prise en charge.

### **3.2.2 Diagnostic**

Pour le diagnostic, plusieurs examens et outils médicaux sont nécessaires afin d'investiguer le cas d'un patient. Nous nous proposons de présenter les guides de diagnostic proposés en 2015 par la société européenne de cardiologie et respiratoire (ESC et ERS)<sup>48</sup>.

#### **3.2.2.a L'électrocardiogramme**

L'électrocardiogramme (ECG) est un examen réalisé en première intention lors d'une suspicion d'hypertension pulmonaire. Cet examen rapide et indolore, permet d'avoir des indications sur la fonction cardiaque globale. Pour le diagnostic, cet examen peut indiquer si le patient présente des anomalies de la fonction ventriculaire. Les tracés peuvent être altérés dans les cas très sévères d'hypertension pulmonaire. Cependant, un ECG normal n'exclut en aucun cas la possibilité d'une hypertension pulmonaire.

### 3.2.2.b La radiographie thoracique

La radiographie thoracique est un examen peu coûteux et non invasif aussi réalisé en première intention. Cet examen permet d'observer de façon grossière l'état global du parenchyme pulmonaire, la taille du cœur droit et permet aussi d'analyser le tronc de l'artère pulmonaire. Sur la radiographie il est aussi possible de noter une raréfaction d'artères pulmonaires distales qui indiquerait la présence d'une hypertension pulmonaire. De plus, l'examen peut mettre en évidence une pathologie sous-jacente qui serait liée à une hypertension pulmonaire. Dans 90% des cas d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique la radiographie est anormale au moment du diagnostic<sup>89</sup>. En effet celle-ci met en évidence une artère pulmonaire dilatée. Tout comme l'ECG, une radiographie thoracique normale n'exclut pas une hypertension pulmonaire.

### 3.2.2.c Examen de la fonction pulmonaire

L'exploration de la fonction pulmonaire ainsi que l'analyse du contenu gazeux sanguin permettent de déterminer s'il y a des anomalies au niveau du parenchyme pulmonaire ou bien au niveau des voies aériennes. Chez les patients HTAP, la diffusion gazeuse peut être normale néanmoins la majorité des patients présentent une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone et cela est associé à un pronostic vital engagé<sup>90,91</sup>. La diminution de la capacité de diffusion peut être la résultante d'une pathologie associée à l'hypertension pulmonaire, telle que la sclérodémie ou bien des pathologies touchant le parenchyme pulmonaire. Une maladie pulmonaire interstitielle, comme nous l'avons vu plus haut, peut être associée à une hypertension pulmonaire de groupe 3. Il est possible de déterminer si c'est le cas chez un patient par cet examen lorsqu'on observe une diminution du volume pulmonaire associée à une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone<sup>92</sup>.

### 3.2.2.d Échocardiographie

Bien que les examens de routine cités précédemment aident au diagnostic dans 80% des cas, une échocardiographie est recommandée pour certains patients. L'échocardiographie Doppler transthoracique est un examen non invasif permettant d'estimer la pression artérielle pulmonaire et ainsi de déterminer la sévérité de la pathologie. Rappelons que la fonction doppler d'une échographie permet de visualiser l'écoulement sanguin dans les vaisseaux. Cet

examen permet d'observer la morphologie du ventricule droit et plusieurs modifications morphologiques peuvent être mesurées chez des patients telles que : une dilatation ventriculaire et auriculaire, une compression du ventricule gauche durant la contraction cardiaque, une déviation du septum interventriculaire ou bien encore un épanchement péricardique. Néanmoins, dans les cas d'une hypertension pulmonaire légère ou asymptomatique il n'est pas souhaitable de se fier à l'estimation de la pression artérielle pulmonaire par cet examen.

### 3.2.2.e Outils d'imagerie médicale

Afin d'exclure toute hypertension pulmonaire de groupe 4 (hypertension pulmonaire thromboembolique) une scintigraphie pulmonaire est nécessaire. Avec la scintigraphie il est possible de déceler des perturbations de ventilation (V) et de perfusion (Q) et analyser le trajet du sang et de l'air dans les poumons. Le rapport V/Q représente un bon indicateur de l'état général du tissu pulmonaire.

Le recours à la tomodensitométrie permet d'observer le réseau vasculaire, le parenchyme, le cœur et le médiastin et ainsi déterminer si ceux-ci ne présentent pas d'anomalies<sup>89</sup>. En effet, il est possible d'analyser le diamètre de l'artère pulmonaire qui peut nous indiquer si le patient présente une hypertension pulmonaire et identifier la cause (comme une embolie ou une maladie pulmonaire sous-jacente). L'examen permet aussi de poser le diagnostic d'une maladie pulmonaire interstitielle ou d'un emphysème en observant la structure du parenchyme pulmonaire.

Une imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque est un examen non invasif et reproductible permettant d'évaluer la taille et la morphologie du ventricule droit. Cette IRM cardiaque permet aussi d'explorer le flux sanguin et de déterminer des paramètres hémodynamiques tels que le débit cardiaque ou bien le volume d'éjection ventriculaire. Pour les patients atteints d'HTAP, cet examen se révèle pertinent notamment dans le suivi de la prise en charge<sup>93-95</sup>.

L'échographie abdominale peut elle aussi se révéler utile pour identifier des causes potentielles de l'hypertension. Il est ainsi possible diriger le diagnostic vers une hypertension portale par cet examen non invasif à l'aide d'agents de contrast<sup>96</sup>.

### 3.2.2.f Tests sanguins, immunologiques et génétiques

Les tests sanguins ne permettent pas de poser un diagnostic, cependant ils sont nécessaires pour déterminer les causes ou origines de celle-ci. Par exemple, une affection thyroïdienne est commune dans l'HTAP et devrait être explorée lors des tests sanguins<sup>89</sup>. Les tests sérologiques permettent aussi de détecter une infection au VIH ou une atteinte hépatique. L'investigation immunologique doit être effectuée afin de diagnostiquer une potentielle sclérodémie. Cette pathologie peut être décelée par la présence d'anticorps antinucléaires dans les échantillons sanguins de patients.

En ce qui concerne les tests génétiques ceux-ci peuvent être offerts aux patients HTAP, notamment pour déterminer la présence de mutations sur le gène *BMPR2*. Pour des patients jeunes (moins de 40 ans) qui ne sont pas porteurs de mutations sur le gène *BMPR2*, il est recommandé de suggérer un test génétique pour explorer d'autres gènes potentiels tels que *ALK1*, *ENG* ou encore *KCNK3* et *CAVI*<sup>89</sup>.

### 3.2.2.g Cathétérisme cardiaque droit et réactivité vasculaire

Le cathétérisme cardiaque droit est un examen invasif mais néanmoins indispensable au diagnostic de l'HTAP et de sa sévérité. Cet examen permet de mesurer de façon directe la pression artérielle pulmonaire et ainsi de confirmer ou infirmer un diagnostic obtenu par les outils précédemment cités. Associée à cet examen, il est possible de tester la réactivité vasculaire pulmonaire chez les patients HTAP idiopathique et héréditaire ou bien des patients avec une HTAP induite par des médicaments. Le test de réactivité vasculaire permettra de déterminer le traitement idéal pour les patients, notamment si ceux-ci présentent une réactivité vasculaire pulmonaire ils pourront suivre un traitement basé sur des inhibiteurs calciques. Le cathétérisme droit consiste à introduire un cathéter par la veine jugulaire et de le diriger jusqu'à l'oreillette droite puis dans le ventricule droit en passant au travers de la valve tricuspide (figure 7). Enfin, le cathéter est introduit dans l'artère pulmonaire en traversant la valve pulmonaire. Ainsi, cet examen permet une mesure précise des pressions, autant cardiaque droite que pulmonaire et permet de déterminer le débit cardiaque et toutes anomalies hémodynamiques (figure 7).

Malgré que cela soit une méthode invasive, celle-ci reste sécuritaire avec un taux de morbidité bas (1.1%) et de mortalité très bas aussi (0.055%) lorsqu'elle est réalisée dans des centres de diagnostic expert<sup>97</sup>.

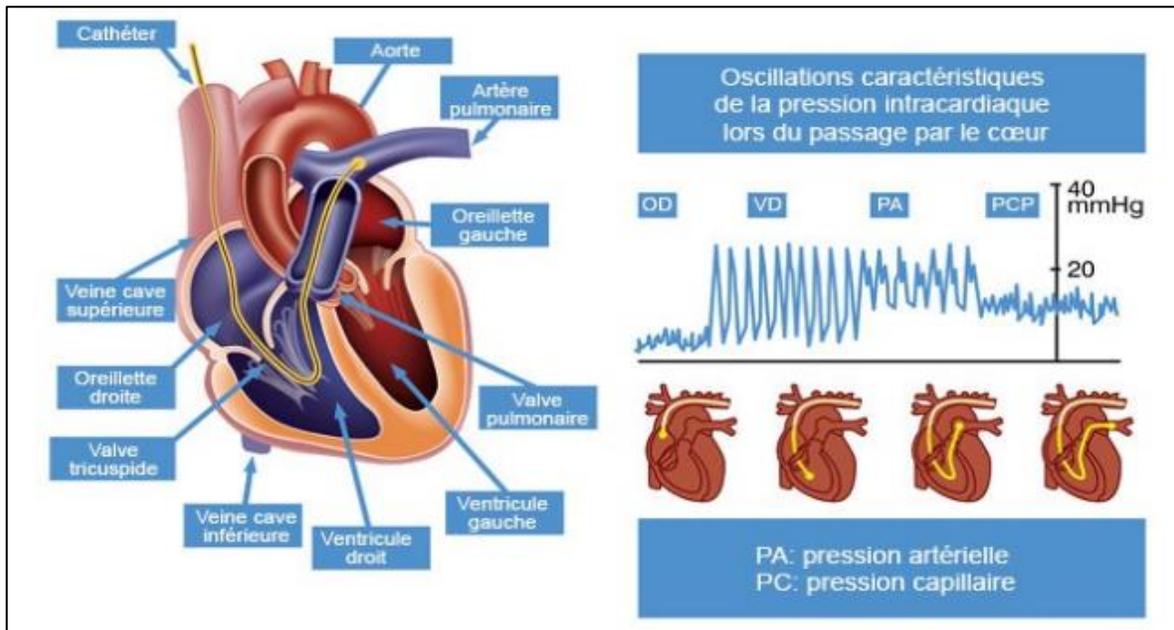


Figure 7. Cathétérisme cardiaque droit et tracé représentatif.

A gauche : Insertion du cathéter dans le ventricule droit puis dans l'artère pulmonaire. A droite : Tracés représentatifs des pressions dans le ventricule et dans l'artère pulmonaire.

### 3.2.2.h Capacité à l'exercice

La mesure de la résistance à l'effort se fait grâce au test de 6min de marche (6MWT, 6min walk test). Ce test fonctionnel permet de mesurer la distance que les patients peuvent réaliser sur une période de 6 min de marche sur tapis roulant ou sur surface plane. De nombreuses variables peuvent cependant venir altérer les résultats de ce test telles que l'âge, le poids, ou le sexe du patient. C'est pourquoi, la société thoracique américaine a publié un guide pour la réalisation du 6MWT afin de normaliser les résultats en fonction de plusieurs variables. Ce test peut aussi être associé à une exploration fonctionnelle cardiopulmonaire. Il est suggéré de réaliser un 6MWT de base et le répéter 3-4 mois après le début d'un traitement afin d'en assurer le suivi et de prédire le pronostic des patients HTAP. En effet, le suivi des patients après l'initiation d'un traitement est primordial afin d'observer les effets du traitement mis en place et de le modifier si celui-ci ne démontre pas les résultats attendus.

### 3.2.2.i Marqueurs biochimiques

Il existe plusieurs marqueurs biochimiques qui peuvent être explorés bien que ceux-ci ne soient pas spécifiques à l'HTAP. Ceux-ci sont répartis en plusieurs groupes tout d'abord les marqueurs d'une dysfonction vasculaire qui regroupent des acteurs tels que l'endothéline 1 ou le facteur de Von Willebrand. Le groupe des marqueurs inflammatoires englobent de nombreuses cytokines et des médiateurs inflammatoires comme des interleukines. Nous avons aussi des marqueurs du stress myocardique qui reflètent la fonction cardiaque c'est le cas notamment du peptide natriurétique B (BNP : brain natriuretic peptide) qui se retrouve augmenté lorsqu'il y a une atteinte cardiaque. Ensuite, il y a les marqueurs d'une hypoxie tissulaire et les marqueurs de l'atteinte d'un organe par exemple la créatinine pour une atteinte rénale.

Cette liste continue sans cesse d'être mise à jour, mais néanmoins le marqueur de stress myocardique le plus utilisé actuellement dans les centres de diagnostic est le ratio BNP/NT-proBNP (N Terminal proBNP). Ce ratio n'est cependant pas spécifique à l'HTAP et peut être élevé dans d'autres maladies cardiaques, c'est pourquoi il faut prendre ces mesures dans le contexte clinique d'un patient.

### 3.3 Physiopathologie poumon - cœur

L'obstruction artérielle est en partie issue d'une combinaison entre une augmentation de la prolifération et une augmentation de la survie des cellules musculaires lisses, le tout menant à un remodelage vasculaire<sup>39,98</sup>. Outre le remodelage, les artères pulmonaires subissent une vasoconstriction jouant aussi un rôle dans l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire. Cette augmentation progressive de la pression induit un remodelage du ventricule droit (VD) qui va, dans un premier temps, s'hypertrophier afin de maintenir le débit cardiaque<sup>99,100</sup>, c'est la phase de compensation. Puis le VD entrera dans une phase de décompensation (dite « mal adaptative » avec une chute du débit cardiaque) caractérisée par une augmentation de l'hypertrophie, de la fibrose et est associée à des troubles de perfusion<sup>101</sup>.

### 3.3.1 Le remodelage vasculaire pulmonaire

L'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires prend origine dans l'obstruction progressive des artères pulmonaires distales. Une combinaison de facteurs environnementaux et génétiques, affectant les cellules endothéliales et l'artère en général, semble être le point départ du développement de la pathologie<sup>102-105</sup>. Il s'en suit ensuite un remodelage anormale par hypertrophie et hyperplasie de la média artérielle<sup>106</sup>.

#### 3.3.1.a Dysfonction endothéliale

Comme nous l'avons précisé, l'hypertension artérielle pulmonaire est caractérisée par un remodelage vasculaire profond ainsi qu'une constriction importante dont l'origine se retrouvent dans des désordres cellulaires multiples. Ce remodelage induit l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires. Au niveau cellulaire, les mécanismes exactes par lesquels se développent la pathologie sont encore méconnus ou incompris. Cependant, une théorie soulève que tout prendrait racine au niveau endothéliale (par des lésions cellulaires notamment) et cela se répercuterait sur les cellules musculaires lisses adjacentes favorisant leur prolifération.

Dans le cadre de l'HTAP, c'est dans les années 1950 qu'il fut émis l'hypothèse selon laquelle les cellules endothéliales participeraient au développement des lésions vasculaires<sup>107,108</sup>. La théorie veut qu'initialement des dommages subis par les cellules endothéliales provoqueraient leur mort prématurée.

Les cellules qui survivent à ces dommages se seraient adaptées et auraient acquis un phénotype hyper-prolifératif et résistant à l'apoptose. Ce phénotype est d'ailleurs observable au niveau des cellules endothéliales isolées de patients une fois mises en culture. En effet, celles-ci maintiennent un niveau de prolifération très élevé<sup>109</sup>, une capacité de migration plus importante<sup>74</sup> ainsi qu'une résistance à l'apoptose comparativement à des cellules isolées de patients sains<sup>110</sup>.

Les cellules endothéliales dysfonctionnelles vont participer au recrutement de cellules inflammatoires ainsi qu'à la sécrétion importante de facteurs pro-prolifératifs stimulant les cellules musculaires lisses. En effet, les cellules endothéliales étant au contact des cellules

musculaires lisses, celles-ci possèdent la capacité à communiquer avec elles par le biais d'une communication paracrine<sup>111</sup>. Ce mode de signalisation implique des molécules qui sont synthétisées par les cellules endothéliales et qui agissent sur les cellules musculaires lisses avoisinantes.

D'un point de vue physiologique, la couche de cellules endothéliales est responsable du tonus vasculaire pulmonaire par le biais de la sécrétion de multiples molécules telles que l'endothéline 1 (molécule vasoconstrictrice) ou bien l'oxyde nitrique (effet vasodilatateur)<sup>112,113</sup>. Cependant, ces molécules peuvent aussi induire d'autres effets tels que la production de matrice extracellulaire par exemple.

Parmi les agents favorisant la relaxation des vaisseaux, nous retrouvons notamment l'oxyde nitrique et la prostacycline. La diminution de la sécrétion de l'oxyde nitrique (agent vasodilatateur très important) est la résultante de la diminution de l'expression de l'oxyde nitrique synthase endothéliale<sup>114</sup>. Concernant la prostacycline, cette substance possède un effet vasodilatateur favorisant également la relaxation artérielle. Cependant, dans la pathologie, la prostacycline se retrouve diminuée, favorisant ainsi la constriction artérielle<sup>115</sup>. Enfin, l'endothéline 1, spécifiquement sécrétée par les cellules endothéliales vasculaires, est un agent vasoconstricteur très abondant dans le tissu pulmonaire<sup>116</sup>.

La dérégulation de la synthèse de ces agents induit une vasoconstriction importante des artères pulmonaires favorisant une augmentation des résistances pulmonaires.

Dans le groupe de l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique, les cellules endothéliales dysfonctionnelles sont associées à des lésions vasculaires nommées lésions plexiformes<sup>117</sup> (figure 8).

Ces lésions se retrouvent notamment au niveau des embranchements artérielles et présentent une structure particulièrement désorganisée<sup>117</sup> ainsi qu'une infiltration importante de cellules inflammatoires. Les branches artérielles présentent des dommages très importants ainsi qu'une dilatation. C'est à ce niveau que les cellules endothéliales dysfonctionnelles prolifèrent pour former une lésion plexiforme<sup>118</sup>.

Dans certains cas d'hypertension pulmonaire associée à d'autres pathologies, il est également possible de retrouver des lésions plexiformes<sup>119</sup>. De façon plus générale, 90% des poumons HTAP présentent ce type de lésion<sup>119</sup>.

### 3.3.1.b Les cellules musculaires lisses

Tout comme les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires de patients préservent leur phénotype hyper-prolifératif et résistant à la mort cellulaire et cela même *ex vivo*.

En effet, les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP sont capables d'éviter l'apoptose par la présence de facteurs anti-apoptotiques surexprimés dans la pathologie tels que survivin<sup>120-122</sup>.

Sous les divers signaux émis par les cellules endothéliales, les cellules musculaires se mettent à proliférer et vont progressivement obstruer la paroi vasculaire artérielle provoquant une augmentation des résistances et donc des pressions pulmonaires. Le débalancement entre la prolifération et l'apoptose des cellules musculaires lisses induit un épaissement de la media artérielle<sup>106</sup>.

Plusieurs signaux peuvent favoriser la prolifération de ces cellules, c'est le cas notamment de divers facteurs de croissance et de cytokines que l'on va retrouver augmentés chez des patients atteints d'HTAP (comme présenté plus bas).

Ce débalancement peut être également expliqué par des régulations épigénétiques qui favorise le maintien de ce phénotype, nous présenterons de façon détaillée ces régulations dans une partie ultérieure.

Comme mentionné précédemment, associée au remodelage, les artères pulmonaires subissent une constriction importante. Les substances chimiques sécrétées par les cellules endothéliales vont agir sur les cellules musculaires lisses avoisinantes. En effet, la structure des cellules musculaires lisses leur permet de se contracter et ainsi jouer sur le diamètre vasculaire. Ces cellules possèdent les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub> permettant d'être sensibles à l'endothéline 1<sup>123</sup>. Étant donné que les patients atteints d'HTAP présentent des niveaux élevés d'endothéline 1<sup>124</sup> due à la dysfonction endothéliale, cela est corrélé à l'augmentation des résistances pulmonaires vasculaires<sup>125</sup>.

Afin de permettre la contraction des cellules musculaires, l'homéostasie calcique intracellulaire entre en jeu notamment par une libération de calcium des réserves calciques intracellulaire (le réticulum endoplasmique) ou *via* une entrée de calcium du compartiment extracellulaire (à l'aide de transporteurs membranaires). Cette homéostasie peut être altérée par la sécrétion des agents modulateurs du tonus vasculaire comme l'endothéline 1 par exemple<sup>126,127</sup>.

Il est à noter que le tonus vasculaire est à l'heure actuelle la cible des traitements prescrits chez les patients atteints d'HTAP<sup>128-130</sup>, comme nous pourrions le discuter dans une section prochaine.

### 3.3.1.c L'obstruction artérielle

Comme nous venons de le mentionner, les artères pulmonaires des patients atteints d'HTAP subissent une vasoconstriction importante ainsi qu'un remodelage. Cet épaissement va induire une résistance à l'écoulement du sang dans l'artère concernée et cette résistance à l'écoulement se caractérisera par une augmentation de la pression pulmonaire artérielle (figure 8).

Concernant l'obstruction artérielle, en 1984, il fut également émis l'hypothèse que la présence de thrombose dans l'HTAP pouvait en être la cause<sup>131</sup>. Au cours des années qui suivirent, plusieurs études ont montré que des patients HTAP présentaient des lésions thrombotiques<sup>132-135</sup>. Malgré ce constat, le rôle de ces lésions dans le développement et la progression de la maladie reste à l'heure actuelle très controversé<sup>136</sup>. Associées à ces lésions thrombotiques, des altérations de la coagulation et de l'activation plaquettaire sont aussi observées dans l'HTAP. La présence de lésions thrombotiques au niveau des artères pulmonaires induit aussi une résistance à l'écoulement du sang et par conséquent une augmentation des pressions au niveau pulmonaire.

D'autres types de lésions vasculaires, autre que les lésions plexiformes, nommées lésions concentriques obstructives, sont aussi détectées dans la lumière vasculaire pulmonaire spécifiquement<sup>117</sup>. Les lésions plexiformes et les lésions concentriques obstructives sont associées à l'HTAP idiopathique<sup>137</sup>.

De plus, nous retrouvons une infiltration de cellules inflammatoires (macrophages, cellules dendritiques et mastocytes) au niveau des lésions plexiformes<sup>138</sup> ainsi que dans les espaces périvasculaires<sup>139</sup>. La présence de ces cellules dans les espaces périvasculaires leur permet de moduler la réponse inflammatoire.

Tous ces dysfonctionnements favorisent l'obstruction des artères pulmonaires et ainsi contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires.

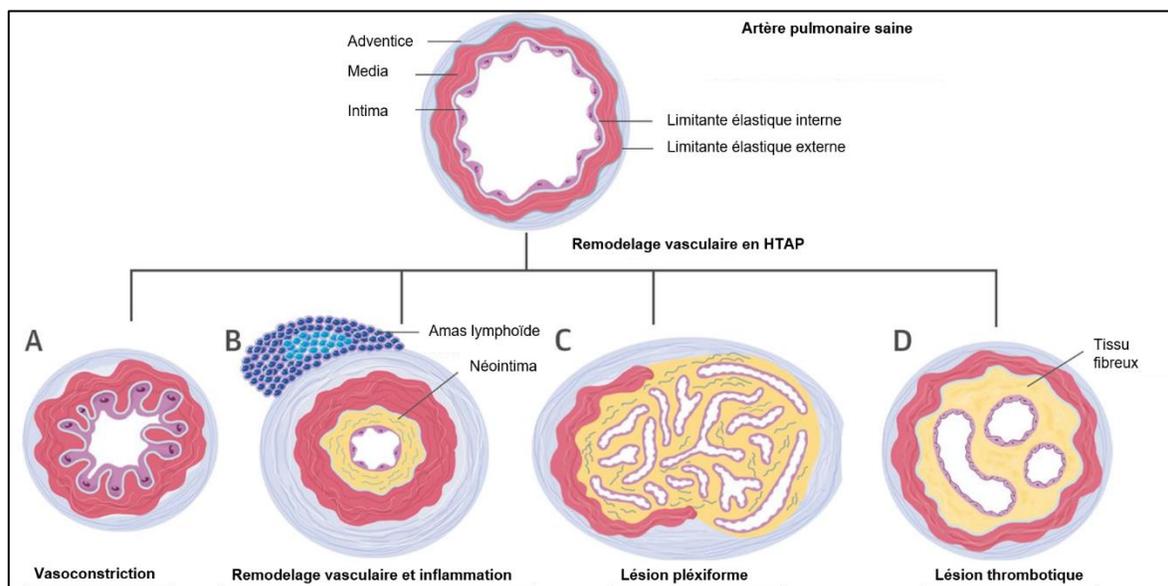


Figure 8. Physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire.

(A) La vasoconstriction pulmonaire. (B) Remodelage vasculaire pulmonaire et inflammation. (C) Dysfonctionnement endothélial, prolifération et résistance à l'apoptose, déclenchés par la production aberrante de facteurs de croissance. (D) L'artériopathie thrombotique, un profil pathologique très répandu en HTAP, est une caractéristique physiopathologique importante de la maladie. Figure adaptée de<sup>140</sup>.

### 3.3.2 Remodelage ventriculaire et défaillance cardiaque droite

#### 3.3.2.a Initiation du remodelage ventriculaire et adaptation fonctionnelle

La cause principale du décès des patients atteints d'HTAP est la défaillance cardiaque droite. Le remodelage vasculaire des artères pulmonaires de ces patients est le point de départ du remodelage de leur ventricule droit. L'obstruction des artères augmente les résistances à l'écoulement du sang dans celles-ci et induit une augmentation des pressions vasculaires pulmonaires (figure 9).

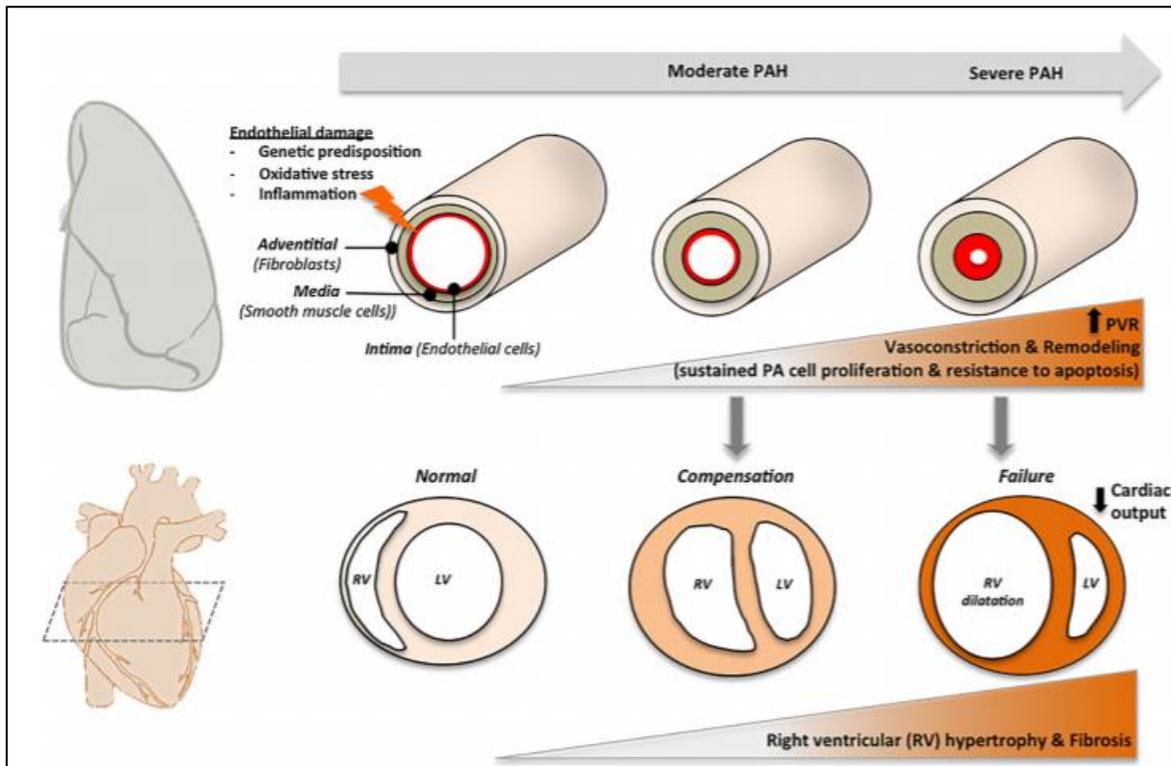


Figure 9. Progression de l'HTAP et les effets sur le ventricule droit.

À la suite d'un dysfonctionnement endothélial, les artères pulmonaires distales (AP) subissent remodelage vasculaire associé à une prolifération exagérée et à une résistance à l'apoptose des cellules résidentes de l'AP. Ce changement structurel se traduit progressivement par l'occlusion de la lumière vasculaire pulmonaire et contribue à l'élévation des résistances vasculaires pulmonaires (PVR) et de la pression artérielle pulmonaire. En raison d'une surcharge de pression, le ventricule droit (RV) compense initialement par une augmentation de l'hypertrophie et de la contractibilité pour maintenir le débit cardiaque (CO). Chez la plupart des patients, cependant, ces mécanismes compensatoires ne sont pas suffisants, s'en suit le décès prématuré du patient. Figure extraite de<sup>141</sup>.

Dans des conditions physiologiques, la pression dans les artères pulmonaires est faible et le ventricule droit est très peu consommateur d'énergie bien que celui-ci éjecte la même quantité de sang que le ventricule gauche durant un cycle cardiaque. Lorsque la pathologie se développe, la pression dans les artères pulmonaires augmente et la contractilité du ventricule droit chute<sup>142</sup>.

En réponse à une augmentation des pressions, le ventricule droit s'hypertrophie et se dilate pour s'adapter cependant ce remodelage ventriculaire à ses limites<sup>143</sup>. Au stade final de la pathologie, le débit cardiaque chute induisant une défaillance cardiaque (figure 10).

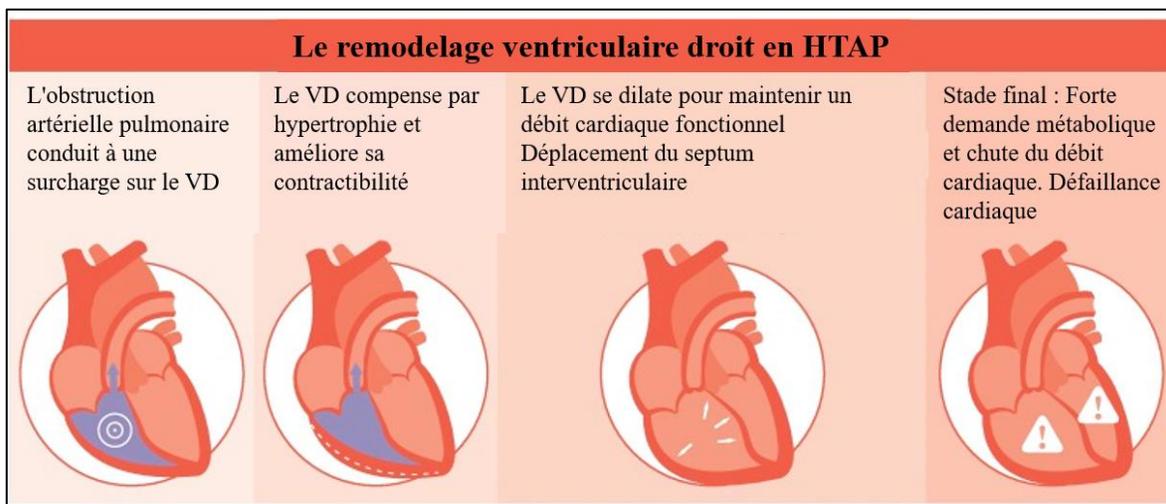


Figure 10. Evolution du ventricule droit à la suite de l'établissement de l'HTAP.

Le remodelage ventriculaire permet de compenser l'augmentation des pressions dans un premier temps. Cependant, le VD se dilate à mesure que la pathologie progresse en comprimant le ventricule gauche. Finalement, la défaillance cardiaque apparaît lorsque le VD ne peut plus maintenir ses fonctions. VD : ventricule droit. Figure adaptée de<sup>144</sup>.

D'un point de vue moléculaire, lorsque la pression artérielle pulmonaire augmente cela induit une série de réponses moléculaires provoquée par l'étirement de la paroi ventriculaire droite<sup>145</sup>. L'étirement de la paroi du ventricule est perçu par les cellules cardiaques et induit la génération de signaux biochimiques et électriques intracellulaires afin de permettre au tissu de répondre favorablement et de s'adapter à l'augmentation des pressions pulmonaires.

Cela se traduit notamment par une modification de l'organisation du cytosquelette *via* une redistribution des microtubules permettant de soutenir la croissance des sarcomères et donc des myofibrilles cardiaques<sup>146,147</sup>.

Différentes voies de signalisation intracellulaire peuvent être activées par l'étirement de la paroi cellulaire des suites de l'augmentation des pressions pulmonaires<sup>148-150</sup>. Cet étirement de la paroi est principalement transmis par les intégrines. Celles-ci sont des récepteurs transmembranaires permettant de faire le lien entre la matrice extracellulaire et le

cytosquelette<sup>151</sup> et sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaire. Parmi ces voies, nous retrouvons la voie des MAPKs notamment les MAPK/ERK kinases (MEKs) qui favorisent la stimulation de la protéine focale adhésion kinase (FAK). Ces acteurs moléculaires favorisent la transcription de protéines impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, notamment les métalloprotéinases<sup>152</sup>. Dans le ventricule droit hypertrophié, ces métalloprotéinases se retrouvent surexprimées et ont été associées à la défaillance cardiaque<sup>153,154</sup>.

Au niveau de la membrane cellulaire des cardiomyocytes se retrouvent également des canaux ioniques mécano-sensibles, qui, une fois activés par l'étirement de la paroi, favorisent l'entrée de calcium à l'intérieur de la cellule<sup>155</sup> potentialisant l'hypertrophie cellulaire<sup>156,157</sup>.

D'autres voies de signalisation se retrouvent activées à la suite de l'augmentation des pressions dans les artères pulmonaires, notamment les voies activées par des facteurs inflammatoires. C'est le cas notamment de l'endothéline 1 et de l'angiotensine<sup>158</sup> qui peuvent par la suite activer des récepteurs couplés à des protéines G (GPCR) et jouer sur l'homéostasie calcique intracellulaire en agissant sur la modulation de la voie de la CaMKII ainsi que de NFAT<sup>159</sup>.

Lors de l'initiation du remodelage ventriculaire droit, de nombreuses voies cellulaires sont activées notamment par l'étirement cellulaire. Dans les premiers stades de la pathologie, le ventricule droit est apte à maintenir ses fonctions en s'adaptant aux pressions élevées mais rapidement, celui-ci n'est plus capable de maintenir ses fonctions.

### 3.3.2.b Compensation et décompensation cardiaque droite

Nous allons mettre en évidence les modifications profondes que le ventricule droit rencontre lors de la phase de compensation pour aboutir à la décompensation.

La compensation du ventricule droit passe par un profond remodelage (figure 11) car celui-ci évolue d'une fonction à basse pression à une fonction de pompe sous forte pression. Cela se répercute sur le stress que la paroi ventriculaire subit puisque dans un premier temps la

paroi va s'épaissir par hypertrophie<sup>160-164</sup>. La contractilité du ventricule va ensuite s'adapter à ces nouveaux paramètres structuraux<sup>145,165</sup>. L'hypertrophie du ventricule droit permet de compenser et de maintenir un débit cardiaque adéquat et fonctionnel de façon temporaire<sup>163,164</sup>. Cependant, à mesure que la pathologie progresse le ventricule droit ne pourra compenser totalement ce qui induira des dommages et mènera ultimement à la défaillance cardiaque droite<sup>161,162</sup>.

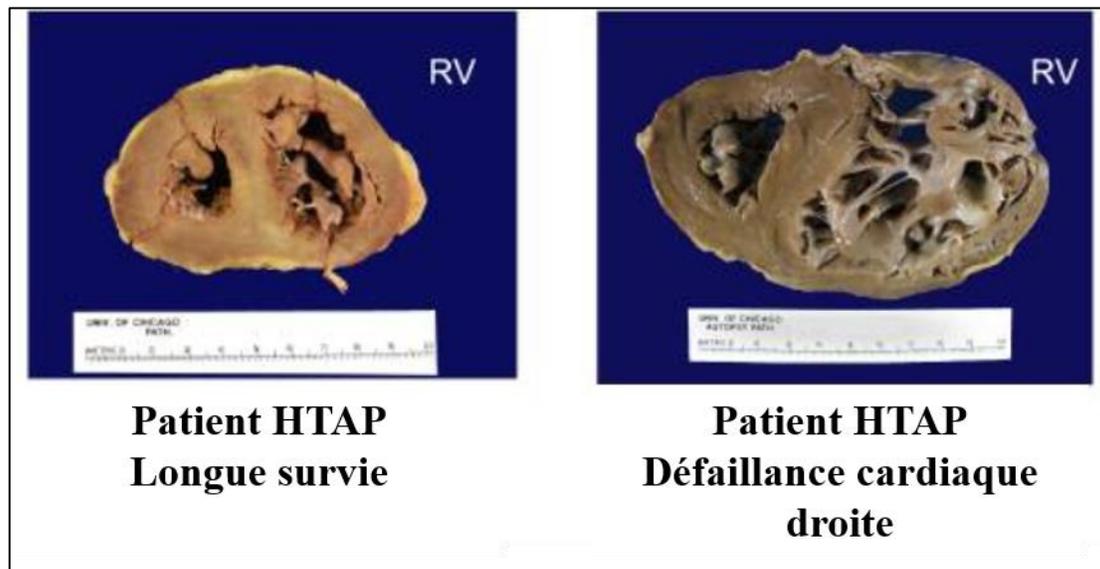


Figure 11. Coupes transversales de cœurs de patients HTAP.

À gauche : Le cœur d'un patient atteint d'HTAP (en coupe transversale) présentant une hypertrophie concentrique sévère du ventricule droit. À droite : Le cœur d'un patient atteint d'HTAP idiopathique décédé d'une défaillance cardiaque droite sévère. RV : Right ventricle. Image extraite de<sup>166</sup>.

### **Inflammation**

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'environnement inflammatoire important favorise l'accumulation de cellules inflammatoires au niveau du ventricule droit<sup>167-169</sup>, notamment des macrophages et des monocytes. Cette accumulation est retrouvée dans les tissus de patients ainsi que dans les modèles expérimentaux soulignant l'hypothèse que cette infiltration pourrait être délétère à la fonction ventriculaire droite. Toujours au niveau d'un modèle expérimental, il a été observé une augmentation de l'expression de médiateurs inflammatoires et une infiltration de cellules inflammatoires au niveau des zones où les cardiomyocytes étaient endommagés<sup>170</sup>.

De nombreuses cytokines et chimiokines se retrouvent en très grande proportion au niveau cardiaque dans une phase de défaillance, celles-ci peuvent contribuer au remodelage ventriculaire<sup>171</sup>. Parmi les cytokines présentes, nous retrouvons le TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ ), cytokine essentielle dans plusieurs voies inflammatoires dans la défaillance cardiaque<sup>172</sup>.

Le niveau circulant de TNF- $\alpha$  peut indiquer des détériorations cardiaques droites chez des patients<sup>173</sup>. Il a été également démontré une augmentation de l'expression du facteur dans les modèles expérimentaux notamment le modèle PAB<sup>174</sup> ainsi que le modèle monocrotaline<sup>175</sup>. L'interleukine 6, comme nous l'avons mis en évidence précédemment est très présente dans la physiopathologie de l'HTAP. Il a été démontré dans les ventricules droits défaillants, une augmentation du niveau d'expression de l'IL-6<sup>176</sup> ainsi que dans différents modèles expérimentaux tels que le modèle MCT<sup>177</sup> et PAB<sup>174,178</sup>. En 2017, une étude a mis en évidence les niveaux élevés d'IL-6 et la détérioration des fonctions ventriculaires droites chez les patients HTAP<sup>179</sup>.

D'un point de vue clinique, il est possible de mesurer le niveau plasmatique de plusieurs chimiokines afin de déterminer l'atteinte ventriculaire chez les patients HTAP. En effet, les chimiokines CXCL10 et CXCL12, importantes actrices de l'inflammation<sup>180</sup>, sont corrélées négativement à la fonction cardiaque droite en HTAP<sup>181</sup>.

### **Apoptose et fibrose cardiaque**

Dans un tissu cardiaque adulte sain le processus apoptotique est quasi inexistant mais celui-ci est très présent dans les ventricules en défaillance cardiaque<sup>182,183,184</sup>. Il a été démontré que le profil inflammatoire retrouvé dans le tissu ventriculaire peut favoriser l'apoptose notamment au niveau du modèle animal PAB<sup>185</sup>. Lorsque l'on se penche sur les causes de cette apoptose dans le tissu cardiaque, il a été décrit une augmentation du niveau de caspase-3 et de Bax, deux agents pro-apoptotiques, dans les ventricules droits de rats PAB<sup>186</sup>. Ces modifications apparaissent environ 4 semaines après le début d'une augmentation des pressions pulmonaires dans ce modèle expérimental de constriction de l'artère pulmonaire<sup>187</sup>. Également démontré, une activation de p53 (régulateur important du cycle cellulaire ainsi que de l'apoptose et l'autophagie) favorise l'induction de l'apoptose par la diminution de

Bcl-XL(membre de la famille des Bcl-2)<sup>188</sup>. Ces études indiquent que le processus apoptotique est étroitement lié au remodelage ventriculaire droit.

Cette apoptose prononcée dans le ventricule droit en décompensation favorise l'apparition de tissu fibrotique au sein de ce tissu. En effet, lors d'études histologiques sur le modèle expérimental Sugén-Hypoxie, il a été démontré une accumulation de tissu fibrotique au sein du myocarde<sup>170</sup>. Cette accumulation de fibrose est également présente dans le modèle expérimental PAB<sup>189</sup>. Cette fibrose retrouvée dans le ventricule droit participe à l'altération de la fonction cardiaque droite<sup>190</sup>, notamment au niveau de sa contractilité.

### **Contractilité cellulaire**

La contractilité ventriculaire passe essentiellement par la régulation de l'homéostasie calcique intracellulaire. Dans le modèle Sugén-hypoxie, malgré que le ventricule droit subisse des dommages importants (comme de la fibrose ainsi que apoptose) celui-ci est capable d'améliorer sa fonction contractile<sup>188</sup>. Cette amélioration peut être expliquée par la surexpression de protéines contractiles telles que la troponine T et la tropomyosine<sup>188</sup>. La mesure du niveau de troponine permet de déterminer l'atteinte cardiaque droite. En effet, une augmentation du niveau de troponine I dans le plasma de patients est associée à une sévérité importante de la maladie et engage le pronostic vital<sup>191,192</sup>.

D'un point de vue pathologique, les cardiomyocytes s'hypertrophient et présentent une signalisation calcique altérée<sup>193,194</sup>. Au niveau des cellules cardiaques du ventricule droit, l'enzyme SERCA2 (sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase) responsable de l'entrée du calcium dans le réticulum sarcoplasmique se retrouve diminuée dans un modèle expérimental. Il est à noter qu'une voie thérapeutique potentielle par thérapie génique visant à rétablir l'expression de la protéine afin d'améliorer la fonction ventriculaire a été étudiée et semble prometteuse<sup>195,196</sup>. En effet, au niveau du ventricule gauche, cette voie est déjà très étudiée mais au niveau de la fonction ventriculaire droite, l'administration d'un AAV1-SERCA2a a été également étudiée notamment au niveau du modèle monocrotaline<sup>194</sup>.

### **Stress oxydatif et altération de la fonction mitochondriale**

Comme nous le présenterons plus loin, le stress oxydatif est très important en hypertension artérielle pulmonaire. Le ventricule droit démontre une augmentation de celui-ci des suite d'une production accrue d'espèces réactives à l'oxygène (ROS)<sup>197</sup>. Lorsque l'on compare le ventricule droit et le ventricule gauche, nous pouvons noter que celui-ci est beaucoup plus vulnérable aux effets du stress oxydatif que le ventricule gauche<sup>198</sup>. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le ventricule droit n'est pas apte à élever le niveau d'expression de facteurs antioxydants tels que la superoxyde dismutase<sup>199</sup> par exemple.

Rapidement après l'augmentation des pressions plusieurs gènes codant pour des acteurs du stress oxydatif sont surexprimés comme NOX2 (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) oxidase 2)<sup>200</sup>, un puissant générateur de ROS<sup>201</sup>.

L'accumulation de stress oxydatif dans le tissu ventriculaire droit favorise la mort cellulaire et l'accumulation de fibrose ce qui promeut la dilation et la détérioration du ventricule droit<sup>202,203</sup>.

Puisque la mitochondrie est l'organelle majeur dans la production de ces ROS, il a été décrit par la suite plusieurs altérations du niveau d'expression de protéines importantes dans la fonction mitochondriale<sup>204</sup>. C'est le cas de PGC1 $\alpha$  (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), un puissant régulateur de la biogénèse mitochondriale, qui voit son expression diminuée favorisant ainsi l'apparition d'altérations mitochondriales dans le ventricule droit défaillant<sup>205</sup>.

### **Adaptation métabolique**

Un ventricule droit sain puise 60-90% de son énergie dans l'oxydation des acides gras alors que le glucose quant à lui contribue à 10-40% de la production d'ATP<sup>206</sup>.

Durant l'hypertrophie du ventricule droit, afin de maintenir ses fonctions, la demande en énergie est forte ce qui explique l'augmentation de l'assimilation du glucose<sup>207</sup>, que l'on peut observer chez les patients par imagerie<sup>208</sup> mais également dans les modèles animaux<sup>209</sup>. Chez les modèles animaux nous retrouvons une surexpression des enzymes responsables de la voie glycolytique<sup>183,210</sup>. Cependant, étant donné le faible rendement en ATP que génère une molécule de glucose, une plus grande quantité de glucose est nécessaire, ce qui explique

l'augmentation de l'assimilation du glucose que l'on observe chez les patients. De plus, une augmentation de l'assimilation du glucose génère une production de lactate qui va engendrer une acidose altérant la fonction ventriculaire droite.

Cette caractéristique peut être diminuée par l'administration des traitements usuels de l'HTAP<sup>208</sup>. Cependant, quand le ventricule entre en défaillance l'assimilation du glucose diminue<sup>211</sup> puisque le métabolisme mitochondrial se retrouve fortement altéré.

La pyruvate déshydrogénase kinase (PDK), protéine inhibitrice de la pyruvate déshydrogénase (PDH), enzyme responsable de la conversion du pyruvate en acétyl-CoA, se retrouve surexprimée dans le ventricule droit hypertrophié. Lorsque la PDH est inhibée, et donc l'oxydation du glucose, la production d'énergie s'en retrouve réduite<sup>212</sup> et la fonction ventriculaire se retrouve altérée. C'est le cas notamment de la baisse de contractilité observée dans le ventricule droit ainsi que la chute du débit cardiaque<sup>213</sup>. Nous pouvons observer cette inhibition de PDH dans le modèle monocrotaline notamment<sup>214</sup> et une inhibition de la PDK pourrait être une voie thérapeutique envisageable.

Une voie énergétique alternative, la glutaminolyse, permettant la conversion de la glutamine en métabolites nécessaires au cycle de Krebs, permet de soutenir la croissance cellulaire et pourrait être impliquée dans l'hypertrophie ventriculaire<sup>215</sup>. Dans le modèle monocrotaline, nous retrouvons une activation de la glutaminolyse notamment par une surexpression de transporteurs de la glutamine. Il a également été démontré qu'une inhibition de cette voie alternative permettait d'améliorer le débit cardiaque ainsi que l'oxydation du glucose.

Cependant, ces voies semblent soutenir la fonction ventriculaire dans un premier temps mais ne permettent pas de la maintenir dans le temps.

### **Ischémie ventriculaire**

À mesure que la pathologie progresse, la perfusion du ventricule droit diminue au fur et à mesure ce qui peut jouer sur le pronostic vital d'un patient surtout si elle est associée à certains marqueurs de détérioration ventriculaire<sup>191,216</sup>. Cette diminution de perfusion peut être due à une raréfaction capillaire notamment chez les patients atteints d'HTAP associée à une sclérodermie<sup>210</sup>. De façon additionnelle, il a été démontré qu'une diminution de la densité

capillaire était également observée dans le tissu ventriculaire droit dans les modèles animaux<sup>217</sup>.

De plus, l'hypertrophie induit un déséquilibre entre la demande en oxygène croissante et l'apport ce qui pourrait également favoriser l'apparition d'une ischémie myocardique<sup>141</sup>.

Lors de la progression vers une défaillance cardiaque droite, de nombreuses voies cellulaires sont perturbées. C'est notamment le cas de l'angiogenèse qui est diminuée avec une diminution de l'expression de gènes responsables de l'angiogenèse tels que VEGF (vascular endothelial growth factor) et IGF-1 (insulin-like growth factor-1)<sup>207</sup>. Une angiogenèse altérée peut expliquer la présence d'ischémie au sein du tissu ventriculaire droit ainsi que sa détérioration.

Comme nous l'avons présenté précédemment, une élévation du niveau de troponine est retrouvée dans le ventricule droit et peut également indiquer la présence d'une ischémie au sein du tissu. En condition physiologique les pressions basses dans le ventricule droit permettent une bonne irrigation des artères coronaires droites assurant ainsi une bonne perfusion du tissu cardiaque. En revanche, les pressions ventriculaires droites élevées dans la maladie empêchent la perfusion adéquate du tissu et altèrent ainsi la contractilité du ventricule droit<sup>218,219</sup>.

Néanmoins, les causes ou les combinaisons exactes menant à de l'ischémie myocardique sont encore inconnues<sup>170</sup>.

De nombreuses modifications affectent le tissu ventriculaire lors de la progression de l'hypertension artérielle pulmonaire. La perturbation physiologique que ces modifications entraînent favorisent l'apparition d'une défaillance cardiaque droite. La figure 12 récapitule ces modifications. Malgré toutes les études déjà publiées, il subsiste encore à ce jour un manque de connaissances des phénomènes précis à l'origine de la transition d'un statut de compensation cardiaque à une défaillance ventriculaire droite.

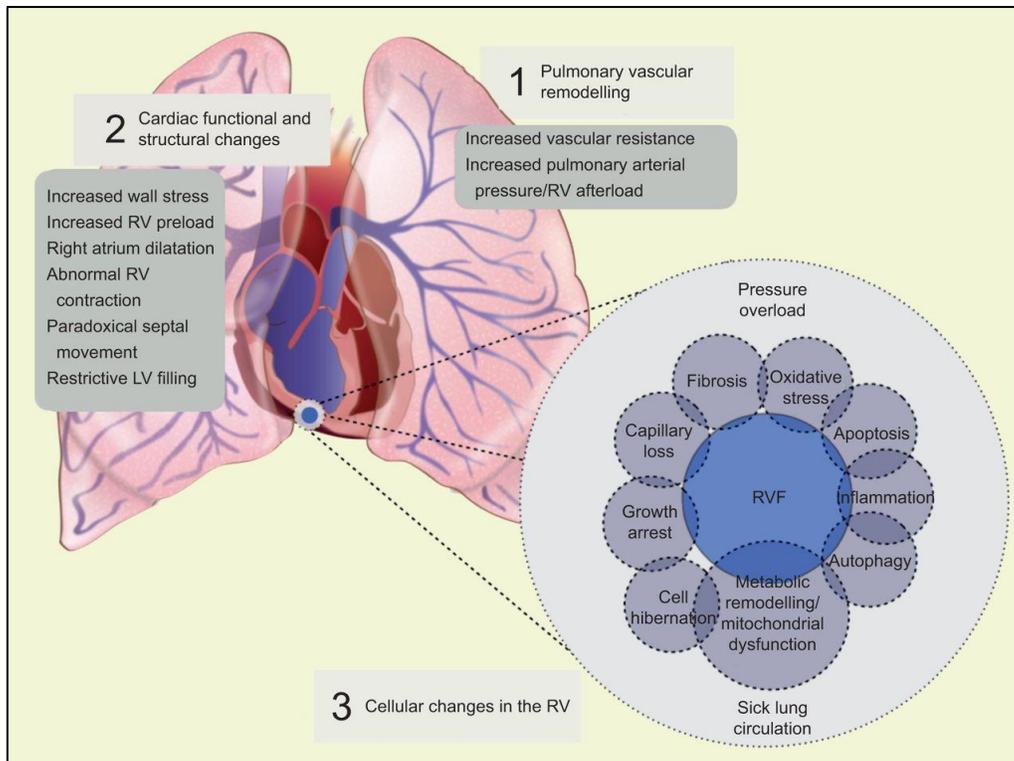


Figure 12. Changements cellulaires dans le ventricule droit.

1. Une résistance vasculaire pulmonaire accrue génère une postcharge importante pour le ventricule droit, entraînant une hypertrophie. 2. Les changements structurels et fonctionnels au cours du développement de l'insuffisance ventriculaire droite peuvent être caractérisés cliniquement. 3. Le dysfonctionnement ventriculaire droit est probablement associé à de multiples changements cellulaires, comme l'inflammation, la fibrose ou encore le stress oxydatif. Figure extraite de<sup>220</sup>.

### 3.4 Altérations moléculaires et cellulaires

#### 3.4.1 Acteurs moléculaires dans l'HTAP

Bien que des thérapies soient utilisées actuellement, celles-ci ne ciblent pas le remodelage vasculaire comme nous le verrons dans la partie « Les thérapies actuelles ». L'avancement des recherches scientifiques sur le sujet a permis, ces dernières années, de mettre en évidence l'implication de plusieurs facteurs dans le développement et la progression de la pathologie. Nous allons passer en revue les différents acteurs décrits dans la physiopathologie de l'HTAP.

## **Les facteurs de croissance**

Plusieurs facteurs de croissance ont été identifiés dans la pathologie par leur capacité à activer des récepteurs tyrosine kinases. L'activation des cascades de signalisation intracellulaires va entraîner la prolifération, la migration ainsi que la survie cellulaire<sup>221</sup>.

### *VEGF*

Dans le groupe des facteurs de croissance, le VEGF (vascular endothelial growth factor) ainsi que son récepteur VEGFR-2 sont tous deux surexprimés dans les poumons de patients HTAP et plus précisément au niveau des lésions plexiformes<sup>222-225</sup>. Ce facteur de croissance possède des propriétés anti-apoptotiques favorisant la survie et le maintien des cellules endothéliales<sup>226-228</sup>. Une exposition à des conditions hypoxiques engendre une augmentation de l'expression du VEGF<sup>226,229</sup>. Une inhibition du récepteur au VEGF, avec le SU5416, favorise l'apoptose des cellules endothéliales<sup>230</sup>. Ces propriétés ont donné lieu à la création d'un modèle expérimental basé sur l'utilisation du SU5416, le modèle Sugén-Hypoxie<sup>228</sup> comme nous le verrons plus loin dans la partie méthodologie.

Cependant, le rôle exact du VEGF dans le développement de la pathologie reste encore à ce jour à élucider puisque les résultats obtenus dans les modèles animaux ne sont pas similaires. En effet, dans le modèle monocrotaline, l'expression du VEGF est diminuée alors que celle-ci est augmentée dans le modèle hypoxique<sup>231</sup>.

### *PDGF*

Le facteur de croissance PDGF (platelet-derived growth factor) ainsi que son récepteur sont surexprimés chez les patients atteints d'HTAP<sup>232-234</sup>. C'est un facteur qui promeut la prolifération, la migration et la survie cellulaire<sup>235</sup>. En effet, le PDGF agit comme un agent mitogène sur les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et favorise leur prolifération<sup>236,237</sup>. Une fois l'un des deux récepteurs (PDGFR- $\alpha$  ou - $\beta$ ) activé par la fixation du PDGF sur celui-ci, plusieurs cascades de signalisation sont activées notamment la voie des MAPK, favorisant la progression du cycle cellulaire entre autres<sup>237</sup>.

L'inhibition du récepteur au PDGF, avec l'imatinib, démontre des effets bénéfiques sur la survie des rats monocrotaline en diminuant le remodelage vasculaire notamment<sup>232,238,239</sup>.

### *TGF & bFGF*

D'autres facteurs de croissance tels que le TGF- $\alpha$  membre de la famille des EGF (facteurs de croissance épidermique) et le bFGF (facteur de croissance des fibroblastes basique) ont été étudié dans la pathologie. La surexpression du TGF- $\alpha$  favorise la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et induit le développement de la pathologie dans un modèle murin<sup>240,241</sup>. L'inhibition des récepteurs atténue l'hypertension artérielle pulmonaire dans le modèle monocrotaline<sup>241,242</sup> mais ne semble pas être efficace sur un modèle murin d'hypoxie HTAP<sup>242</sup>.

Le bFGF est un membre de la famille des FGF (facteurs de croissances des fibroblastes) surexprimé dans le modèle monocrotaline au niveau pulmonaire<sup>243</sup>. L'inhibition de la voie de signalisation des récepteurs au FGF démontre un effet bénéfique dans ce modèle expérimental avec une diminution de la prolifération et de la survie cellulaire au niveau pulmonaire<sup>243</sup>.

### **Les modulateurs du tonus vasculaire**

L'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires est la résultante combinée d'un remodelage vasculaire ainsi qu'une constriction importante des artères pulmonaires. Comme nous l'avons mentionné précédemment, les cellules endothéliales sont responsables de la sécrétion d'agents modulant le tonus vasculaire tel que l'endothéline 1 ou encore l'oxyde nitrique. Il a été démontré que l'oxyde nitrique diminue l'activité de la petite GTPase : RhoA. Cette diminution de l'activité de RhoA inhibe la prolifération des cellules musculaires lisses<sup>244</sup>. Chez les patients HTAP, on note une diminution de l'oxyde nitrique favorisant ainsi la prolifération des cellules musculaires lisses mais aussi une constriction soutenue (diminution de son pouvoir vasodilatateur). L'activation de la voie de signalisation impliquant RhoA a été décrit dans la régulation du tonus vasculaire<sup>245</sup>.

En plus de son rôle dans le tonus vasculaire, l'endothéline 1 a été également décrite dans la prolifération des cellules musculaires lisses des artères musculaires par son activation de la voie des MAPK (mitogen-activated proteine kinase)<sup>246,247</sup>.

Rappelons qu'à l'heure actuelle, les traitements actuels visent ce tonus vasculaire afin d'améliorer les conditions de vie des patients HTAP.

## Les canaux ioniques

Beaucoup de voies cellulaires reposent sur l'équilibre ionique intra et extracellulaire. En 2013, six mutations ont été identifiées sur le gène KCNK3 (Potassium channel subfamily K member 3) codant pour le canal potassium TASK-1 (TWIK-related acid sensitive K<sup>+</sup> channel 1)<sup>248,249</sup>. Au cours des années d'autres mutations ont été découvertes chez des patients HTAP<sup>249-251</sup>.

D'un point de physiologique, les canaux potassiques sont responsables du maintien du potentiel de membrane négatif (membrane hyperpolarisée). Une diminution de l'activité des canaux potassiques favorise la dépolarisation membranaire et induit une entrée de calcium intracellulaire par l'intermédiaire des canaux calciques voltage dépendant activés par la dépolarisation<sup>252,253</sup>. Cette entrée de calcium dans la cellule induit une constriction (activation de la kinase myosine chaîne légère MLCK) et promeut la prolifération par l'activation de voies sensibles au calcium (par exemple CaMK, MAPK) ou du cycle cellulaire<sup>252</sup>. Une diminution du niveau d'expression des canaux TASK-1 favorise la dépolarisation membranaire dans les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires<sup>254</sup>. D'autres canaux potassiques sont retrouvés altérés dans l'HTAP tels que les canaux K<sub>v</sub>1.5<sup>255,256</sup>. Dans les modèles expérimentaux hypoxique et monocrotaline, la dépolarisation membranaire est principalement expliquée par une diminution des canaux TASK-1 et K<sub>v</sub>1.5<sup>257,258</sup>.

En dehors des canaux potassiques, de nombreux canaux calciques (Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> et Cl<sup>-</sup>) ont été associés à l'HTAP<sup>259</sup>. Des canaux calciques responsables de l'homéostasie calcique peuvent être ciblés par des thérapies médicamenteuses visant à inhiber leur fonction et diminuer ainsi la constriction artérielle<sup>259</sup>. Il est à noter que certains canaux calciques voltage-dépendant peuvent être positivement régulés par certains médiateurs retrouvés dans l'HTAP notamment l'endothéline 1 et l'angiotensine II<sup>260,261</sup>.

SERCA2a (sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase 2a), un régulateur important de l'homéostasie calcique intracellulaire dans les cellules musculaires vasculaires puisqu'il permet de maintenir la concentration calcique cytoplasmique basse en séquestrant le calcium dans le réservoir sarcoplasmique<sup>262</sup>. L'expression de celui-ci se retrouve diminuée en HTAP chez l'humain mais également dans le modèle expérimental monocrotaline<sup>194</sup>. Celui-ci a été

décrit comme un régulateur négatif de l'activation des facteurs de transcription STAT3 et NFAT. En effet, la surexpression de SERCA2a dans des CMLAPs-HTAP diminue de façon très significative leur prolifération<sup>194</sup>. Également au niveau des cellules endothéliales HTAP, SERCA2a régule la migration ainsi que la prolifération de celles-ci. Une intervention thérapeutique par l'administration intratrachéale d'AAV1-SERCA2a permet d'améliorer de façon significative la maladie induite chez un modèle monocrotaline<sup>194</sup>.

### **Les facteurs de transcription**

Plusieurs facteurs de transcription sont impliqués dans la pathogénèse de l'hypertension artérielle pulmonaire. Nous allons mettre en évidence les facteurs les plus étudiés en HTAP.

#### *STAT3*

Le facteur de STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3) est un acteur important durant l'embryogenèse puisque sa délétion est létale<sup>263</sup>. Une altération de l'expression de STAT3 engendre de multiples défauts cellulaires notamment au niveau des processus de migration, de survie et de prolifération cellulaire<sup>264</sup>. Son rôle prépondérant dans les processus prolifératifs lui a valu une étude approfondie au niveau des cancers<sup>265,266</sup> qui a démontré que celui-ci pouvait être une cible thérapeutique<sup>267-269</sup>. En plus de son implication dans les processus prolifératifs, celui-ci agit également au niveau des processus inflammatoire et au niveau de l'immunité<sup>270,271</sup>.

Son implication dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire fut soulevé en 2007<sup>109</sup> avant d'être approfondie les années suivantes. En effet, celui-ci a été décrit comme un acteur central de la prolifération des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP<sup>245,272</sup>.

Tout d'abord d'un point de vue de la régulation de STAT3 dans la pathologie, celui-ci se trouve être régulé par plusieurs groupes de molécules dont certains facteurs de croissance tels que le PDGF<sup>273,274</sup> ou bien encore certaines cytokines telles que l'IL-6<sup>274-276</sup> (figure 13). Ces molécules comme nous avons pu le présenter précédemment sont très impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP.

Puis de nombreuses cibles de ce facteur ont été découvertes au fil des recherches et les principales sont présentées dans la figure ci-dessous.

Dans un premier temps celui-ci peut altérer négativement l'expression de la NO synthase endothéliale responsable initialement de la production d'oxyde nitrique diminuant ainsi la concentration de celui-ci<sup>277</sup>.

Parmi les cibles de STAT3 dans l'hypertension artérielle pulmonaire, nous retrouvons Pim1 (Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus), une protéine kinase agissant comme un pro-oncogène étudié notamment au niveau du cancer<sup>278-280</sup>.

Pim1 est surexprimé chez les patients HTAP notamment au niveau de leurs poumons et plus précisément au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>281</sup>. D'un point de vue fonctionnel, Pim1 dans l'HTAP permet de réguler la réparation de l'ADN ayant subi des dommages (nous traiterons des dommages à l'ADN dans un paragraphe ultérieur). De plus, le niveau d'expression de Pim1 corrèle avec le niveau de sévérité de la pathologie<sup>282</sup> faisant de cette protéine un marqueur intéressant dans la détection de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Le facteur de transcription STAT3, par l'intermédiaire de Pim1 peut réguler l'expression de NFATc2 (nuclear factor of activated T-cells)<sup>283,284</sup>. Ce facteur de transcription a tout d'abord été décrit dans la régulation négative des canaux potassiques<sup>285</sup> entraînant une dépolarisation membranaire subséquente favorisant la prolifération cellulaire<sup>286</sup>. De plus, l'activation de NFATc2 permet la surexpression de Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), protéine capable d'inhiber l'apoptose par l'hyperpolarisation de la mitochondrie<sup>285,286</sup>.

De façon intéressante, le facteur NFATc2 a été démontré pouvant être également régulé par l'endothéline 1<sup>287</sup>, qui rappelons-le est surexprimée dans la pathologie.

Dans la catégorie des protéines impliquées dans la survie cellulaire, il a été décrit que l'inhibition de STAT3 entraînait la diminution de l'expression de survivin. Survivin étant un membre de la famille des protéines inhibitrices de l'apoptose étant démontré dans l'HTAP<sup>288,289</sup>. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de KLF5 (Krüppel-like factor 5), un facteur de transcription également impliqué dans la pathologie<sup>290</sup> comme nous pourrions le voir ci-après.

Le facteur de transcription STAT3 représente un élément central dans la régulation de plusieurs protéines impliquées dans le développement de l'HTAP (figure 13). L'inhibition de STAT3 par le DHEA permet de reverser la pathologie en agissant sur les différentes cibles de STAT3<sup>291</sup>.

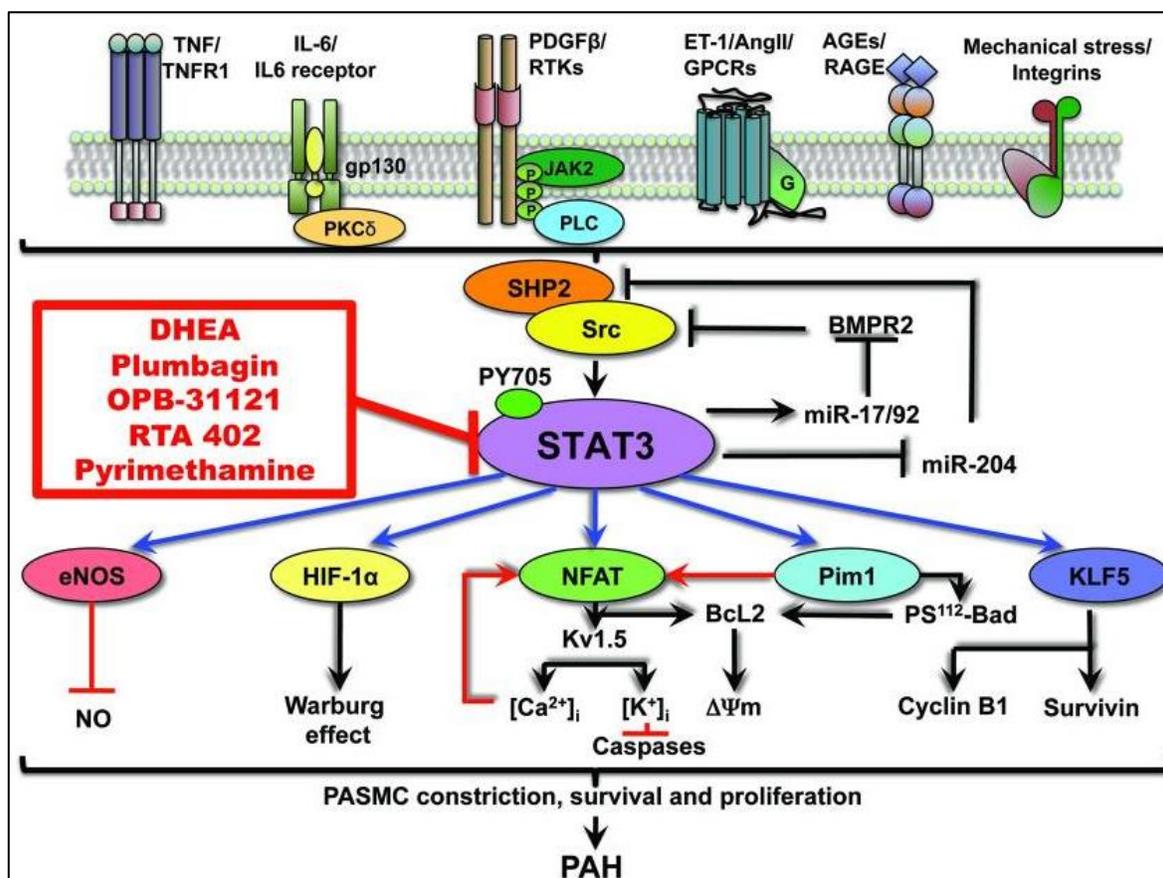


Figure 13. Implication de STAT3 en hypertension artérielle pulmonaire.

STAT3 est activé en réponse à des cytokines, des facteurs de croissance dérégulés en HTAP. STAT3 active de multiples facteurs de transcription et protéines jouant un rôle dans le processus prolifératif et anti-apoptotique. Plusieurs inhibiteurs de STAT3 (en rouge), dont certains sont en phase d'étude clinique, pourraient être bénéfiques pour le traitement de l'HTAP. Figure extraite de<sup>292</sup>.

### FOXM1

Le facteur de transcription FOXM1 (Forkhead box M1) favorise la régulation de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN mais également dans le cycle cellulaire et la survie<sup>293,294</sup>. Ce facteur a été étudié au niveau du développement de tumeurs puisque celui-ci

régule de multiples processus biologiques<sup>295</sup>. Une mauvaise régulation de ce facteur que ce soit au niveau transcriptionnel ou post transcriptionnel affecte sa fonction et favorise le développement de cancers<sup>295</sup> ainsi que le développement métastatique<sup>296</sup>. Ces données font de ce facteur une cible préférentielle pour ralentir la prolifération cellulaire cancéreuse<sup>263</sup>.

Une étude réalisée dans notre laboratoire a démontré pour la première fois en 2017 que FOXM1 était impliqué en HTAP. En effet, celui-ci se retrouve surexprimé chez les patients HTAP notamment dans leur tissu pulmonaire et plus précisément dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. De plus, l'étude a mis en évidence que celui-ci est régulé par un microARN décrit précédemment dans la pathologie, miR-204<sup>297</sup> comme nous le verrons dans la section « régulation épigénétique ». Notre étude a démontré que l'inhibition pharmacologique de FOXM1 diminue drastiquement la prolifération et de la survie des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP<sup>298</sup>. Cet effet passe par une diminution des mécanismes de réparation de l'ADN ainsi qu'une diminution du facteur de survie cellulaire survivin. Enfin, nous avons démontré un effet thérapeutique bénéfique lors de l'inhibition de FOXM1 dans des modèles expérimentaux.

Par la suite, deux études menées en 2018 ont confirmé le rôle de FOXM1 dans la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>299,300</sup>. En effet, les études démontrent que la délétion spécifique de FOXM1 dans les cellules musculaires lisses protège les modèles expérimentaux du développement d'une hypertension artérielle pulmonaire après l'induction de la pathologie.

Cela démontre que ce facteur de transcription joue un rôle prépondérant dans le développement de la pathologie qui pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique.

#### *HIF-1 $\alpha$*

Le facteur HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) représente un régulateur hautement conservé permettant la régulation et le maintien de l'oxygène cellulaire. En ce sens, celui-ci est impliqué dans plusieurs voies cellulaires telles que l'angiogenèse, la prolifération et la viabilité cellulaire<sup>301</sup>.

Lorsqu'on s'intéresse au rôle de ce facteur dans les cancers pulmonaires plus spécialement, une surexpression de ce facteur est associée à un pronostic vital engagé<sup>302</sup>.

La mise en hypoxie permet d'activer HIF-1 $\alpha$  afin que celui-ci puisse activer la transcription de gènes permettant aux cellules de s'adapter à la diminution du niveau d'oxygène<sup>303,304</sup>. Parmi ses cibles, nous retrouvons le VEGF<sup>305</sup> ainsi que son récepteur VEGFR<sup>306</sup> ou bien encore l'endothéline 1<sup>307</sup>. De plus, celui-ci peut également réguler des gènes impliqués dans la gestion énergétique cellulaire<sup>308,309</sup>.

En ce sens, HIF-1 $\alpha$  joue un rôle prépondérant dans le développement tumoral et l'invasion métastatique tout comme dans le shift métabolique observé dans les cellules cancéreuses<sup>308,309</sup>. De plus, HIF-1 $\alpha$  peut également être régulé par STAT3 dans des cellules cancéreuses<sup>310</sup>.

De par sa fonction de facteur de transcription et son lien avec l'homéostasie de l'oxygène, de nombreuses études se sont intéressées à son implication notamment aux niveaux de pathologies pulmonaires telles que les pathologies obstructives<sup>311</sup>, associées à une hypoxie ou bien l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>312</sup>.

L'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les poumons des patients HTAP est augmentée comparativement à des sujets sains<sup>313</sup>. Au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, HIF-1 $\alpha$  joue un rôle important notamment au sein des modèles expérimentaux exposés à une hypoxie<sup>314</sup>. En effet, ce facteur favorise le remodelage vasculaire lors d'une exposition à une hypoxie chronique<sup>315</sup>. L'activation d'HIF-1 $\alpha$  engendre la diminution de Kv1.5 dans le modèle FHR (fawn hooded rat) qui développe une HTAP spontanée avec l'âge<sup>316</sup>.

Une inhibition de ce facteur de transcription atténue le remodelage vasculaire après une mise en hypoxie chez un modèle expérimental<sup>315</sup>.

### *KLF5*

Le facteur de transcription KLF5 (krüppel-like factor 5) comme nous l'avons mentionné précédemment a également été décrit dans la pathologie<sup>290</sup>. Ce facteur de transcription se retrouve surexprimé dans les tissus pulmonaires de patients HTAP notamment au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>317</sup>. Son activation peut être induite par de multiples acteurs déjà connus dans la pathologie tel que l'endothéline 1, le PDGF ou bien encore l'interleukine 6<sup>317</sup>. Il a été démontré que son activation induit la surexpression de la

protéine survivin ainsi que la cycline B1. Comme nous l'avons mentionné précédemment, survivin est une protéine importante dans la survie cellulaire et donc leur résistance à l'apoptose. La cycline B1 est un régulateur important du cycle cellulaire favorisant l'entrée en mitose<sup>318,319</sup> et par conséquent la prolifération cellulaire<sup>320,321</sup>. Comme nous l'avons mis en évidence plus haut, KLF5 est régulé également par le facteur de transcription STAT3. Lors d'une intervention thérapeutique sur le modèle expérimental monocrotaline, l'inhibition de STAT3 et par conséquent de KLF5 en aval démontre une amélioration des paramètres hémodynamiques des rats malades.

Dans le modèle expérimental hypoxique, KLF5 se retrouve surexprimé et son inhibition permet d'atténuer la pathologie en diminuant la capacité de prolifération et la résistance à l'apoptose des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>322</sup>. Les résultats de cette étude sur le modèle animal corroborent les résultats impliquant la cycline B1 et survivin.

### **Autres acteurs moléculaires importants en HTAP**

#### *BMPR2*

Le récepteur BMPR2 (Bone morphogenetic protein receptor 2) est un récepteur se liant aux ligands appartenant à la grande famille des récepteurs au TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ). Comme nous l'avons mentionné précédemment, les mutations sur le gène BMPR2 sont retrouvés chez plus de 80% des patients présentant une HTAP héréditaire<sup>323-326</sup>. Un peu plus de 140 mutations ont été également découvertes dans certains cas d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique<sup>327</sup>. Le récepteur BMPR2 est une sérine/thréonine kinase sur laquelle plusieurs ligands peuvent venir se fixer, notamment BMP2, BMP4 ou encore BMP7<sup>327</sup>.

Dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, le récepteur permet l'inhibition de la croissance cellulaire<sup>328</sup>. De ce fait, au sein de ces cellules, une diminution de la voie de signalisation entraîne une levée de l'inhibition de la croissance cellulaire et favorise ainsi une prolifération anormale de ces cellules<sup>329</sup>.

Dans des conditions non pathologiques, l'activation du récepteur BMPR2 se traduit par une activation de la voie impliquant les protéines Smad<sup>330</sup>. Certaines études ont démontré que des altérations de la voie de signalisation Smad pouvaient induire des lésions au niveau des artères pulmonaires, ressemblant à ce qui peut être observé dans l'HTAP<sup>331,332</sup>.

Il a été démontré qu'une perte de l'expression de BMPR2 engendrait une perte d'expression de Kv1.5 et une sur expression de BMPR2 rétablit l'expression de Kv1.5<sup>333,334</sup>. Étant donné le rôle de BMPR2 dans l'induction de l'apoptose, par l'intermédiaire de la régulation de bcl2, il a été démontré qu'une surexpression de bcl2 diminue l'expression de Kv1.5<sup>335</sup>.

De façon très intéressante, une étude a démontré un effet bénéfique d'une thérapie génique permettant de restaurer l'expression du récepteur BMPR2 dans le modèle expérimental monocrotaline<sup>336</sup>.

Bien que les recherches se soient principalement intéressées au rôle de BMPR2, il est à noter le rôle de la voie de signalisation impliquant la famille des TGF- $\beta$ . En effet, la famille des TGF- $\beta$  est impliquée dans le remodelage vasculaire ainsi que dans l'hypertrophie et la fibrose cardiaque<sup>337-339</sup>. Certains ligands de cette famille se retrouvent de façon abondante au niveau des lésions plexiformes dans les artères pulmonaires HTAP<sup>222</sup>. La perte du récepteur BMPR2 favorise l'activation de la voie TGF- $\beta$  dans le milieu favorisant ainsi la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires et ainsi promeut le remodelage vasculaire par une activité pro-inflammatoire<sup>340-342</sup>.

#### *PPAR $\gamma$*

Le récepteur nucléaire PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) est exprimé dans plusieurs tissus notamment au niveau des cellules endothéliales vasculaires ainsi que des cellules musculaires lisses vasculaires<sup>343</sup>. La famille de récepteurs PPARs est impliquée dans de multiples voies cellulaires allant de la lipogenèse à l'inflammation<sup>344</sup>. L'activation de ces récepteurs se fait par des protéines pouvant modifier la structure de la chromatine par une acétylation ou une méthylation de certaines histones permettant ainsi de réguler l'expression de certains gènes cibles<sup>345,346</sup>.

En 2003, une équipe a mis en évidence une diminution de l'expression de PPAR $\gamma$  dans les poumons des patients atteints d'une hypertension pulmonaire sévère mais également au niveau des modèles expérimentaux<sup>347</sup>. Une délétion spécifique de PPAR $\gamma$  dans les cellules musculaires lisses ou encore dans les cellules endothéliales favorise le développement de l'HTAP dans des modèles murins<sup>348,349</sup>. Une délétion totale de PPAR $\gamma$  dans des souris

démontre le rôle primordial de ce récepteur dans le développement puisque que la délétion totale engendre un décès prématuré de l'animal<sup>350</sup>.

De plus, l'activation du récepteur permet de diminution le niveau d'endothéline 1<sup>351</sup>. Également, il a été démontré qu'une activation de PPAR $\gamma$  permet d'augmenter le niveau d'activité de la NO synthase endothéliale<sup>352,353</sup> favorisant la libération de NO et ainsi diminuer le tonus vasculaire<sup>354</sup> ainsi que le niveau de prolifération des cellules musculaires lisses<sup>355</sup>.

En dehors de ces deux acteurs, de nombreuses études semblent démontrer que PPAR $\gamma$  peut également réguler des cibles pro-prolifératives de la voie du PDGF<sup>356,357</sup>.

De plus, il est décrit que PPAR $\gamma$  est un acteur important dans les réponses anti-inflammatoires<sup>358</sup>, l'utilisation d'agoniste de ce récepteur démontre une atténuation de l'inflammation<sup>359</sup> ainsi que des effets bénéfiques dans des modèles expérimentaux<sup>360,361</sup>. De plus, stimuler PPAR $\gamma$  par l'utilisation de ligands diminue la prolifération cellulaire ainsi que le remodelage vasculaire dans le modèle monocrotaline<sup>362</sup>. D'autres études *in vivo* ont également mis en évidence un effet bénéfique de l'administration d'agoniste du récepteur dans l'atténuation de la pathologie<sup>363,364</sup>. À ce jour, aucune étude chez les patients HTAP n'a été menée cependant des études menées dans d'autres pathologies n'ont démontré aucun effet secondaire notable à la prise d'agonistes de PPAR $\gamma$ <sup>365,366</sup>.

### *Notch-3*

Tout au long du réseau vasculaire pulmonaire nous retrouvons l'expression de plusieurs membres de la famille des récepteurs Notch (Notch1-4)<sup>367</sup>.

Ces récepteurs, une fois le ligand fixé, peuvent former des complexes transcriptionnels permettant de réguler plusieurs gènes cibles<sup>368</sup>. En effet, après activation des récepteurs, une translocation au noyau des domaines intracellulaires permet à ceux-ci de former des complexes avec des protéines se liant à l'ADN<sup>369</sup>.

La voie de signalisation de ces récepteurs est essentiellement impliquée au niveau vasculaire notamment dans le développement des vaisseaux mais aussi la différenciation des cellules musculaires lisses<sup>370</sup>.

Chez les patients atteints d'HTAP il a été observé une surexpression de Notch-3 au niveau de leur tissu pulmonaire<sup>371</sup>. De plus, le niveau de sévérité de la pathologie coïncide avec le

niveau d'expression de Notch-3 aussi bien dans les modèles expérimentaux que chez les patients HTAP<sup>327</sup>.

Le récepteur Notch-3 promeut la prolifération des cellules musculaires lisses au niveau vasculaire<sup>372</sup> et est préférentiellement exprimé au niveau des cellules musculaires lisses chez l'humain et les rongeurs<sup>373</sup>. De façon intéressante, celui-ci a été démontré comme étant un régulateur direct du PDGF- $\beta$ <sup>374</sup>, facteur de croissance impliqué dans la pathologie comme nous l'avons présenté précédemment.

L'inhibition de Notch-3 permet d'atténuer l'hypertension pulmonaire induite par une hypoxie dans un modèle expérimental<sup>371</sup>. Cette étude a démontré également qu'une délétion de Notch-3 chez des souris les rend résistantes au développement de la pathologie<sup>371</sup>.

#### *Sérotonine, ses récepteurs et ses transporteurs*

La sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) est un neurotransmetteur très bien connu notamment au niveau de ses fonction modulatrices cérébrales<sup>375</sup>. En effet, de nombreuses thérapies ciblent celle-ci dans le domaine psychiatrique et neurologique. Les récepteurs de ce neurotransmetteur sont au nombre de 15 et se retrouvent exprimés aussi bien au niveau cérébral qu'un peu partout dans l'organisme<sup>376</sup>. En dehors de son rôle cérébral, la sérotonine permet de réguler de nombreuses fonctions biologiques notamment au niveau pulmonaire et cardiovasculaire. Au niveau pulmonaire, la sérotonine permet de contrôler la respiration<sup>377</sup>.

Dans des processus pathologiques, tels que le cancer, la sérotonine est associée à la migration cellulaire ainsi qu'au développement métastatique<sup>378,379</sup>. Les récepteurs de la sérotonine, notamment les récepteurs 5-HT1A, 5-HT1B<sup>380</sup> ; 5-HT2B<sup>381</sup> et 5-HT4<sup>382,383</sup>, sont également sources d'un dérèglement de la prolifération<sup>380</sup>. En effet, l'inhibition de la recapture de la sérotonine favorise l'élévation de la concentration de celle-ci potentialisant ainsi ses effets<sup>384</sup>. En HTAP, la concentration de sérotonine ainsi que ses transporteurs se retrouvent augmentés et cela a été étroitement lié au développement de la pathogenèse<sup>385,386</sup>. La concentration élevée de celle-ci promeut une vasoconstriction soutenue notamment au niveau d'un modèle expérimentale de la maladie<sup>387</sup>. Dans la maladie, au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, les transporteurs de la sérotonine sont exprimés de façon

abondante<sup>388</sup>. Il a été démontré qu'une augmentation de l'expression de ces transporteurs aggrave l'hypertension artérielle pulmonaire induite par une hypoxie dans un modèle murin<sup>389</sup>. Lorsque la surexpression est spécifiquement induite dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, nous observons une aggravation de la pathologie chez les souris<sup>390</sup>.

De façon complémentaire, il a été décrit qu'une déficience en transporteurs permet une diminution de la sévérité de la pathologie dans un modèle murin<sup>389</sup>. De façon similaire, une inhibition des transporteurs de la sérotonine peut inhiber le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire dans un modèle expérimentale<sup>391</sup>. De façon intéressante, la perte de BMPR2 favorise la prolifération en les rendant plus sensibles aux signaux pro-prolifératifs<sup>392</sup>. Comme nous l'avons énoncé précédemment, la perte de BMPR2 est étroitement liée au développement de la pathologie, rendant ainsi les patients plus sensibles aux effets de la sérotonine.

Lorsque l'on s'intéresse aux divers récepteurs de la sérotonine, seuls les récepteurs 5HT1B ainsi que 5HT2B semblent être d'intérêt dans la pathologie. En effet, le récepteur 5HT1B favorise la constriction vasculaire des artères pulmonaires<sup>393</sup> et a été démontré comme acteur participant au développement de l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>394,395</sup>.

Le récepteur 5HT2B est associé au développement d'une hypertension induite par une hypoxie, puisqu'en effet, l'induction de l'hypertension pulmonaire se retrouve inhibée lorsque ce récepteur est délété<sup>396</sup>.

Finalement, les données récoltées sur le neurotransmetteur l'impliquent dans le développement de la pathologie faisant de celui-ci une cible thérapeutique envisageable.

### 3.4.2 Les modifications épigénétiques

L'épigénétique réfère aux modifications du phénotype ou de l'expression génique sans aucune altération de la séquence de l'ADN. Ces modifications peuvent être acquises ou bien provenir du bagage héréditaire. Depuis quelques années, les modifications épigénétiques sont de plus en plus associées à diverses pathologies et commencent à être reconnues dans le développement et la progression de l'HTAP<sup>397-401</sup>.

Il existe trois grands mécanismes de régulations épigénétiques : la méthylation des îlots CpG par des ADN méthyltransférases, des modifications des histones et les ARN interférents (figure 15).

Ces modifications sont le résultat de l'action d'un groupe d'enzymes nommé « writers » permettant de déposer des groupements modifiant la structure de l'ADN et des histones. Parmi ces « writers » nous avons notamment des enzymes responsables de la méthylation ou de l'acétylation que nous présenterons ci-après.

Les modifications sont reconnues par des protéines appartenant au groupe des 'readers'. Ces readers se fixent sur les modifications et permettent de médier la réponse biologique inhérente, tel que le facteur BRD4 que nous allons présenter plus bas.

Enfin, le groupe des 'erasers' comprend des protéines capables d'effacer les modifications<sup>402</sup>, tel que les déméthylases ou les déacétylases.

Toutes ces modulations épigénétiques sont à l'origine d'altérations de l'expression de protéines, favorisant le maintien de l'hyper-prolifération et la résistance à l'apoptose des CMLAPs et ce même *ex vivo*. Nous nous proposons ici de passer en revue les trois mécanismes de modifications épigénétiques et d'en présenter les liens avec le développement et la progression de l'HTAP. Ensuite nous nous attarderons sur le facteur BRD4, « reader » d'intérêt décrit en HTAP.

### **La méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN est l'une des modifications épigénétiques les mieux caractérisées dans la littérature. Un groupement méthyle est transféré, par une ADN méthyltransférase, sur un résidu cytosine (C) d'une séquence CpG (cytosine-guanine) au niveau de l'ADN<sup>403</sup>. Cette méthylation des résidus cytosines peut soit réprimer la transcription soit l'activer selon l'ADN méthyltransférase. C'est un processus physiologique qui participe à plusieurs régulations cellulaires telles que la différenciation ou bien la protection du génome<sup>404</sup>.

Les séquences CpG sont souvent présentes au niveau des promoteurs et peuvent subir une hyperméthylation conduisant à la répression de gènes<sup>405</sup>, notamment des gènes suppresseurs

de tumeurs et ainsi favoriser l'apparition de cancer<sup>406,407</sup>. Le groupement méthyle empêche la reconnaissance de l'ADN et perturbe la fixation des facteurs de transcription<sup>408</sup>. En revanche, leur hypométhylation peut induire un manque de répression d'oncogènes engendrant leur surexpression<sup>409-411</sup>.

Environ 70% des séquences CpG sont méthylées au sein du génome humain mais cependant certaines ne sont pas regroupées pour former les îlots CpGs<sup>412</sup>.

Les ADN méthyltransférases ont un rôle de maintien du niveau de méthylation de l'ADN et de méthylation de *novo*<sup>401</sup>. Dans cette famille d'enzymes, nous retrouvons notamment les DNMTs (DNA methyltransferase) 1, 3a et 3b.

En HTAP, une possible origine du dysfonctionnement des cellules endothéliales pourrait provenir d'une diminution de la régulation de ABCA1 (ATP-binding cassette), impliqué dans les processus métaboliques (régulation lipidique), comme l'a été démontré dans une récente étude datant de 2017<sup>413</sup>. Il a été démontré qu'une altération de l'expression de ABCA1, par l'hyperméthylation de son promoteur, pouvait favoriser l'inflammation et l'apoptose, deux processus impliqués dans l'HTAP. Un traitement, *in vivo* dans un modèle expérimental, permettant d'activer ABCA1 permet d'améliorer la condition des rats malades<sup>413</sup>.

Une autre étude parue en 2010 démontre qu'une hyperméthylation du gène de la superoxyde dismutase 2 (SOD2), contrôlant la production endogène de peroxyde d'hydrogène, induisait la diminution de son expression<sup>414</sup>. Un traitement visant à inhiber l'activité des ADN méthyltransférases 1 et 3B, par la décitabine, induit une déméthylation du gènes SOD2 et donc une augmentation de l'expression de la protéine se traduisant par une diminution de la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>414</sup>. SOD2 étant un gène tumoro-suppresseur<sup>415</sup> se retrouve réprimé dans plusieurs cancers tel que le cancer du sein<sup>416</sup>.

Comme nous l'avons mentionné la méthylation de l'ADN joue un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. En HTAP, une enzyme responsable de la déméthylation de l'ADN : TET2 (Tet-methylcytosine-dioxygenase-2) présente des mutations favorisant le remodelage vasculaire et l'inflammation engendrant le développement de la maladie<sup>417</sup>. Le profil inflammatoire que développent les souris délétées est caractérisé par une augmentation

de l'interleukine IL-1 $\beta$ . Le traitement de ces souris avec un anticorps ciblant cette interleukine améliore les paramètres hémodynamiques<sup>417</sup>.

### **Modification d'histones**

Les histones sont les structures permettant la formation des nucléosomes contribuant ainsi à exposer l'ADN à la machinerie de transcription. Chaque nucléosome comprend environ 146 paires de base enroulées sur un octamère d'histones<sup>418</sup>.

Les histones sont au nombre de quatre : H2A, H2B, H3 et H4. La modification d'histones jouent un rôle prépondérant dans les processus de réparation de l'ADN ou bien encore la structure de la chromatine<sup>419,420</sup>.

Ces modifications épigénétiques incluent l'acétylation, la méthylation, l'ubiquitination, la ribosylation, la biotinylation, la sumoylation ou bien encore la ribosylation poly-ADP<sup>421-423</sup>. Cependant, l'acétylation et la méthylation représentent les modifications épigénétiques les plus fréquentes.

#### *L'acétylation*

L'acétylation est la modification épigénétique réversible où un groupement acétyle est transféré sur des résidus lysine des histones<sup>424</sup>. Cette réaction est prise en charge par des histones acétyltransférases (HATs) utilisant de l'acétyl-CoA comme cofacteur<sup>401,425</sup>. Une augmentation de l'acétylation d'histones est associée à une augmentation de la transcription<sup>401</sup>, due à un relâchement du lien entre l'ADN et les histones. Ce relâchement est la résultante de la neutralisation de la charge positive des résidus lysines par le transfert d'un groupement acétyle<sup>424</sup>.

En revanche, la désacétylation, par les histones désacétylases (HDACs), est associée à une répression de la transcription en jouant sur la compaction de la chromatine<sup>426-428</sup>. Il existe une balance bien régulée entre les deux processus permettant de contrôler ainsi l'expression de multiples cibles<sup>429</sup>.

Au sein de la pathologie, de nombreuses études ont démontré l'implication de ces modifications épigénétiques<sup>430</sup>. Par exemple, la diminution de la désacétylase mitochondriale SIRT3 inhibe la fonction mitochondriale et de ce fait favorisait le développement de l'HTAP dans un modèle murin<sup>431</sup>.

Il a aussi été démontré que l'inhibition de désacétylases permettaient de diminuer la prolifération cellulaire et d'améliorer ainsi les pressions pulmonaires<sup>430,432-435</sup>. En effet, au sein de notre laboratoire il a également été démontré que l'histone désacétylase HDAC6 était surexprimée dans les CMLAPs-HTAP<sup>433</sup>. Son inhibition permet de diminuer la prolifération et la survie cellulaire des CMLAPs HTAP *in vitro* et *in vivo* dans les modèles sugen – hypoxie et MCT, favorisant une amélioration des paramètres hémodynamiques.

Il existe donc un lien tangible entre l'acétylation et l'HTAP puisqu'il a été décrit par exemple qu'une augmentation de l'acétylation de l'histone H3 au site promoteur du gène codant pour l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) pouvait jouer sur l'expression de celui-ci<sup>436</sup>.

#### *La méthylation*

La méthylation des histones est aussi une modification réversible tout comme l'acétylation. Celle-ci peut jouer sur la compaction de la chromatine et aussi modifier l'expression de gènes dépendamment de la localisation de la méthylation. La réaction se fait par un transfert d'un ou plusieurs groupements méthyles sur des résidus lysine ou arginine<sup>437,438</sup>. Chaque résidu peut ainsi être mono-di ou tri-méthylé et recevoir un, deux ou trois groupements méthyles<sup>401,421,424,425</sup>.

Cette réaction enzymatique implique des histones méthyltransférases (HMTs) ainsi qu'un donneur de groupement méthyle, le S-adenosyl méthionine (SAM)<sup>438-440</sup>. La réaction enzymatique passe par le domaine SET ou bien par le domaine Dot1 des histones méthyltransférases<sup>441,442</sup>.

Dans la littérature, il a été démontré que la méthylation pouvait avoir lieu au niveau d'histones mais aussi des protéines autre qu'histones<sup>438,443</sup>.

La déméthylation par des histones déméthylases, telles que les amine oxydases et les Jumonji C (JmjC) dioxygénases<sup>444,445</sup> permettent de retirer des groupements méthyles déposés sur les résidus lysines.

Il est à noter qu'entre la méthylation de l'ADN et la méthylation d'histones il existe une coordination étroite afin de maintenir une régulation optimale nécessaire à plusieurs processus biologiques<sup>440</sup>.

Au niveau de la pathologie, il a été démontré que la méthylation d'histones pouvait favoriser la prolifération des cellules vasculaires et que l'action de déméthylases pouvait diminuer la prolifération et être favorable<sup>446-449</sup>. La surexpression d'histones méthyltransférases dans des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires favorise leur prolifération et leur survie, c'est le cas pour le facteur épigénétique G9a, responsable de la tri-méthylation de l'histone 3 lysine 9 (H3K9me3) qui une fois inhibé permettait de diminuer la prolifération et la migration des CMLAPs dans un modèle ovin<sup>446</sup>. C'est le cas également pour l'histone méthyltransférase EZH2 (Enhanced of zeste homologue 2)<sup>447</sup> faisant l'objet de mon étude.

Une revue de la littérature a aussi démontré un rôle important de la méthylation des histones dans la régulation de la transcription de l'enzyme endothéliale responsable de la synthèse d'oxyde nitrique, eNOS. En effet, cette revue met en évidence que la méthylation des histones H3K4me3 favorisait la transcription du gène alors que la méthylation de l'histone H3K27me3 et H3K9me3 inhibait la transcription du gène<sup>436</sup>.

## **ARN interférents**

### *Les microARNs*

Découverts il y a maintenant plus de 30 années chez *Caenorhabditis elegans*, les microARN (miARNs) sont des petites séquences d'ARN (d'une vingtaine de nucléotides environ) pouvant inhiber l'expression de certains gènes de façon post transcriptionnelle<sup>450-453</sup>.

Les gènes codants pour les microARNs sont localisés un peu partout au sein du génome<sup>454</sup> soit comme des gènes non codants ou bien au niveau des zones non transcrites de certains gènes codant pour des protéines<sup>455</sup>. Les miARNs, d'environ 22 nucléotides, sont transcrits en miARNs primaires par une ARN polymérase II<sup>456</sup> puis subissent plusieurs étapes avant d'être incorporés dans un complexe permettant de conférer la propriété d'interférence aux miARNs : RNA-induced silencing complex (RISC)<sup>455</sup>. En effet, la maturation des miARNs primaires requiert la participation de deux endonucléases Drosha et Dicer<sup>457-459</sup>.

Une fois le miARN mature celui-ci intègre donc le complexe RISC qui aura pour tâche de trouver des cibles ayant une séquence complémentaire au miARN. La séquence d'environ 2 à 7 nucléotides nommée région 'seed' est la région leur permettant de s'associer à leur cible<sup>460,461</sup>. Cette région est d'ailleurs la séquence utilisée en bio-informatique afin de prédire

les ARNs cibles des miARNs<sup>462</sup>. Durant le processus menant à leur maturation, les microARNs peuvent être régulés par de multiples moyens, notamment par des protéines associées aux endonucléases par exemple<sup>463</sup>.

Leur mécanisme d'action se résume à être pairé à la séquence spécifique complémentaire reconnue par le complexe RISC<sup>464-466</sup>. En effet, dans les processus biologiques les ARNs doubles brins sont dégradés car reconnu non fonctionnel. L'ARN double brin donc dégradé et ne mènera pas à la production protéique.

Les fonctions biologiques des miARNs sont nombreuses et une inhibition complète de la biogenèse de ceux-ci au stade embryonnaire est létale<sup>462</sup>. Un dysfonctionnement au niveau de la régulation des miARNs peut engendrer l'apparition de nombreuses pathologies telles que des cancers, des désordres métaboliques<sup>455</sup> ou bien une hypertension artérielle pulmonaire<sup>467,468</sup>.

En effet, lorsqu'on s'intéresse aux microARNs dans l'HTAP de nombreuses études ont mis en évidence l'implication de plusieurs microARNs dans la pathogénèse<sup>467,468</sup> (figure 14). Ces études ont démontré que de nombreux microARNs étaient moins exprimés chez les patients HTAP comparativement à des sujets sains, alors que d'autres sont surexprimés<sup>469-474</sup>.

Le microARN miR-204, par exemple, est un microARN spécifique aux cellules musculaires (cardiaques et lisses) et se retrouve fortement diminué au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>475</sup>. Cette diminution de son expression chez les patients HTAP est d'ailleurs corrélée au degré de sévérité de la pathologie<sup>476,477,478</sup>. D'un point de vue signalisation, miR-204 est responsable de la régulation négative de plusieurs cibles impliquées en HTAP, notamment STAT3 et NFAT, ainsi que BRD4. Cette perte de régulation négative favorise une prolifération importante ainsi qu'une survie des cellules musculaires lisses HTAP<sup>477</sup>.

Dans les modèles expérimentaux, une étude a démontré une diminution de l'endonucléase Dicer dans la pathologie<sup>473</sup>, impliquant donc une diminution de la régulation des microARNs. De plus, une inhibition de certains miARNs permet de renverser le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>471,474</sup>, ce qui démontre le rôle de ceux-ci dans la pathogénèse de l'HTAP<sup>479</sup>.

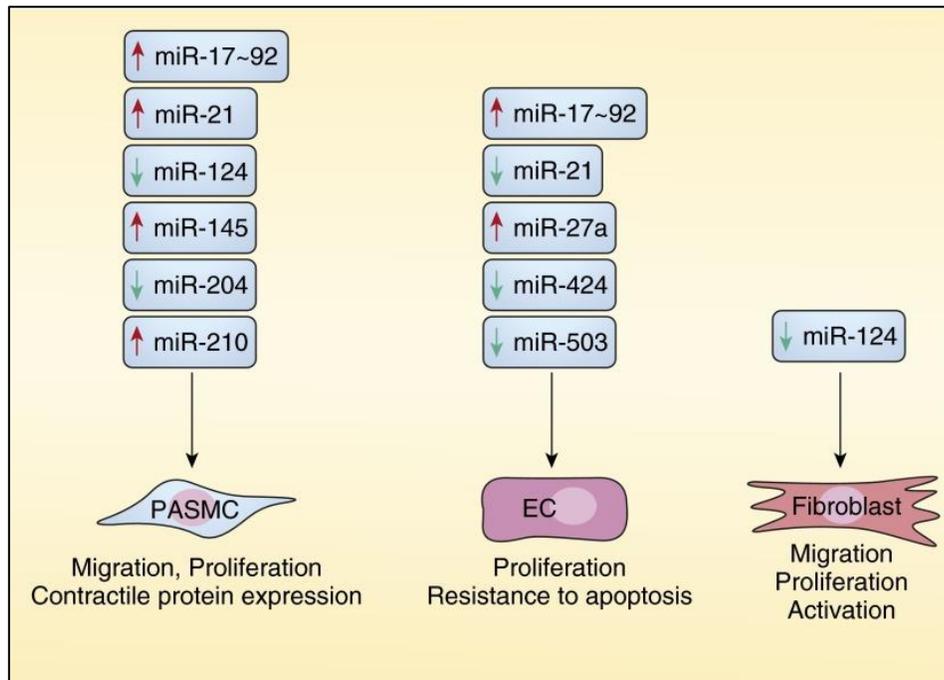


Figure 14. Les microARN et l'HTAP.

Gauche : la prolifération, la migration et la contraction des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP peuvent être régulées par le profil d'expression de multiples microARN. Milieu : la prolifération et la survie des cellules endothéliales régulées par divers microARN. Droite : la migration, la prolifération et l'activation des fibroblastes au sein des artères pulmonaires HTAP peuvent être régulées par le profil d'expression du microARN miR-124. Figure extraite<sup>462</sup>.

#### *Les ARN long non codant*

La découverte d'ARN ne participant pas à la production de protéines fut une avancée majeure en science. Parmi les ARN non codant découverts, nous retrouvons les microARN discutés précédemment mais nous retrouvons aussi les long ARNs non codant (lncRNA : long non coding RNA).

Les ARNs long non codant sont de longues séquences d'ARN (supérieur à 200 nucléotides) ne codant pour aucune protéine mais pouvant réguler de nombreux mécanismes biologiques notamment durant le développement<sup>479</sup> mais aussi la différenciation ou bien encore le cycle cellulaire<sup>480,481</sup> et cela au niveau de plusieurs organes<sup>482,483</sup>. Du point de vue de leur biogénèse, ils sont également générés par l'action de l'ARN polymérase II<sup>484</sup> et peuvent être

régulé par de multiples facteurs de transcription puisque ceux-ci présentent une séquence promotrice sur laquelle ces facteurs peuvent se fixer<sup>463</sup>.

Ces lncRNA peuvent être localisés dans plusieurs compartiments cellulaires<sup>485</sup> mais aussi dans plusieurs types cellulaires, ce qui leur confère un rôle spécifique en fonction de leur localisation<sup>486</sup>. Des études montrent que la majorité des lncRNA se retrouvent dans le compartiment cytoplasmique<sup>487</sup> et ceux-ci peuvent interagir avec des acides nucléiques ou bien des protéines grâce à leur structure et leur séquence<sup>481</sup>.

En effet, ceux-ci peuvent agir comme i) signaux pour l'activation de gènes, ii), compétiteurs pour réprimer l'expression de gènes iii), guides ou supports pour moduler la compaction de la chromatine<sup>488</sup>.

Ces ARN non codant jouent un rôle prépondérant dans le développement de pathologies notamment lorsqu'on fait référence au processus cancéreux<sup>489,490</sup> ou bien encore sur un tout autre registre la schizophrénie<sup>491</sup>.

Lorsqu'on s'attarde sur un possible lien entre des ARN long non codant et le développement de l'HTAP, plusieurs études soutiennent leur implication dans ce processus<sup>492-496</sup>.

En effet, plusieurs d'entre eux favorisent la prolifération exagérée des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>492,494-496</sup> et leur inhibition permettrait d'améliorer les conditions dans des modèles expérimentaux.

Dans le second volet de notre étude, nous nous sommes attardés sur l'implication de le lncRNA H19 dans la défaillance ventriculaire droite en HTAP. En effet, dans le tissu cardiaque, celui-ci a été décrit comme un modulateur du remodelage cardiaque<sup>497,498</sup> dans la défaillance cardiaque et l'hypertrophie pathologique.

De plus, cet lncRNA a été largement décrit dans plusieurs pathologies, en régulant l'expression de plusieurs facteurs, tel que des facteurs épigénétiques, notamment le facteur épigénétique EZH2 (Enhancer of Zest Homologue 2)<sup>499,500</sup> qui fait l'objet de notre étude que nous présenterons plus bas.

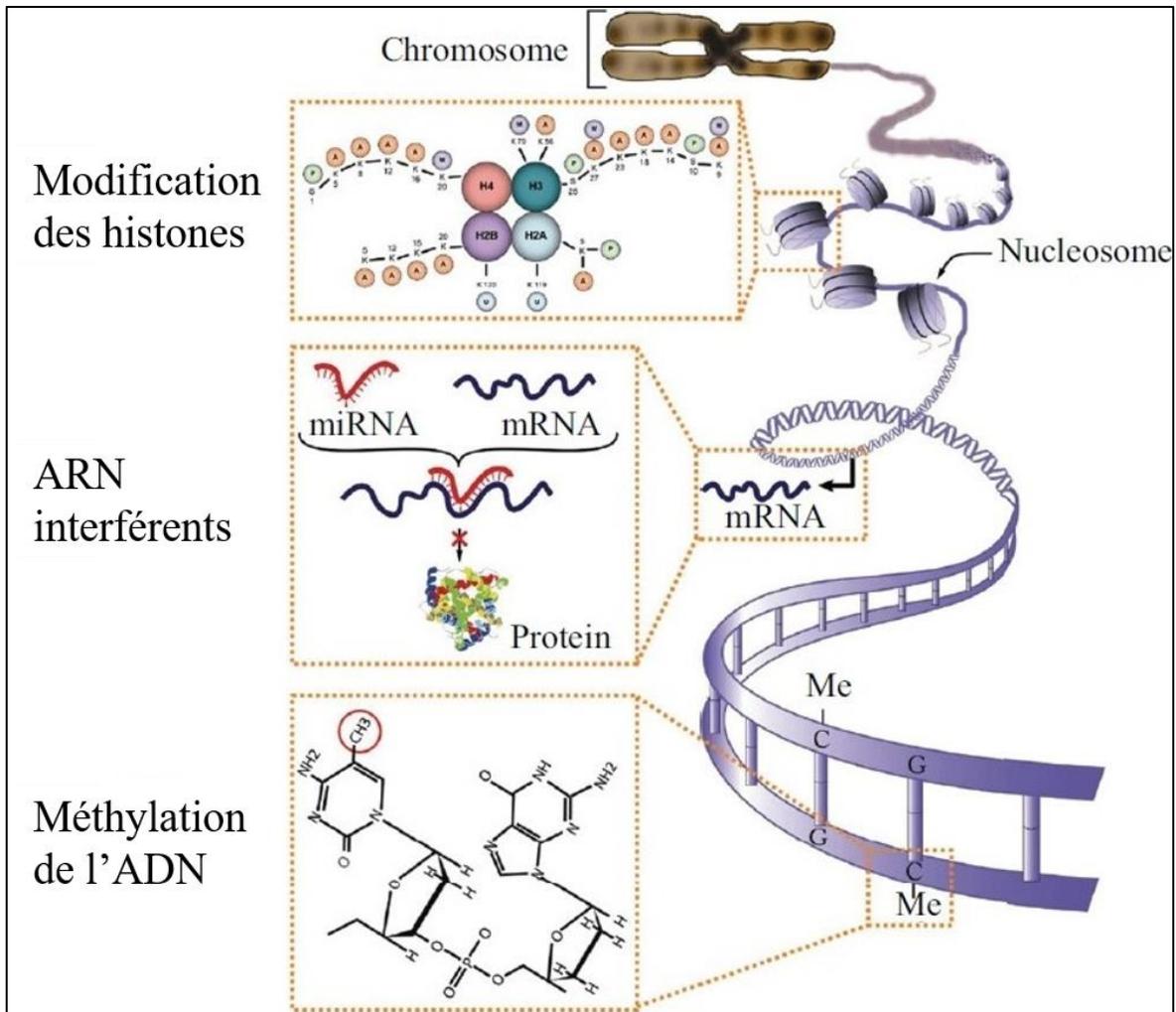


Figure 15. Les différents mécanismes épigénétiques.

Haut : les modifications d'histones regroupant l'acétylation réalisée par les histones acétylases et la désacétylation par les histones désacétylases. Ainsi que la méthylation réalisée par les histones méthyltransférases et la déméthylation réalisée par les déméthylases. Ces modifications peuvent modifier l'état de compaction de la chromatine et ainsi réguler l'expression de certains gènes. Milieu : les ARN interférents incluant les micro-ARN ainsi que les ARN long non codants. En interagissant avec les ARN ou bien les protéines, les ARN interférent peuvent moduler l'expression de certaines cibles. Bas : La méthylation de l'ADN réalisée par les ADN méthyltransférases et permet de moduler l'expression de gènes. Figure extraite<sup>401</sup>

### Le facteur BRD4

La famille des BET (Bromo-and Extra-Terminal) comprend quatre membres : BRD2, BRD3, BRD4 et BRDT (spécifique aux gonades) contenant deux bromo-domaines hautement conservés<sup>501</sup>.

BRD4 représente le membre de cette famille le plus étudié dans la littérature. Dans des conditions physiologiques, BRD4 est une protéine qui permet d'une part de maintenir la stabilité de la chromatine<sup>502</sup> tout en contrôlant le cycle cellulaire (transition de la phase M à la phase G1)<sup>503,504</sup>. Cette protéine fait partie du groupe des 'readers' épigénétiques.

Il a été démontré que BRD4 permet la régulation de gènes impliqués dans l'inflammation notamment au niveau pulmonaire<sup>505</sup> faisant de lui une cible anti-inflammatoire de choix.

Son étude dans le cancer démontre également un rôle dans l'inflammation favorisant ainsi le développement de tumeurs et la progression de cancers<sup>506-508</sup>. Mis à part son implication dans les processus inflammatoires, BRD4 et plus généralement la famille des BET a été démontré comme un pilier central de la transcription de gènes ainsi que des modifications structurales de la chromatine<sup>506,509</sup> favorisant le développement de tumeurs. Lorsque l'on s'attarde sur le rôle de BRD4 dans la pathogenèse du cancer, celui-ci promeut l'invasion cellulaire, ainsi que la progression du cycle cellulaire<sup>510</sup>.

Hormis ces caractéristiques moléculaires, BRD4 promeut également la réparation de l'ADN lorsque celui-ci subit des dommages<sup>511,512</sup>. Étant donné sa forte implication dans le processus cancéreux, l'inhibition de BRD4 semble être une stratégie thérapeutique idéale, ce qui a été d'ailleurs étudiée dans la littérature<sup>513,514</sup>.

Une étude menée en 2015 au sein de notre laboratoire a démontré que l'expression de BRD4 était augmentée dans les poumons des patients HTAP et plus précisément au niveau des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires de ces patients<sup>511</sup>. Cette étude a démontré que celui-ci régule positivement plusieurs acteurs moléculaires connus en HTAP, notamment le facteur NFATc2 ainsi que la protéine survivin que nous avons précédemment décrit<sup>511</sup> (figure 16). De plus celui-ci est responsable de l'altération de l'expression de p21, puissant régulateur du cycle cellulaire, décrit dans l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>515</sup>.

De ce fait, BRD4 représente une cible moléculaire favorisant la prolifération et la survie cellulaire des CMLAPs HTAP.

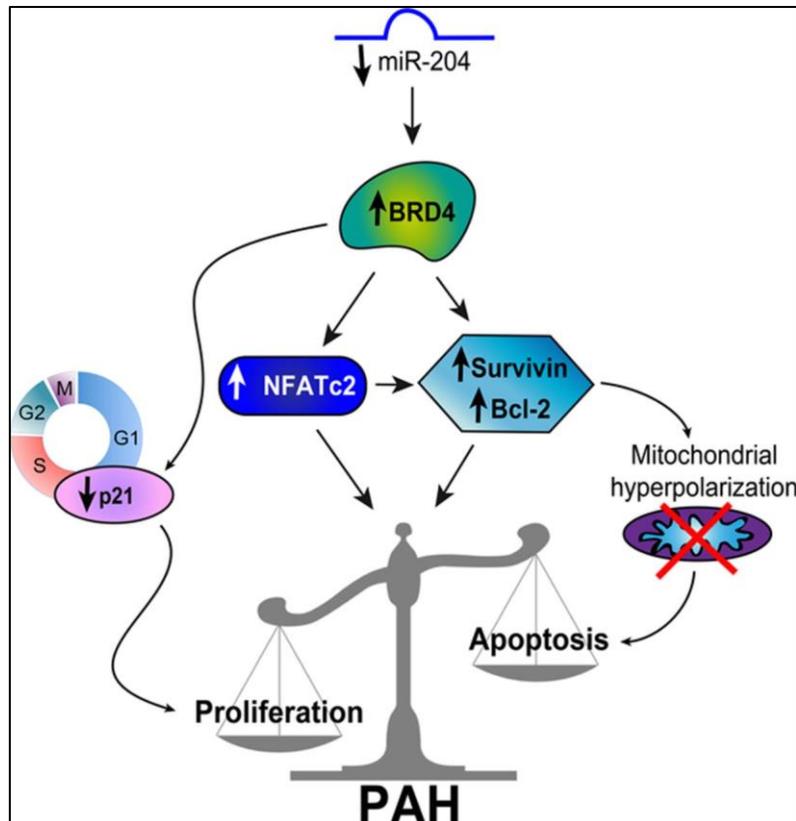


Figure 16. Implication de BRD4 dans l'hypertension artérielle pulmonaire.

Représentation schématique des mécanismes moléculaires impliquant BRD4 dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire. Lorsque l'expression de miR-204 est diminuée, BRD4 est surexprimé, inhibant ainsi rapidement le régulateur du cycle cellulaire p21, favorisant la prolifération et déclenchant l'expression du facteur nucléaire NFATc2, de survivin et Bcl-2. Une expression accrue de ces oncogènes conduit à une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, à une résistance à l'apoptose et à une prolifération accrue. Figure extraite<sup>511</sup>.

Soutenu par ces résultats, une étude préclinique regroupant plusieurs équipes, dont notre équipe de recherche, a mis en évidence l'efficacité du RVX-208, un traitement visant à inhiber la famille des BET dans des modèles expérimentaux de l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>516</sup>. Les résultats obtenus démontrent un effet bénéfique du traitement dans l'amélioration des paramètres hémodynamiques dans des modèles expérimentaux et cela réalisés dans plusieurs centres différents<sup>516</sup>. Ces résultats communs appuient le potentiel thérapeutique de l'utilisation du RVX-208 dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire.

Ces résultats positifs et encourageants ont donné naissance à une étude clinique visant à tester le potentiel thérapeutique du RVX-208, de son nom commercial Apabetalone chez des patients atteints d'HTAP (NCT03655704).

Un autre inhibiteur de la famille des BET a également été testé au niveau des cellules endothéliales, le JQ1. Cet inhibiteur démontre un effet positif sur le micro-environnement inflammatoire des cellules endothéliales en HTAP notamment en diminuant l'expression des cytokines IL6 et IL8<sup>517</sup>.

### 3.4.3 Dysfonction mitochondriale et effet Warburg

Lorsqu'on s'attarde sur la capacité que les cellules possèdent pour subvenir à leur besoin énergétique nous pensons à la mitochondrie, organelle responsable de la génération d'énergie sous forme d'ATP (adénosine triphosphate)<sup>518-522</sup>. Par la respiration mitochondriale celle-ci est apte à fournir de l'énergie à la cellule afin de remplir ses fonctions physiologiques.

Cependant, la mitochondrie n'a pas pour unique rôle que de subvenir aux besoins énergétiques cellulaires. En effet, la mitochondrie se trouve être une composante essentielle à l'intégration des signaux cellulaires et environnementaux<sup>519,521-523</sup>. En effet, celle-ci peut subir des régulations multiples par de nombreux facteurs oncogènes ou bien encore suppresseurs de tumeurs<sup>524</sup>.

En réponse à ces modulations, la mitochondrie peut produire différents métabolites permettant de contrôler et réguler des facteurs de transcription ou bien des facteurs épigénétiques par exemple. En effet, celle-ci peut intégrer les signaux cellulaires concernant la demande en énergie et ainsi adapter sa réponse afin de maintenir une croissance optimale cellulaire. De plus, la mitochondrie peut produire des métabolites permettant d'optimiser la croissance cellulaire ou bien à l'opposé permettant d'induire la mort cellulaire programmée<sup>525</sup>. En effet, l'apoptose est majoritairement régulée par la mitochondrie.

Dans la pathologie, les mitochondries de cellules malades se retrouvent plus hyperpolarisées comparativement à celles des cellules saines<sup>526,527</sup>. L'hyperpolarisation membranaire rend la mitochondrie dysfonctionnelle et tous les effets associés à cette dysfonction va favoriser la

survie cellulaire durant des périodes de stress cellulaire. Dans les processus hyperprolifératifs, la respiration mitochondriale est inhibée au profit de l'utilisation du glucose comme source d'énergie et cela favorise la survie cellulaire et leur prolifération.

Ce phénomène a tout d'abord été décrit dans les cellules cancéreuses par Otto Warburg dans les années 1930<sup>528</sup> puis étudié et peaufiné dans les années 1950<sup>529</sup>.

L'effet Warburg désigne le switch métabolique s'opérant dans les cellules d'un statut reposant sur la phosphorylation oxydative à un statut plus glycolytique reposant sur l'utilisation préférentielle du glucose afin de soutenir énergétiquement la production de biomasse<sup>530</sup>. Ce switch métabolique est aussi observable dans les cellules de patients atteints d'HTAP<sup>531,532</sup> puisque les cellules vont privilégier un fonctionnement énergétique moins efficace qui leur demandera de consommer plus de glucose que la normale (figure 17).

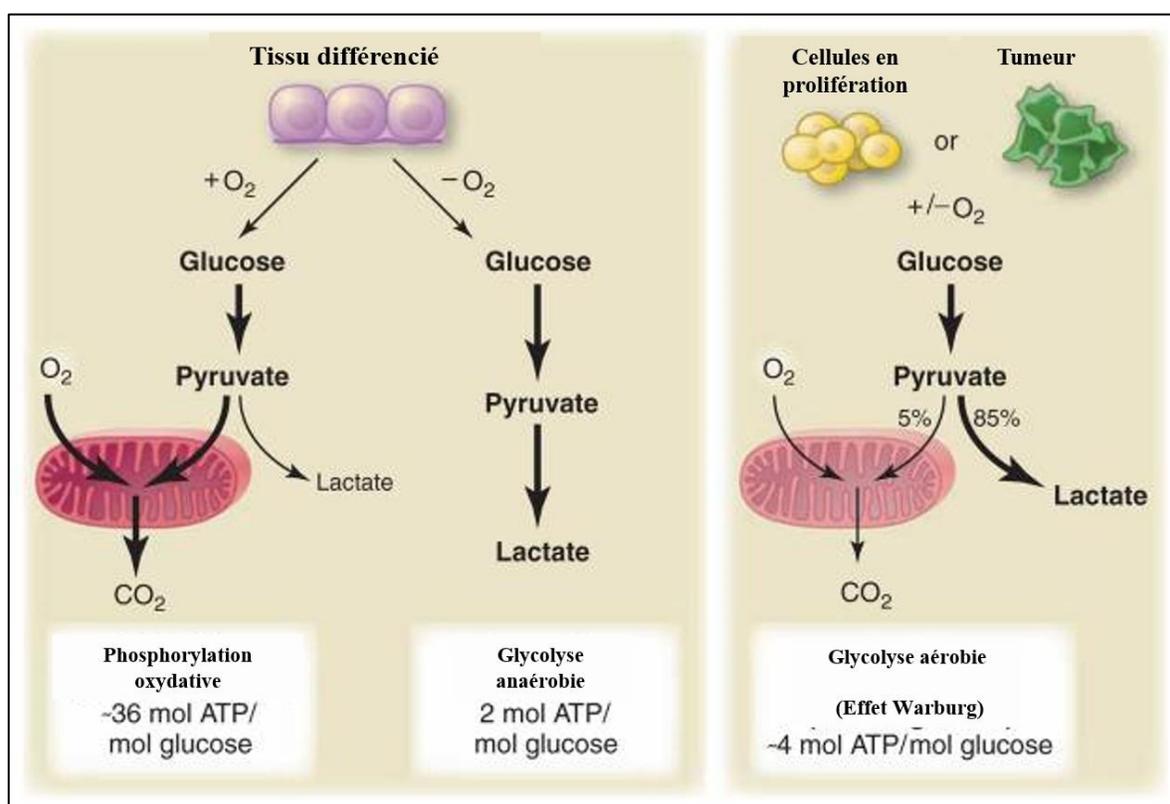


Figure 17. L'effet Warburg.

En présence d'oxygène, les tissus différenciés métabolisent d'abord le glucose en pyruvate par glycolyse, puis oxydent complètement la plupart de ce pyruvate dans les mitochondries en CO<sub>2</sub> au cours du processus de phosphorylation oxydative. Lorsque l'oxygène est limitant, les cellules peuvent rediriger le pyruvate généré par

glycolyse loin de la phosphorylation oxydative mitochondriale en générant du lactate (glycolyse anaérobie). Dans les cellules prolifératives telles que les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires de patients HTAP ou les cellules cancéreuses, on observe une glycolyse en condition aérobie. La mole de glucose produit donc beaucoup moins d'énergie, mais la cellule s'affranchit de l'implication de la mitochondrie. Figure adaptée<sup>530</sup>.

Associée à ces adaptations énergétiques, la mitochondrie dysfonctionnelle ne permettra plus d'induire l'apoptose dans les cellules malades<sup>533</sup> et favorisera l'expression de facteurs prolifératifs<sup>534</sup>.

En effet, l'apoptose s'opère par la libération du cytochrome c et l'activation de caspases (protéases nécessaires à la mise en place de l'apoptose), induite par la dépolarisation de la membrane mitochondriale<sup>535</sup>. Or les mitochondries dans les cellules malades sont très hyperpolarisées ce qui rend difficile la dépolarisation nécessaire à la libération du cytochrome c, les cellules seront donc moins sujettes à l'apoptose et survivront plus facilement aux conditions de stress cellulaire.

Ces mécanismes seront favorables à la survie cellulaire et à la prolifération et ainsi à la progression de la pathologie.

#### 3.4.4 Inflammation et immunité

La présence de processus inflammatoires importants dans l'HTAP a été reconnu comme un facteur favorisant le remodelage vasculaire<sup>536,537</sup>, notamment dans les prémices de la maladie. En effet, l'administration d'IL-6 dans un modèle expérimentale suffit à induire une hypertension pulmonaire<sup>538,539</sup>. Non seulement l'inflammation peut promouvoir le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des cellules<sup>536,537</sup> mais aussi peut induire des dommages à l'ADN (que nous présenterons plus loin)<sup>540,541</sup>.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, nous pouvons retrouver une infiltration de cellules inflammatoires telles que des macrophages ou bien encore des lymphocytes (B et T), au niveau des lésions plexiformes de patients HTAP<sup>138</sup>. Cette infiltration a été étudié au niveau des poumons de patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique notamment<sup>542,543</sup> mais aussi au niveau de patients présentant une hypertension artérielle pulmonaire associée à une schistosomiase<sup>544</sup>. La présence de cellules inflammatoires favorise

le recrutement de cytokines telles que l'IL-1 et 6 chez les patients HTAP comparativement à des sujets sains, diminuant leur chance de survie<sup>545</sup>. En effet, il existe une association entre un niveau élevé de cytokines et la mortalité chez les patients HTAP. Ce pattern inflammatoire est retrouvé dans le modèle expérimental monocrotaline avec une infiltration massive au niveau perivasculaire<sup>546</sup> faisant de lui un modèle intéressant pour l'étude de thérapies immunosuppressives.

D'un point de vue plus moléculaire, des études ont démontré que certains médiateurs inflammatoires se retrouvaient surexprimés chez des patients atteints d'HTAP, notamment le CD54 (connu aussi sous le nom de ICAM-1 intracellular adhesion molecule-1) ainsi la selectine E (connu également sous le nom de ELAM-1 endothelial leukocyte adhesion molecule-1)<sup>547</sup>.

Également, certaines chimiokines telles que la fractalkine (FKN ou CX3CL1) et son récepteur (CX3CR1) sont des molécules permettant le recrutement de monocytes et de cellules T au niveau de la paroi vasculaire<sup>548,549</sup>. Ces acteurs sont surexprimés dans les cellules T des patients HTAP comparativement aux contrôles<sup>550</sup>.

D'autres acteurs capables de recruter des monocytes et des cellules T sont surexprimés, tels que RANTES (**R**egulated upon **A**ctivation, **N**ormal **T**-cell **E**xpressed and **S**ecreted) nommé également CCL5<sup>551,552</sup>. Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, en plus de son rôle dans le recrutement de cellules inflammatoires<sup>553</sup>, celui-ci induit l'activation d'agents vasoconstricteurs comme l'ET-1 *via* induisant l'expression de l'enzyme de conversion de l'endothéline 1<sup>551</sup>.

Le chemokine ligand 2 (CCL2) nommé également monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) fut aussi retrouvée augmentée dans les poumons et le plasma de patients HTAP<sup>554</sup>. Finalement, ces études démontrent une réelle implication du profil inflammatoire dans la pathogenèse de l'hypertension artérielle pulmonaire.

La question du profil immunitaire a été exploré dans l'hypertension artérielle pulmonaire, puisque chez certains patients, Isern et ses collègues ont décrit un niveau élevé de cytokines pro-inflammatoires chez les patients HTAP mais également un taux d'anticorps anti-

nucléaires (AAN) circulants élevés chez ceux-ci<sup>555</sup>. Les AAN étant principalement retrouvés dans des pathologies auto-immunes et leur mesure permet de poser un diagnostic<sup>550</sup>.

Lorsque l'on se penche sur les patients atteints d'hypertension artérielle pulmonaire associée à une infection au VIH, nous observons que leur statut immunitaire pourrait favoriser le développement de la pathologie et ainsi aggraver le pronostic vital<sup>556</sup>.

D'un point de vue thérapeutique, à ce jour, aucune preuve ne démontre un effet positif d'un traitement reposant sur la diminution de l'inflammation. Cependant, cela peut être utile de l'envisager pour les patients présentant des pathologies à profil inflammatoire associées à une HTAP<sup>557</sup>.

Une étude clinique actuelle tente de démontrer un effet potentiel du Rituximab dans le traitement de l'HTAP associée à la sclérodémie (NCT01086540). Le Rituximab étant un anticorps monoclonal contre les lymphocytes B (présentant un antigène CD20) permettant de traiter de nombreuses pathologies auto-immunes<sup>558</sup>. Le traitement de l'inflammation sous-jacente à l'HTAP peut soulager l'HTAP associée à des pathologies inflammatoires comme la sclérodémie<sup>375</sup>.

### 3.4.5 Stress oxydatif

Le stress oxydatif est caractérisé par une augmentation de particules oxydantes (nommées espèces réactives de l'oxygène ou reactive oxygen species ROS), telles que le peroxyde d'hydrogène H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, les ions superoxydes O<sub>2</sub>•<sup>-559</sup>, l'oxyde nitrique (NO) ainsi que d'autres radicaux libres. D'un point de vue physiologique, les ROS peuvent être générés dans divers types de cellules saines et participent aux multiples processus cellulaires<sup>560,561</sup>.

L'accumulation de ces particules oxydantes peut directement causer des dommages tissulaires *via* l'oxydation de certaines molécules<sup>562-564</sup>. Cette oxydation peut, entre autres, détériorer les membranes cellulaires par peroxydation des lipides, ou bien encore engendrer des dommages au niveau de la structure de l'ADN comme nous le verrons plus loin. En dehors de ces mécanismes certains facteurs de transcription peuvent être altérés, c'est notamment le cas du facteur HIF-1<sup>559</sup>. Certaines enzymes, telles que la NADPH oxydase, sont responsables de la génération d'espèces réactives de l'oxygène et peuvent être régulées par différentes hormones ou facteurs de croissance<sup>565,566</sup>.

En plus de cette source de production de ROS, la mitochondrie représente une autre source de production puisque de façon physiologique lors du transport d'électrons cela engendre la transformation de 1-2% de l'oxygène en  $O_2\bullet^-$ . Lors que la mitochondrie se retrouve dérégulée, la production de ROS par ce biais va favoriser l'accumulation de ceux-ci et engendrer des lésions.

La mesure de marqueurs de stress oxydatif chez des patients atteints d'HTAP a démontré une augmentation de la peroxydation des lipides mais également une diminution d'agents antioxydants tel que la vitamine E<sup>567</sup>. La génération d'ions superoxydes a été démontré comme un puissant activateur de la prolifération des cellules musculaires lisses des artères<sup>568</sup> favorisant ainsi un remodelage de la paroi vasculaire.

De plus, chez le patients HTAP, il a été décrit que certaines enzymes responsables de la production de ROS, telles que la xanthine oxydase, présentaient une activité enzymatique plus importante que chez des sujets sains<sup>569</sup>. Au niveau pulmonaire, les données mettent en évidence la présence de stress oxydatif chronique chez les patients atteints d'HTAP<sup>559</sup>. Cela peut s'expliquer par le fait que les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP développent des stratagèmes complexes afin d'échapper aux effets du stress oxydatif notamment par la surexpression d'enzymes permettant de détoxifier les nucléotides pouvant subir de l'oxydation<sup>570</sup>.

En effet, un acteur majeur de la détoxification de l'ADN a été mis en évidence dans la littérature : NUDT1 (Nudix hydrolase 1, nommée également MuT Homologue - MTH1). NUDT1 est une enzyme permettant de diminuer l'accumulation de 8 oxoguanines (8-OX) au sein de la structure de l'ADN. Les 8-OX sont le résultat de lésions engendrées par le stress oxydatif. En effet, les guanines de la structure de l'ADN peuvent subir une oxydation directe et s'accumuler au sein de l'ADN engendrant par la suite la mort cellulaire<sup>571</sup>.

Notre laboratoire a mis en évidence une surexpression de NUDT1 dans les CMLAPs-HTAP ainsi que dans les modèles expérimentaux<sup>570</sup>.

Nous avons démontré qu'une inhibition spécifique de NUDT1 freine la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP. Cet effet passe par une perturbation de la bioénergétique cellulaire mais également de la voie de l'autophagie. Une

approche expérimentale nous a permis de mettre en évidence un effet thérapeutique dans deux modèles animaux de la pathologie (MCT et sugen-hypoxie).

NUDT1 fonctionne en duo avec OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase-1) afin d'exciser les guanines qui ont pu être oxydées et ainsi réparer les dommages associés. Notre laboratoire a également mis en évidence une surexpression d'OGG1 dans les CMLAPs-HTAP<sup>572</sup>.

Également, NUDT1 a été démontré surexprimé dans les tissus cancéreux comparativement à des tissus sains<sup>573</sup>. Cette surexpression représente un moyen de survivre que la cellule met en place afin d'empêcher l'incorporation de 8-OX dans la structure de l'ADN faisant de cet acteur une cible préférentielle thérapeutique.

De façon intéressante, l'accumulation de stress oxydatif peut favoriser la transcription de certains gènes *via* la phosphorylation et l'activation de facteurs de transcription favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, tel que le facteur GATA4<sup>574</sup>.

En ce qui concerne le facteur GATA4, son activation est la résultante de la production de ROS induite par la sérotonine<sup>575</sup>. Il est à noter que d'autres molécules, telles que l'endothéline 1 peut également favoriser la production de ROS<sup>576</sup>.

Hormis son action au niveau vasculaire, le stress oxydatif peut favoriser la défaillance du ventricule<sup>565</sup>. Le facteur de transcription GATA4 notamment étant également très impliqué dans le processus d'hypertrophie ventriculaire<sup>577</sup>. De plus, la sérotonine peut induire l'oxydation de protéines au niveau du cœur droit spécifiquement<sup>578</sup>. Cela démontre que le ventricule droit est aux proies à l'accumulation de stress oxydatif qui peut expliquer en partie la défaillance cardiaque droite<sup>579</sup> puisqu'un traitement antioxydant permet de prévenir celle-ci<sup>580</sup>.

Le modèle expérimental monocrotaline récapitule le stress oxydatif puisque l'administration d'un antioxydant en guise de thérapie prévient le développement de la pathologie et empêche la défaillance ventriculaire droite chez les rats malades<sup>581</sup>. Une autre étude a également démontré un effet bénéfique d'une surexpression de la superoxyde dismutase SOD, un puissant antioxydant, qui améliore la condition des rats malades<sup>582</sup>. Les études précliniques

démontrent un effet très positif à l'utilisation d'antioxydants en guise de thérapie pour atténuer l'HTAP.

Cependant, chez l'homme de nombreuses questions se posent quant à cibler une molécule en particulier afin de traiter des patients avec des médicaments ciblés. Des études cliniques sont nécessaires afin de déterminer si une thérapie reposant sur l'administration ou la consommation d'antioxydants peut aider à freiner la pathologie.

#### 3.4.6 Dommages à l'ADN

L'ADN des multiples cellules de l'organisme subit quotidiennement des milliers de lésions<sup>583</sup>. Certaines de ces lésions apparaissent de façon physiologique, c'est le cas notamment de mauvais appariement durant la réplication. Cependant, dans certains cas non physiologiques, une accumulation de stress oxydatif et d'inflammation peut altérer la structure de l'ADN<sup>584,540,585,586</sup>.

La structure de l'ADN peut subir de nombreuses modifications provenant de l'environnement cellulaire, mais celle-ci peut aussi subir des effets environnementaux, tels les radiations UV (ultraviolet) ou encore des agents chimiques, qui peuvent altérer sa structure<sup>587,588</sup>.

Les dommages engendrés peuvent se caractériser par des cassures au niveau d'un seul brin de l'ADN ou bien au niveau des deux brins de celui-ci<sup>583</sup>. Comme dommages nous pouvons également avoir des agents qui peuvent s'insérer au niveau de la séquence ou bien encore la modification de bases<sup>583</sup>.

Pour pallier ces dommages, les cellules reposent sur une réparation efficace de la structure de l'ADN nommée la réponse aux dommages à l'ADN (DDR : DNA-damage response)<sup>583,589</sup>.

Une mauvaise réparation de ces dommages engendre à terme une accumulation de mutations favorisant la mort cellulaire. Cependant, ces dommages peuvent aussi être responsables d'une sélection de cellules résistantes à la mort cellulaire avec un phénotype prolifératif, en ne sélectionnant que les cellules capables de réparer les dommages subit de façon à maintenir leur survie malgré un environnement défavorable.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'hypertension artérielle pulmonaire peut être associée à un profil inflammatoire important et soutenu ainsi qu'un niveau de stress oxydatif important<sup>35</sup>, ces deux profils favorisent l'accumulation de dommages à l'ADN.

Une étude menée au sein de notre laboratoire en 2014, a mis en exergue une augmentation des dommages à l'ADN au sein du tissu pulmonaire des patients HTAP et plus précisément au niveau des cellules musculaires des artères pulmonaires<sup>590</sup>. Cette accumulation de dommages au niveau de la structure de l'ADN est accompagnée d'une augmentation de l'expression de PARP-1 au sein des mêmes tissus<sup>590</sup>.

PARP-1 (Poly(ADP-ribose) polymerase-1) est une enzyme appartenant à la grande famille PARP permettant la survie des cellules présentant des dommages au niveau de leur ADN<sup>591</sup>. PARP-1 permet la réparation des sites endommagés de l'ADN en apportant des poly (ADP-ribose)<sup>592</sup>. En dehors de son rôle dans la réparation de l'ADN, PARP-1 peut également contrôler la transcription<sup>593</sup>, l'apoptose<sup>594</sup> ou bien la réplication<sup>595</sup>.

L'inhibition pharmacologique et moléculaire de PARP-1 dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires des patients HTAP, démontre une diminution significative de leur prolifération et leur survie cellulaire. Ces effets sont médiés par une levée de l'inhibition de miR-204 par PARP-1 qui à son tour va diminuer l'activité du facteur de transcription NFATc2 et HIF1- $\alpha$  (figure 18).

Les effets sur la prolifération et la survie cellulaire ont été récapitulés dans deux modèles expérimentaux distincts (monocrotaline et sugen-hypoxie), où l'inhibition de PARP-1 permet d'empêcher le développement de la pathologie.

De ces données prometteuses est née une étude clinique impliquant plusieurs centres afin de tester le potentiel thérapeutique de l'inhibition de PARP-1 par Olaparib dans le traitement de l'HTAP (NCT03782818).

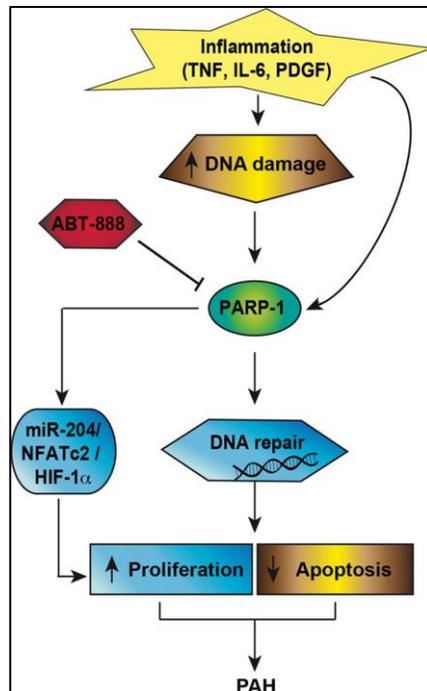


Figure 18. Rôle de PARP-1 en HTAP.

L'inflammation, dont certaines cytokines ainsi que les dommages à l'ADN peuvent activer PARP-1. Cela conduit à une diminution de l'expression de miR-204 et à une augmentation de l'expression / activation de NFATc2 et HIF-1 $\alpha$ , facteurs connus pour induire la prolifération. Figure extraite de<sup>590</sup>.

Outre les effets de PARP-1, il a été démontré que le recours à des anorexigènes pouvait augmenter le niveau de stress oxydatif cellulaire et favoriser l'accumulation de dommages à l'ADN, c'est le cas notamment des amphétamines et de leur dérivés<sup>510-511</sup>. Il a été démontré que cet effet-là était également retrouvé lors de la prise d'inhibiteur de la recapture de la sérotonine<sup>599</sup>. Également, la protéine survivin est démontré dans la littérature comme une actrice importante de la réparation de cassures doubles brins de l'ADN notamment au niveau de cellules cancéreuses<sup>475</sup>.

Finalement, en HTAP, les tissus pulmonaires notamment les cellules endothéliales et musculaires lisses des artères pulmonaires sont confrontées à une accumulation de dommages au niveau de la structure de l'ADN. Ceux-ci peuvent être causés par de nombreux processus, notamment le profil oxydatif et inflammatoire très présent dans la pathologie. Cette accumulation favoriserait l'émergence du phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique caractéristique des cellules en HTAP.

### 3.5 Les modèles animaux de l'HTAP

Afin d'étudier la pathologie et de tester de nouvelles voies thérapeutiques, l'usage de modèles animaux reste primordial. Concernant l'hypertension artérielle pulmonaire il existe plusieurs modèles animaux, dont les modèles monocrotaline, sugen-hypoxie, fawn hooded rat, BMPR2 muté entre autres.

Dans cette partie nous ferons l'emphase sur les modèles utilisés dans notre étude, soit le modèle monocrotaline, le modèle Sugén-hypoxie ainsi que les autres modèles souvent utilisés dans la littérature.

#### 3.5.1 Le modèle monocrotaline

La monocrotaline est un alcaloïde végétal toxique extrait des graines de la plante *Crotalaria spectabilis*. Le produit de la biotransformation hépatique de l'alcaloïde, plus précisément par le cytochrome P450, est un composé hautement toxique qui se retrouve piégé dans les globules rouges. C'est en 1967 que le modèle fut établi en administrant la substance à des rats par ingestion<sup>600</sup>. Le métabolite induit des lésions vasculaires au niveau pulmonaire affectant les cellules endothéliales, en entraînant plusieurs altérations telles qu'une altération de la régulation de l'oxyde nitrique<sup>600,601</sup> ou bien une accumulation de stress oxydatif. Ces altérations au niveau des cellules endothéliales entraînent leur apoptose<sup>602,603</sup>. Cette mort cellulaire induit une sélection de cellules résistantes à l'apoptose sécrétant de multiples facteurs favorisant la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses adjacentes<sup>604</sup>. Il a été observé une accumulation de cellules inflammatoires au niveau vasculaire<sup>605</sup> précédant la prolifération des cellules musculaires lisses<sup>606</sup>. Toutes ces modifications cellulaires engendrent un profond remodelage vasculaire<sup>606</sup> entraînant des altérations dans les paramètres hémodynamiques pulmonaires.

D'un point de vue pratique, pour induire la pathologie une unique administration est nécessaire, ce qui rend ce modèle animal facile à établir. En effet, après l'administration sous cutanée ou intrapéritonéale de la monocrotaline, à raison de 60mg/kg à 80mg/kg<sup>604</sup>, les rats développent l'hypertension artérielle pulmonaire après 3 à 4 semaines<sup>600,607,608</sup>. Après 4 semaines on peut observer de profondes modifications hémodynamiques, notamment une augmentation de la PAP moyenne (mPAP), de la RVSP et de l'index de fulton<sup>600</sup>. En effet,

le remodelage vasculaire entraîne une hypertrophie ventriculaire droite menant à une dysfonction cardiaque droite<sup>609</sup>. Cependant, une à deux semaines après l'administration de monocrotaline, les rats démontrent déjà des changements hémodynamiques<sup>606</sup>.

Enfin, il est à noter que selon la dose administrée, les rats peuvent développer d'autres pathologies telles que des lésions hépatiques sévères pouvant servir de modèle expérimental<sup>610</sup>.

### 3.5.2 Le modèle Sugén Hypoxie

Ce modèle a été développé bien plus récemment par Taraseviciene-Stewart et collègues en combinant l'administration de Sugén 5416 (SU5416) et une mise en hypoxie chronique (10% O<sub>2</sub>) de trois semaines<sup>611</sup>.

En effet, c'est en 2001 que cette équipe a démontré qu'utiliser le Sugén 5416, un inhibiteur du récepteur au VEGF-2 combiné à une hypoxie provoquait la mort des cellules endothéliales pulmonaire dans un premier temps suivi de leur prolifération<sup>611</sup>. L'équipe s'est basée sur le fait que le VEGF est un acteur important pour le maintien et la différenciation des cellules endothéliales vasculaire<sup>609</sup>. Associée à ces caractéristiques, les auteurs ont démontré une augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses indiquant le rôle du récepteur au VEGF endothéliale dans la régulation de la croissance de ces cellules<sup>609</sup>. Les rats développent par la suite une hypertension artérielle pulmonaire sévère avec une augmentation significative de la pression artérielle pulmonaire<sup>611</sup>.

Dans ce modèle, les rats développent une hypertrophie et une dilatation ventriculaire droite suite à l'augmentation de la PAP après 5 semaines de Sugén5416 combiné à l'hypoxie<sup>612</sup>. De plus, dans ce modèle expérimental certains rats présentent des lésions vasculaires<sup>609</sup> ressemblant aux lésions plexiformes retrouvées chez les patients HTAP. Ce modèle est très utilisé dans les études pré-cliniques afin de tester le potentiel de certains médicaments dans le traitement de l'HTAP<sup>609</sup>.

### 3.5.3 Le modèle FHR (Fawn Hooded Rat)

Le modèle fawn hooded rat (FHR) a été découvert et décrit très tôt en 1975 par deux chercheurs, dans des colonies de rats<sup>613</sup>. Ce modèle présente certaines anomalies au niveau du chromosome 1 entraînant un défaut de l'agrégation plaquettaire. Initialement, ce modèle expérimental était utilisé pour des études de troubles de la coagulation. Plus tardivement, il a été démontré que ce modèle animal pouvait développer une hypertension artérielle pulmonaire en fonction de l'âge des spécimens. En effet, la pression artérielle moyenne se retrouve élevée dans des rats FHR de sexe masculin âgé d'environ 5,5mois<sup>614</sup>. A mesure que les animaux prennent de l'âge, l'hypertension artérielle pulmonaire gagne en sévérité. En effet après une année, les rats présente une hypertension artérielle pulmonaire très severe<sup>614,615</sup>. Dès lors, le modèle fut utilisé afin d'étudier l'hypertension artérielle pulmonaire et ses effets délétères.

D'un point de vue des caractéristiques pathologiques, la première donnée qui fut notée est que ce modèle présente une glycémie nettement inférieure à des rats sains<sup>613</sup>. En 2006, une étude a mis en évidence des modifications dans le contrôle de la signalisation HIF-1 $\alpha$  ainsi que des canaux potassiques voltages dépendant K<sub>v</sub> aboutissant à des anomalies affectant le métabolisme énergétique<sup>616</sup>. Également, il a été présenté des modifications d'expression de protéines nécessaires au bon fonctionnement mitochondrial, notamment la superoxyde dismutase 2 (SOD2)<sup>616</sup> favorisant ainsi la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses HTAP<sup>617</sup>. Comme nous l'avons mentionné cette enzyme est nécessaire à la régulation du potentiel redox de la mitochondrie, ce qui par la suite peut affecter le tonus vasculaire également<sup>618</sup>.

Associé à ces résultats, il a été par la suite mis en évidence que les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires isolées de ce modèle expérimental démontre un effet Warburg favorisant un métabolisme glycolytique<sup>619</sup>.

Enfin parmi les anomalies retrouvées dans ce modèle expérimentale il a également décrit que ces rats étaient très sensibles à l'hypoxie, une exposition à des niveau d'oxygène légèrement diminuer accélère le développement de l'HTAP chez ces rats<sup>620,621</sup>.

#### 3.5.4 Le modèle porteur de mutations de BMPR2

Comme nous l'avons précédemment mentionné, les études ont démontré que 80% des patients présentant une HTAP héréditaire présentent des mutations sur le gène BMPR2. Le modèle expérimental a été développé sur des souris<sup>622</sup> et également sur des rats. Le modèle de rat sont plus sensibles au développement de la pathologie comparativement aux souris<sup>623</sup> ce qui rend ce modèle un peu plus pertinent lors de l'étude de la pathologie.

Les altérations retrouvées dans le modèle de la souris présentant une perte de fonction de BMPR2 au niveau des cellules endothéliales, nous retrouvons, une apoptose des cellules endothéliales<sup>624</sup> mais également une prolifération abondante des cellules musculaires lisses<sup>625</sup>. Lorsque les souris sont soumises à une hypoxie celles-ci développent une hypertension artérielle pulmonaire caractérisée par une augmentation de leur PAP moyenne<sup>626</sup>. Cependant, ce modèle de souris ne récapitule pas les effets de la maladie au niveau de ventricule droit notamment l'hypertrophie ventriculaire des suites de l'augmentation des pressions pulmonaire<sup>626</sup>.

Néanmoins, lorsque la délétion du récepteur est spécifique aux cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, les souris vont développer une hypertrophie du ventricule ainsi que certaines lésions plexiformes au niveau pulmonaire<sup>627</sup>.

En 2018, une étude a développé et caractérisé des rats mutants présentant une délétion hétérozygote du récepteur au niveau pulmonaire<sup>628</sup>. Ces rats développent une hypertension pulmonaire associée à une altération de la fonction cardiaque droite<sup>628</sup>. De plus, ceux-ci présentent une surexpression de l'interleukine 6 ainsi qu'une constriction importante des artères pulmonaires. Finalement, ce modèle expérimental récapitule le phénotype que l'on retrouve chez les patients mais mime également la pénétrance de la pathologie que l'on retrouve chez les patients porteurs d'une mutation sur le gène BMPR2, entre 16 et 28%<sup>629-631</sup>.

Ce modèle représente une belle alternative afin d'étudier les mécanismes associés à une mutation sur le récepteur BMPR2 dans le développement d'une hypertension pulmonaire.

#### 3.5.5 Autres modèles animaux

Dans ce paragraphe nous allons présenter rapidement des modèles expérimentaux alternatifs disponibles pour l'étude de la pathologie.

Le modèle de schistosomiase est un modèle de souris référencé de nombreuses fois dans la littérature<sup>632</sup>. Précédemment nous avons énoncé que l'infection avec le parasite pouvait mener au développement d'une hypertension artérielle pulmonaire. En 2010, deux études ont utilisé une infection avec ce parasite afin de provoquer le développement de la pathologie<sup>633,634</sup>. L'infection avec le parasite récapitule le phénotype retrouvé chez les patients présentant cette infection. Ce modèle a permis de tester des traitements qui sont utilisés pour traiter cette infection afin de déterminer si ceux-ci sont aptes à améliorer la condition des patients infectés qui ont développé une hypertension pulmonaire. Le praziquantel est l'un de ces traitements, celui-ci entraîne la paralysie du parasite. Ce traitement testé dans le modèle expérimental démontre un effet bénéfique sur le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire suite à l'infection des souris par le parasite<sup>635</sup>.

En comparaison avec l'hypertension artérielle pulmonaire idiopathique, l'hypertension artérielle pulmonaire associée à l'infection par le parasite présente moins de données quant à la compréhension de la physiopathologie. Ce modèle expérimental permet de pouvoir apporter des éléments de réponse et d'études.

Le modèle de surexpression de l'IL-6 est un modèle de souris développé en 2009<sup>636</sup>. Comme nous l'avons mentionné précédemment, la surexpression de l'interleukine 6 a été décrite dans l'hypertension artérielle pulmonaire et est corrélée avec la sévérité ainsi que la mortalité de celle-ci<sup>552</sup>. Les souris présentant une surexpression de l'IL-6 démontre une augmentation de la pression dans les artères pulmonaires des suites du remodelage de celles-ci. A ce remodelage a été associé une hypertrophie du ventricule droit<sup>636</sup>. D'un point de vue histologique, ce modèle récapitule le profil des lésions observés chez les patients HTAP, notamment les lésions plexiformes ainsi que l'infiltration de cellules inflammatoires au niveau artériel<sup>637</sup>.

Le potentiel thérapeutique d'une inhibition de récepteurs à l'IL-6 a été démontré en 2010<sup>638</sup>, faisant du modèle expérimental un très bon outil pour l'étude des mécanismes liés à l'interleukine 6 en hypertension artérielle pulmonaire.

Le modèle de surexpression du transporteur de la sérotonine (5-HTT) fut créé en 2004 par Maclean et ses collègues<sup>639</sup>. Comme nous l'avons précédemment énoncé, la sérotonine ainsi que son transport sont impliqués dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>386</sup>. La surexpression du transporteur chez des souris mise en hypoxie chronique favorise le développement de la pathologie *via* un remodelage vasculaire ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire droite. Ce modèle a permis de tester des molécules à des fins thérapeutiques tels que des inhibiteurs du transporteur<sup>394</sup>. L'utilisation de ce modèle permet de mieux appréhender le rôle de la voie de signalisation de la sérotonine et ainsi adapter des thérapies ciblées<sup>640</sup>.

D'autres modèles complémentaires existent également, tels que des modèles combinant une pneumonectomie et une induction avec du Sugen 5416 ou bien de la monocrotaline.

### **3.6 Thérapies actuelles de l'HTAP**

Comme nous l'avons vu, les artères pulmonaires des patients HTAP présentent un remodelage profond et une vasoconstriction. Les stratégies thérapeutiques actuelles visent une amélioration de la qualité de vie des patients. Cependant, il est important de noter que ces thérapies ne permettent pas de soigner la maladie et ils ne diminuent le taux de mortalité que de façon modeste. Le traitement peut reposer sur des médicaments non spécifiques à l'hypertension pulmonaire, ce sont les thérapies dites conventionnelles. Les thérapies ciblées permettent d'aller interagir avec les différentes voies impliquées dans la vasoconstriction.

#### **3.6.1 Thérapies conventionnelles**

Les traitements conventionnels englobent les traitements non spécifiques à l'HTAP mais néanmoins pouvant apporter un bénéfice au patient. Dans ce groupe nous retrouvons les diurétiques, les anticoagulants et l'oxygénothérapie. Les diurétiques permettent de diminuer la rétention d'eau et de soulager le travail cardiaque droit par la diminution de la volémie<sup>641,642</sup>. Les anticoagulants peuvent être bénéfiques afin de prévenir tous les risques de thromboses chez les patients<sup>643</sup>. Et l'oxygénothérapie permet d'améliorer les chances de survie des patients avec une diminution de la capacité de diffusion du monoxyde de

carbone<sup>643</sup>. La pratique d'un exercice physique encadrée par des professionnel de la santé peut aussi être bénéfique pour certains patients HTAP<sup>644</sup>.

### 3.6.2 Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées visent avant tout à diminuer la vasoconstriction des artères pulmonaires. Ces traitements sont principalement composés de prostacyclines, de modulateurs de la synthèse d'oxyde nitrique et de la voie de l'endothéline (figure 19). Pour une faible population de patients répondants au test de réactivité vasculaire, l'utilisation de bloqueurs des canaux calciques peut être bénéfique. L'hypertension artérielle pulmonaire est, rappelons-le, une pathologie létale pour le patient, l'intervention de dernière intention reste la transplantation pulmonaire.

Nous nous proposons ici de présenter les différentes voies cibles de la vasoconstriction artérielle ensuite l'utilisation des bloqueurs calciques et nous terminerons par la transplantation pulmonaire.

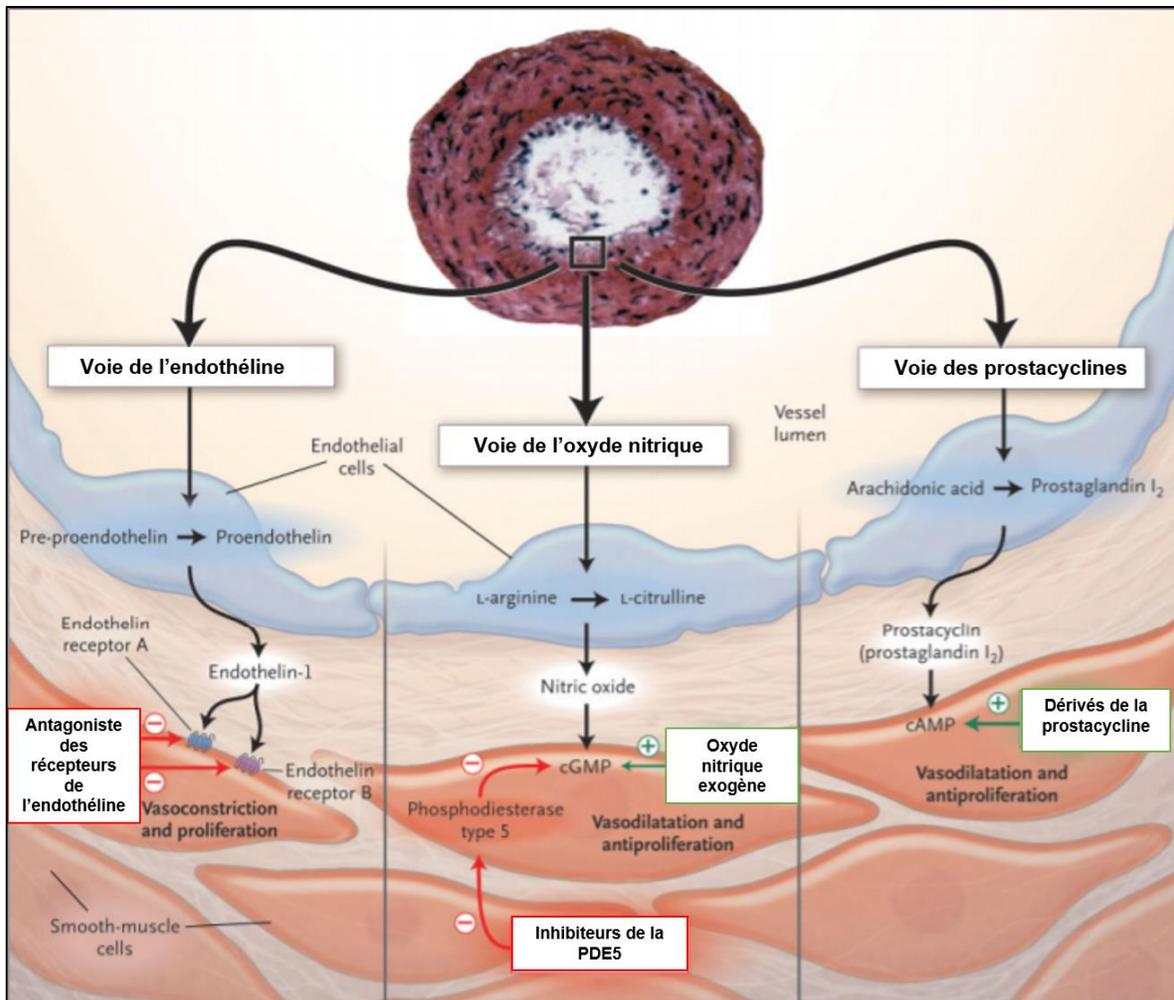


Figure 19. Les différentes thérapies ciblées en HTAP.

En haut : une coupe transversale d'une petite artère pulmonaire (<500  $\mu\text{m}$  de diamètre) d'un patient avec une hypertension artérielle pulmonaire sévère montre une prolifération accrue des cellules musculaires lisses et une obstruction marquée. Les cellules endothéliales des artères pulmonaires dysfonctionnelles (en bleu) ont diminué la production de prostacycline et d'oxyde nitrique endogène, avec une production accrue d'endothéline-1 - une condition favorisant la vasoconstriction et la prolifération des cellules musculaires lisses dans les artères pulmonaires (rouge). Les thérapies actuelles ou émergentes interfèrent avec des cibles spécifiques dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Figure adaptée de <sup>642</sup>.

### 3.6.2.a Modulation de la voie de l'endothéline 1

L'endothéline 1, sécrétée par l'endothélium vasculaire, possède un fort pouvoir vasoconstricteur, pro-inflammatoire et favorise la prolifération par son interaction avec ses deux récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>. Le récepteur ET<sub>A</sub> après son activation induit une vasoconstriction soutenue et une prolifération des cellules musculaires lisses. Quant au récepteur ET<sub>B</sub>, son activation promeut la production d'oxyde nitrique et de prostacycline.

Malgré des effets théoriques opposés, l'utilisation d'antagonistes aux deux récepteurs, permet de promouvoir la vasodilatation artérielle et d'inhiber le potentiel prolifératif<sup>645</sup>. Trois molécules sont actuellement approuvées pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire, le bosentan<sup>646</sup>, l'ambrisentan<sup>647</sup> et le macitentan<sup>648</sup>. Ces thérapies ont démontré un effet significatif sur la qualité de vie des patients. Le bosentan, un antagoniste des deux récepteurs, démontre des effets bénéfiques pour les patients HTAP, notamment sur leur capacité à l'effort et leur paramètres hémodynamiques<sup>649,650</sup>. Ces effets bénéfiques ont aussi été retrouvé lors de l'administration de macitentan<sup>651</sup> et d'ambrisentan<sup>652</sup>.

### 3.6.2.b Modulation de la voie de l'oxyde nitrique

L'oxyde nitrique d'un point de vue physiologique permet normalement une vasodilatation artérielle. Dans l'hypertension artérielle pulmonaire, la synthèse d'oxyde nitrique, par l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS), est diminuée puisque l'activité de l'enzyme est altérée<sup>653-656</sup>. La diminution d'oxyde nitrique induit une diminution de la concentration intracellulaire de guanosine monophosphate cyclique (GMPc). Au niveau vasculaire, la GMPc active la protéine kinase G responsable de l'activation de canaux potassiques présents à la membrane du sarcolemme. L'activation de ces canaux potassiques va induire une hyperpolarisation membranaire par une sortie de potassium à travers ceux-ci. Cette hyperpolarisation va inhiber les canaux calciques voltage dépendant induisant ainsi une diminution de l'entrée de calcium et donc une relaxation vasculaire.

La phosphodiesterase 5 (PDE5) est une enzyme prédominante dans le réseau vasculaire pulmonaire et est à l'origine de l'inactivation et de la dégradation rapide de la GMPc<sup>657</sup>. À ce jour, deux inhibiteurs de la PDE 5 sont approuvés dans le traitement de l'HTAP, le sildénafil et le tadalafil<sup>657</sup>. Le tadalafil présente une demi vie plus longue (17.5 heures) que le sildénafil et rend son administration plus facile à raison d'un comprimé journalier contre 3 de sildénafil<sup>658,659</sup>. Entre 2004 et 2008, des patients atteints d'HTAP traités au tadalafil ont démontré un effet positif sur leur capacité à fournir un effort et une amélioration de leur paramètres hémodynamiques cardiopulmonaires<sup>657,660-664</sup>.

### 3.6.2.c Les analogues de la prostacycline

La prostacycline (ou prostaglandine I<sub>2</sub>) est un produit de l'acide arachidonique au niveau de l'endothélium vasculaire permettant la relaxation des cellules musculaires lisses par la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Il existe dans la pharmacopée actuelle des analogues de la prostacycline tel que l'époprostenol qui fut pour la première fois administré en intraveineuse à un patient dans les années 1980<sup>665</sup>. L'administration à long terme de prostacycline démontre une nette amélioration des paramètres hémodynamiques et de la survie même chez des patients n'étant pas répondant aux traitements vasodilatateurs<sup>642,666,667</sup>. De plus, ces analogues ont démontré une efficacité notable sur la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires<sup>668</sup>.

L'administration se fait par intraveineuse de façon continue à l'aide d'un cathéter connecté à une pompe portable. Ce traitement n'est pas des plus facile à mettre en place et à maintenir de par l'inconfort que cela apporte aux patients et les risques d'infections associés (0,1 à 0,6 cas par patient par année)<sup>669</sup>. Étant donné la demi-vie de la prostacycline (quelques heures), des analogues de la prostacycline ont été développés afin d'obtenir une réponse plus longue et stable mais surtout pouvant être administré d'une autre façon. Les nouvelles molécules disponibles à ce jour peuvent être administrées par voie sous cutanée, orale ou encore par inhalation ce qui améliore grandement l'adhésion aux thérapies.

### 3.6.2.d Bloqueurs des canaux calciques

Comme présenté dans la partie 3.2.2.g, une exploration de la réactivité vasculaire pulmonaire permet de mettre en évidence les patients pouvant bénéficier d'un traitement aux bloqueurs de canaux calciques. Il est à noter qu'environ 10% des patients HTAP sont répondants au traitement, à long terme ceux-ci voient leur survie améliorée<sup>642,670,671</sup>. Le traitement à long terme des patients permet d'améliorer les paramètres hémodynamiques notamment la pression artérielle pulmonaire et le débit cardiaque également<sup>642</sup>.

### 3.6.3 Transplantation pulmonaire

Bien que de nombreuses thérapies permettent d'améliorer les conditions des patients, la pathologie reste néanmoins fatale. Si les thérapies proposées ne permettent pas d'améliorer

les conditions des patients, l'alternative ultime reste la transplantation pulmonaire. Depuis la première transplantation pulmonaire en 1986, le nombre de transplantation pulmonaire dans le monde ne cesse d'augmenter<sup>665</sup> (figure 20).

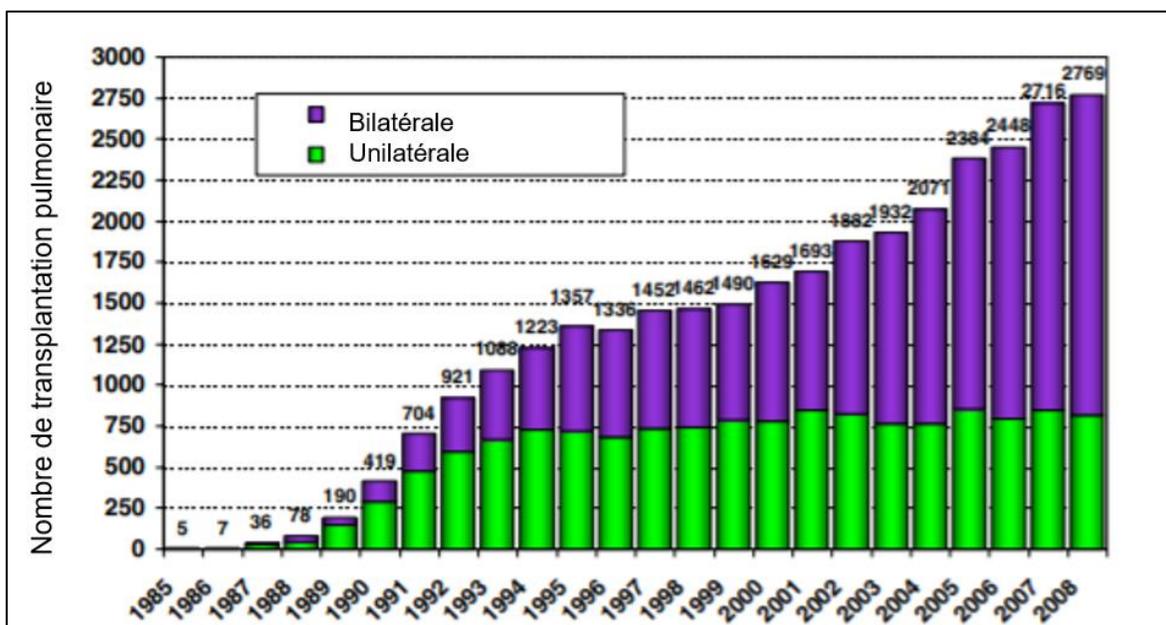


Figure 20. Nombre de transplantations pulmonaires mondiales.

Nombre de procédures de transplantation pulmonaire déclarées par année et par type de procédure (uni ou bilatérale). Figure adaptée de<sup>665</sup>.

### 3.6.4 Les interventions thérapeutiques potentielles

La défaillance cardiaque droite se trouve être un risque prédominant dans la mortalité liée à l'hypertension artérielle pulmonaire. Les thérapies actuelles visent principalement à réduire la charge de travail qui repose sur le ventricule droit en jouant sur la modulation de la précharge et la postcharge ainsi que la contractilité de celui-ci<sup>672</sup>. Il est à noter que certains patients atteints d'HTAP sévère peuvent vivre plusieurs années sans développer de défaillance cardiaque droite<sup>166</sup>. Les traitements actuels pour traiter l'hypertension artérielle pulmonaire ne permettent de soulager la fonction ventriculaire droite que de façon très légère.

### **L'inhibition du système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA)**

Le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA) permet le maintien de la pression sanguine en régulant la balance hydrique et sodique au niveau rénale. Ce système permet également au niveau systémique de moduler la résistance vasculaire<sup>673</sup>. Rapidement, lorsqu'une diminution du volume sanguin est détectée, la rénine va cliver l'angiotensinogène en angiotensine I qui sera convertie en angiotensine II. L'effet de l'angiotensine II induit par la suite une activation de la synthèse d'aldostérone par les glandes surrénales. L'aldostérone est responsable de la rétention hydrique et sodique dans le but d'augmenter le volume circulatoire et ainsi la pression sanguine<sup>674,675</sup>. En HTAP, il a été démontré que le SRAA était dérégulé et que voie de l'angiotensine était potentialisée et favorisait la prolifération des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires ainsi que la vasoconstriction<sup>676</sup>. Ces effets-là se retrouvent également au niveau du ventricule droit.

L'exploration thérapeutique de cette voie vient de nombreuses études démontrant que l'angiotensine II et ainsi l'aldostérone favorise l'apparition de fibrose cardiaque ainsi que l'hypertrophie ventriculaire. De plus, l'aldostérone, au niveau des cellules cardiaques, module l'homéostasie calcique favorisant la rigidité musculaire et module la structure tissulaire cardiaque.

Une inhibition des récepteurs à l'aldostérone, par des antagonistes tel que la spironolactone ou encore l'epleronone (plus spécifique), pourrait permettre d'atténuer les effets de l'aldostérone non seulement au niveau vasculaire mais également au niveau cardiaque.

Cependant, il resterait à étudier les effets de ces médicaments chez les patients HTAP, comme durant une étude pilote (NCT01712620) annoncée il y a quelques années visant à tester la spironolactone en HTAP<sup>676</sup>.

### **L'inhibition des récepteurs $\beta$ -adrénergiques**

Les récepteurs  $\beta$ -adrénergiques font partie de la grande famille des récepteurs couplés aux protéines G<sup>677</sup> et sont des acteurs importants dans la régulation de la fonction cardiaque<sup>678</sup>. L'activation de ces récepteurs permet d'augmenter la fréquence cardiaque<sup>679</sup> ainsi que l'hypertrophie<sup>680</sup>.

Dans le processus de défaillance cardiaque, la signalisation adrénergique est altérée et la sensibilité des récepteurs également<sup>681</sup>. Cependant, une stimulation des récepteurs induit des effets délétères chez les patients en favorisant l'apparition d'arythmies cardiaques. En revanche, il a été découvert que l'utilisation de bloqueurs permettait de diminuer la mortalité des patients présentant des symptômes cliniques de défaillance cardiaque<sup>682,683</sup>.

En effet, le recours aux inhibiteurs des récepteurs est retrouvé dans la défaillance cardiaque gauche et permet de réduire la mortalité des patients par un effet cardioprotecteur<sup>684,685</sup>. Cependant, ceux-ci ne sont pas très utilisés dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire<sup>102</sup>. En 2010, une étude a démontré des effets bénéfiques de l'utilisation de Carvedilol, un inhibiteur des récepteurs  $\beta$ -adrénergiques dans un modèle expérimental Sugen-Hypoxie<sup>686</sup>. Ces résultats ont conduit au développement d'une étude clinique (NCT00964678) afin de déterminer si une administration de Carvedilol chez des patients HTAP présentant une défaillance cardiaque pourrait être bénéfique. Les résultats de cette étude démontrent que l'utilisation du Carvedilol était sécuritaire et envisageable dans la prise en charge de la défaillance cardiaque droite chez des patients HTAP<sup>687</sup>. La prise du traitement semble améliorer le volume d'éjection sans pour autant engendrer des effets délétères sur la fonction cardiaque gauche.

### **Le recours à des vasodilatateurs**

L'utilisation de vasodilatateurs dans le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire permet d'alléger les symptômes de la pathologie. Ceux-ci ont été démontrés efficaces dans la diminution de la pression artérielle pulmonaire moyenne mais également dans la diminution de la pression systolique ventriculaire droite<sup>688</sup>. Cependant, un suivi particulier doit être accordé puisque l'administration systémique de vasodilatateurs pourrait engendrer des effets délétères tel qu'une hypotension.

L'inhalation d'oxyde nitrique par exemple permet d'améliorer la fraction d'éjection ventriculaire droite chez des patients en détresse respiratoire<sup>689</sup>.

Néanmoins, certains agents vasodilatateurs sont à proscrire lors de défaillance cardiaque imminente, c'est le cas notamment des modulateurs de la voie de l'endothéline ou encore les inhibiteurs des canaux calciques qui peuvent favoriser la mortalité<sup>690</sup>.

### **Modification de l'hygiène de vie des patients**

L'une des principales recommandations faite aux patients souffrants d'HTAP est la pratique légère d'exercice physique<sup>48</sup>. Dans la littérature scientifique, il est clairement démontré que la pratique sportive légère peut aboutir à un effet anti-inflammatoire important notamment dans plusieurs pathologies cardiovasculaires<sup>691</sup>. Concernant l'HTAP en particulier, plusieurs études ont mis en évidence un effet bénéfique de l'exercice physique sur les fonctions cardiaques<sup>692-694</sup>. Cet effet peut s'expliquer par la modulation du profil inflammatoire à la suite de la pratique physique comme démontré chez des patients atteints d'HTAP idiopathique<sup>695</sup> et également décrit dans le modèle MCT<sup>696,697</sup>.

Ces études ont mené au développement d'une étude clinique visant à déterminer les effets potentiels de la pratique sportive dans la fonction cardiaque droite chez des patients HTAP<sup>698</sup>.

#### **3.6.5 Les nouvelles stratégies thérapeutiques**

Malgré des stratégies thérapeutiques mises en place, celles-ci ne permettent pas de cibler le remodelage vasculaire, c'est pourquoi il est nécessaire de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques. À l'heure actuelle de multiples études cliniques sont en cours afin de tester le potentiel thérapeutique de plusieurs molécules chez les patients atteints d'HTAP. Les voies explorées sont nombreuses comme l'approche nutritionnelle, la thérapie cellulaire, la réhabilitation physique ou bien encore l'utilisation de thérapies utilisées dans le cancer.

D'un point de vue nutritionnel, des équipes tentent de déterminer si des modifications nutritionnelles pourraient permettre d'améliorer les conditions de vie des patients. Ces études cherchent à viser le confort quotidien des patients HTAP.

La réhabilitation physique comme nous l'avons mentionné trouve sa place dans les études cliniques actuelles afin de permettre de déterminer une façon de récupérer les fonctions musculaire et respiratoire chez les patients. Rappelons que les patients HTAP présentent des difficultés respiratoires se répercutant sur leur activité physique au quotidien. La réhabilitation physique permettrait à ces patients d'entretenir leur capacité respiratoire et physique<sup>699-701</sup>.

Dans le domaine de la thérapie cellulaire, l'étude clinique SAPPHIRE (NCT03001414) vise à établir l'efficacité et la tolérance d'une administration de cellules endothéliales progénitrices transfectées avec l'oxyde nitrique synthase endothéliale humaine à des patients présentant des symptômes sévères de la maladie. Une telle étude permettrait de remédier au déficit d'oxyde nitrique résultant d'une diminution de l'expression de l'oxyde nitrique synthase. La thérapie cellulaire est une voie thérapeutique prometteuse pour le traitement de l'hypertension artérielle pulmonaire. En effet, plusieurs études démontrent un effet bénéfique et sécuritaire<sup>702-704</sup>.

Bien que la majorité des études se focalisent sur les artères pulmonaires, locus premier du développement de la maladie, certaines études s'orientent sur l'amélioration de la fonction du cœur droit par l'utilisation de drogues telles que des bêtas bloquants, par exemple l'administration de Carvedilol (NCT02507011) comme nous l'avons mentionné précédemment.

Enfin, parmi les essais cliniques en cours, beaucoup ont pour but de tester des médicaments déjà utilisés dans d'autres maladies mais dont les études précliniques ont montré une efficacité dans le traitement de l'HTAP. Rappelons certaines similitudes entre l'HTAP et le processus cancéreux laissent à penser que certains médicaments utilisés dans les thérapies anti-cancéreuses pourraient s'avérer utiles pour traiter l'HTAP.

En effet, les molécules testées ont démontré des effets bénéfiques sur la progression de la maladie dans les modèles animaux HTAP et leur tolérance a déjà été testés dans d'autres pathologies comme c'est le cas par exemple de l'Olaparib connu sous le nom de Lynparza (AstraZeneca), inhibiteur de PARP, utilisé pour traiter les patients présentant des mutations héréditaires des gènes BRCA1 ou BRCA2 dans les cancers du sein, de la prostate et de l'ovaire.

Dans la liste des études cliniques en cours testant des médicaments formulés pour d'autres pathologies nous retrouvons également l'administration de RVX-208 comme nous l'avons mentionné dans la sous partie BRD4.

Le but de ces études est de déterminer si ces thérapies, déjà utilisés chez l'homme, peuvent permettre de cibler le remodelage vasculaire pulmonaire, berceau du développement de la pathologie.

### **3.7 HTAP, analogie avec le cancer**

C'est en 1998 que le modèle cancéreux de l'hypertension pulmonaire primaire fut suggéré<sup>705</sup>. Depuis, plusieurs observations ont mis en évidence que plusieurs mécanismes physiopathologiques à l'origine du remodelage artérielle dans l'HTAP présentaient des similitudes avec le cancer. Hanahan et Weinberg en 2000 ont publié un article relatant toutes les caractéristiques du cancer<sup>706</sup> en les présentant sous forme de mécanismes comme l'angiogenèse, la survie cellulaire ou bien le potentiel de prolifération illimitée. Se basant sur ces mécanismes-là, il en a découlé qu'en effet certains étaient communs au cancer et à l'HTAP, comme l'illustre la figure 21, ci-après<sup>707</sup>.

Tel que mentionné précédemment, lors de la progression de l'HTAP les caractéristiques comme la prolifération et la survie cellulaire, le profil énergétique et inflammatoire sont dérégulées. Ces caractéristiques sont elles aussi des caractéristiques du processus cancéreux<sup>705,708,709</sup> et pourraient être expliquées par l'action de modulateurs épigénétiques.

Ces similitudes permettent d'entrevoir des nouvelles stratégies thérapeutiques notamment dans l'utilisation de médicaments initialement prescrit pour certains cancers.

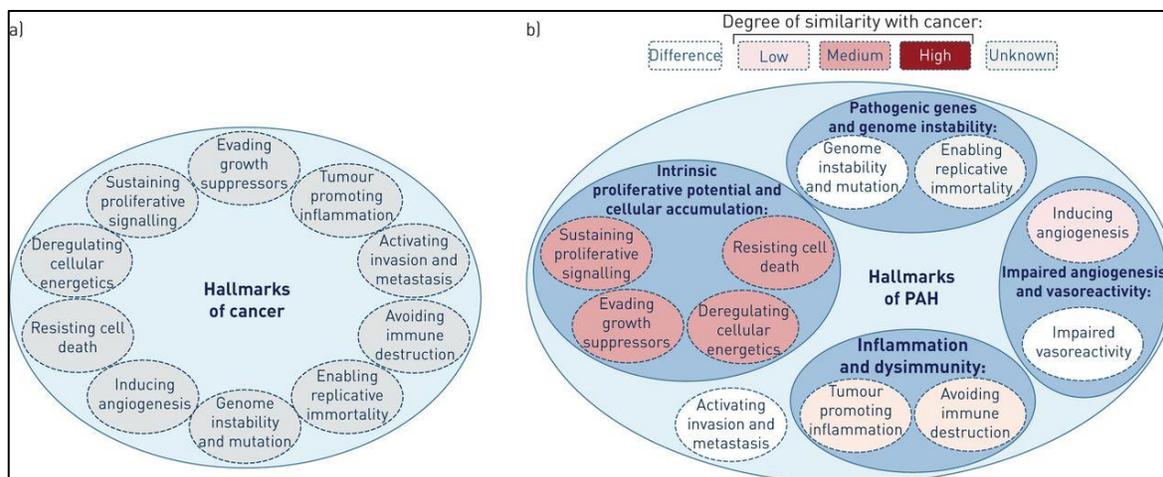


Figure 21. HTAP et cancer.

a) Les caractéristiques des processus cancéreux. b) Voies similaires entre le cancer et l'HTAP. Figure extraite de<sup>710</sup>.

Pour notre étude, nous nous sommes d'ailleurs basés sur ces similitudes pour découvrir notre protéine d'intérêt EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) dont nous discutons plus amplement dans la section 4 ci-après.

#### 4. EZH2: Enhancer of Zeste Homologue 2

Les similarités entre le cancer et l'HTAP nous ont amené à étudier une histone méthyltransférase nommée EZH2 (Enhancer of Zeste Homologue 2) jouant un rôle de modulateur épigénétique. En effet, dans le processus cancéreux, cette enzyme a été largement étudiée et il a été démontré que celle-ci joue un rôle prédominant dans la régulation de la prolifération accrue des cellules cancéreuses<sup>711,712</sup>. Comme nous l'avons présenté précédemment, les altérations épigénétiques peuvent aboutir au développement de l'HTAP en favorisant la transcription de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques. Nous nous sommes donc intéressés à son potentiel rôle dans le remodelage vasculaire en HTAP. Rappelons que le remodelage vasculaire des artères pulmonaires est la résultante d'une prolifération et d'une survie exagérée des cellules musculaires lisses.

De plus, celui-ci a été décrit comme un acteur cardioprotecteur dans le tissu cardiaque<sup>713</sup> puisque son inhibition favorise l'hypertrophie cardiaque et l'accumulation de fibrose<sup>713</sup>.

Rappelons également que le ventricule droit des patients HTAP subit un profond remodelage par hypertrophie et accumulation de fibrose entraînant à terme une défaillance cardiaque droite et inévitablement le décès du patient.

Son implication dans la prolifération et la survie cellulaire ainsi que dans le remodelage cardiaque fait d'EZH2 un candidat idéal à son étude dans l'hypertension artérielle pulmonaire.

Nous nous proposons donc dans un premier temps de décrire la fonction d'EZH2 d'un point de vue biologique puis nous nous attarderons sur les pathologies associées à une modification du niveau d'expression d'EZH2. Enfin nous terminerons sur le rôle d'EZH2 dans le développement et la physiologie cardiaque.

#### **4.1 Fonction biologique d'EZH2**

EZH2 est la sous unité catalytique du complexe polycomb repressive 2 (PRC2) hautement conservé entre les espèces<sup>714</sup>. En effet, le complexe PRC2 a été purifié et caractérisé chez l'humain mais aussi chez l'embryon de la drosophile<sup>715-717</sup>. Ce complexe est responsable de la répression de la transcription de gènes cibles par la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3-K27)<sup>715,718</sup>. Cette méthylation engendre une compaction de la chromatine rendant les gènes inaccessibles à la machinerie de transcription. La répression de gènes par le complexe PRC2 a été démontrée comme nécessaire au bon développement embryonnaire mais aussi à la différenciation cellulaire<sup>719-721</sup>.

Chez les mammifères, le complexe PRC2 est composé de 4 sous unités principales : EZH1 ou EZH2, SUZ12 (Suppressor of Zeste 12, protéine se liant à la chromatine<sup>722</sup>), EED (embryonic ectoderm development)<sup>720,723</sup> et RBAP46/RBAP48<sup>724</sup> (figure 22). À celles-ci s'ajoutent des protéines accessoires permettant de réguler la stabilité du complexe telle que AEBP2<sup>725</sup>. D'autres protéines accessoires jouent un rôle dans l'activité du complexe ou encore dans son recrutement aux gènes cibles<sup>720,726</sup>.

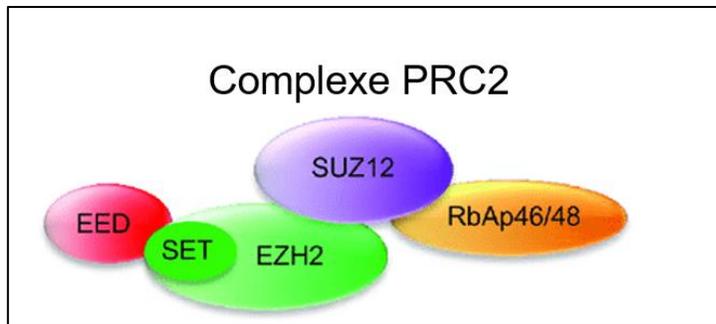


Figure 22. Le complexe PRC2.

Le complexe PRC2 (polycomb repressive complex 2) est composé de plusieurs sous unités permettant de le rendre fonctionnel. L'unité enzymatique EZH2, une unité de liaison à la chromatine SUZ12 ainsi que des unités stabilisatrices et accessoires. Figure adaptée de<sup>725</sup>.

D'un point de vue purement mécanistique, EZH2 est l'enzyme capable de méthyler l'histone 3 en transférant successivement des groupements méthyles provenant du donneur SAM (S-adenosyl-L-methionin) sur la lysine 27 de cette histone. L'enzyme possède un domaine catalytique SET responsable de son activité enzymatique<sup>727</sup>.

C'est d'ailleurs cette fonction qui est ciblée par les inhibiteurs spécifiques pharmacologiques d'EZH2, ces molécules entrent en compétition avec le donneur SAM<sup>712</sup> empêchant ainsi EZH2 d'obtenir le groupement méthyle nécessaire à la réaction.

Dans la littérature scientifique, la fonction prédominante rapportée d'EZH2 est une fonction de répression transcriptionnelle inhibant l'expression de gènes notamment de gènes répresseurs de tumeurs<sup>715,719</sup> ou de gènes régulant la différenciation cellulaire. Cette fonction répressive est dépendante de sa fonction de méthylation.

Cependant, plusieurs études ont démontré qu'EZH2 peut avoir une fonction activatrice de gènes cibles de façon dépendante ou indépendante de la méthylation<sup>711,728,729</sup> (figure 23).

Nous allons présenter dans un premier temps la fonction répressive d'EZH2 pour ensuite présenter sa fonction activatrice.

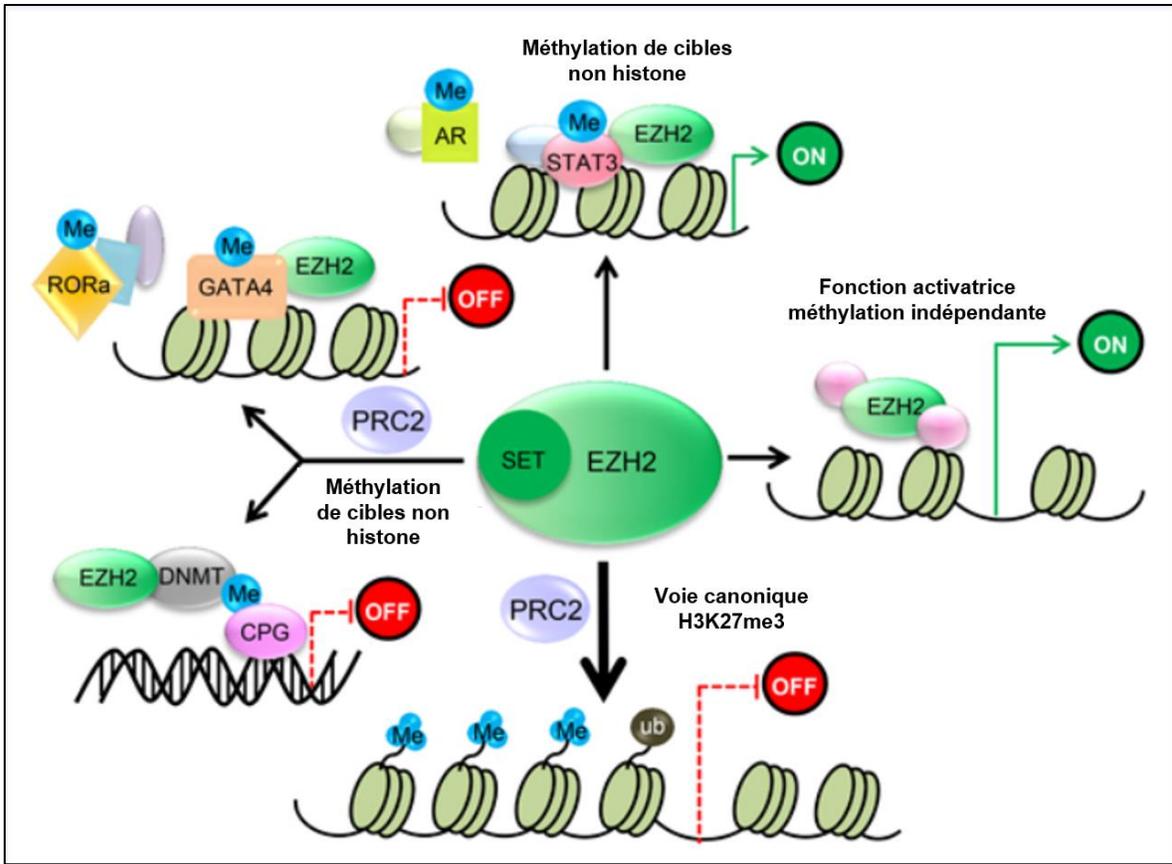


Figure 23. Fonction répressive et activatrice d'EZH2.

En bas : fonction de méthylation d'EZH2 sur l'histone 3 lysine 27 entraînant la compaction de la chromatine et donc une répression de gènes. A gauche : fonction répressive d'EZH2 sur des cibles autres que des histones. En haut : fonction activatrice d'EZH2 par la méthylation de cibles qui ne sont pas des histones telle que le facteur de transcription STAT3. A droite : fonction activatrice d'EZH2 indépendante de sa fonction de méthylation. Figure adaptée de<sup>725</sup>.

#### 4.1.1 EZH2 comme répresseur épigénétique

D'un point de vue de son rôle de répresseur dans un contexte non pathologique, EZH2 permet la régulation étroite de facteurs permettant le développement embryonnaire. En effet, celui-ci est un acteur très important dans le développement embryonnaire<sup>730-732</sup>.

EZH2 a été amplement décrit dans la littérature comme le facteur épigénétique méthylant l'histone 3 en position lysine 27 avec trois groupement méthyles successifs. Cette triméthylation est responsable de la compaction de la chromatine et en résulte une inhibition de la transcription de gènes<sup>733</sup>.

Cependant bien que l'histone 3 soit la cible préférentielle d'EZH2, il a été prouvé dans la littérature qu'EZH2 pouvait méthyler plusieurs cibles autres que l'histone 3.

En effet, EZH2 peut méthyler le facteur de transcription GATA4 en position Lys299<sup>734</sup> (figure 23). Cette méthylation empêche notamment l'acétylation de GATA4 par p300 et favorise ainsi la répression transcriptionnelle de GATA4 empêchant sa fonction de facteur de transcription<sup>734</sup>.

EZH2 de cette façon peut moduler plusieurs voies cellulaires, notamment, la régulation de la migration en méthylant la protéine Taline 1, actrice clé de la migration cellulaire<sup>735</sup>. C'est par l'intermédiaire de l'interaction entre EZH2 et Vav1, une protéine très importante dans les structures d'adhésion cellulaire, qu'EZH2 peut méthyler la Taline 1. La méthylation de la Taline 1 empêche sa liaison à l'actine fibrillaire (actine F) régulant ainsi la migration cellulaire<sup>735</sup>.

Une autre étude a démontré que la méthylation de ROR $\alpha$  (RAR-related orphan receptor alpha) par EZH2 pouvait réprimer l'expression de ses cibles<sup>736</sup>. Ce récepteur étant impliqué dans de multiples fonctions cellulaires, comme le métabolisme ou bien l'inflammation. EZH2 se lie directement à ROR $\alpha$  et méthyle la lys38 et entraîne une ubiquitination de celui-ci.

En dehors de la méthylation de ces facteurs, EZH2 a été démontré pouvant méthyler des enzymes telles que certaines ADN méthyltransférases notamment DNMT1<sup>737,738</sup> (Figure 23). Celui-ci peut donc agir au niveau de la méthylation de l'ADN et réprimer la transcription de gènes *via* la méthylation d'ADN méthyltransférases.

Toutes ces cibles d'EZH2 une fois méthylées ne peuvent remplir leur rôle initial et cela se répercute sur la répression transcriptionnelle de gènes.

#### 4.1.2 EZH2 comme activateur transcriptionnel

Comme nous l'avons mentionné plus haut, EZH2 possède une fonction d'activation qui est indépendante du complexe répressif PRC2<sup>739-741</sup>. En effet, la littérature scientifique met en valeur la fonction activatrice d'EZH2 qui contraste avec sa fonction de répression découverte initialement.

C'est ainsi que l'on découvre qu'outre la répression transcriptionnelle, des études ont montré qu'EZH2 permettait l'activation de facteurs de transcription en les méthylant, c'est le cas du facteur STAT3<sup>742</sup>. En effet, celui-ci se lie directement au facteur de transcription STAT3 pour le méthyle ce qui induira une augmentation de la phosphorylation en position Y705 et favorise ainsi l'activité de STAT3. Cette activité potentialisée par EZH2 promeut le développement de tumeurs<sup>742</sup>.

En dehors de sa fonction de méthylation, EZH2 démontre une capacité d'activation de la transcription méthylation indépendante<sup>743</sup> en agissant en tant que coactivateur transcriptionnel. En effet, celui-ci a été décrit dans une étude de Xu et ses collègues comme un activateur des complexes associés aux récepteurs androgéniques favorisant la croissance du cancer de la prostate résistant à la castration<sup>729</sup>. Il a également démontré par Kim et ses collègues qu'EZH2 pouvait directement activer la transcription de gènes de récepteurs androgéniques<sup>728</sup>.

Outre son interaction avec les récepteurs androgéniques, il a été démontré dans le cancer du sein, qu'EZH2 pouvait lier le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B) pour former un complexe permettant la transcription des gènes cibles de celui-ci<sup>744</sup>. De façon similaire, d'autres études mettent en évidence la capacité d'EZH2 à coopérer avec des facteurs de transcription afin de promouvoir le potentiel tumoral de ceux-ci<sup>745-747</sup>. C'est le cas notamment de sa coopération avec le facteur de transcription E2F1 très impliqué dans la prolifération cellulaire ainsi que l'apoptose<sup>748,749</sup>. L'étude menée par Tabbal et ses collègues démontre une coopération entre EZH2 et E2F1 permettant de stimuler l'expression de gènes favorisant le développement d'un carcinome corticosurrénalien<sup>750</sup>. Cette coopération favorise notamment la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, la prolifération et la mitose.

En somme, nous avons présenté ci-dessus, le rôle répresseur d'EZH2 ainsi que sa fonction d'activateur transcriptionnel. Par ces deux fonctions, EZH2 peut moduler l'expression de plusieurs gènes cibles et favoriser, notamment, le développement cancéreux.

Nous nous proposons de présenter ci-après le rôle majeur d'EZH2 dans le développement et la progression de cancer.

## 4.2 EZH2 dans le cancer

Les cellules cancéreuses développent une stratégie exceptionnelle permettant leur survie et leur prolifération dans un environnement de stress cellulaire. Dans la littérature, EZH2 a été énormément étudié dans le développement de cancers, et celui-ci représente une cible thérapeutique testée présentement dans plusieurs études cliniques. Ce facteur épigénétique module plusieurs voies étroitement reliées au développement de tumeurs, c'est le cas notamment de la survie et de la prolifération cellulaire, de l'invasion cellulaire<sup>751-754</sup>, de l'autophagie<sup>755</sup> ou encore de l'inflammation<sup>756</sup>.

Tout d'abord, ce facteur épigénétique a été décrit comme étant très impliqué dans la prolifération excessive et la résistance à l'apoptose des cellules cancéreuses<sup>757-760</sup>.

Par ailleurs, le niveau d'expression de la protéine est fortement corrélé au pronostic vital des patient atteints de cancer, notamment le cancer de la prostate<sup>760,761</sup>. Il en est de même pour d'autres types de cancers, comme le cancer du sein ou bien le cancer de l'endomètre, ou des niveaux élevés d'EZH2 corrélerent avec l'agressivité du cancer<sup>762</sup>.

La surexpression d'EZH2 potentialise sa capacité à réprimer l'expression de certains gènes notamment des gènes antitumoraux ce qui favorise le développement tumoral.

De plus, l'inhibition d'EZH2 a démontré un effet bénéfique sur la prolifération et la survie cellulaire<sup>763</sup>, en effet son inhibition permet de diminuer la prolifération et la survie des cellules cancéreuses par différentes voies cellulaires<sup>757,764-768</sup>, notamment le cycle cellulaire ou l'inflammation.

Certains cancers peuvent se développer à la suite d'une diminution ou d'une altération de la voie de l'autophagie<sup>769</sup>. Le processus d'autophagie cellulaire est une voie physiologique permettant de maintenir une homéostasie cellulaire favorable mais aussi de répondre à un quelconque stress physiologique ou pathologique<sup>770</sup>. Il a été rapporté qu'EZH2 pouvait intervenir dans la voie de l'autophagie dans certains cancers<sup>771</sup>. Cette altération de l'autophagie par EZH2 dans le cancer colorectale<sup>755</sup> ou le cancer du colon<sup>772</sup> est aussi associée à une altération de l'apoptose et favorise une meilleure survie cellulaire.

L'invasion cellulaire favorise la progression cancéreuse et augmente le risque de mortalité et de morbidité des patients. Lorsque les cellules tumorales acquièrent la capacité de pénétrer les tissus cela favorise leur dissémination à travers l'organisme et le développement de sites

secondaires de prolifération<sup>773,774</sup>. EZH2 est responsable de la répression de plusieurs gènes anti-métastatiques favorisant ainsi l'invasion cellulaire<sup>753,754</sup>. De plus, il a été démontré que l'inhibition d'EZH2 se retrouve être bénéfique pour freiner le développement de métastases<sup>751,752</sup>.

Dans de nombreux cancers, notamment les cancers hématologiques, le gène EZH2 présente des mutations de type gain de fonction qui favorisent l'hyperméthylation de H3K27me3<sup>775-776</sup>. Ces mutations favorisent une prolifération et une invasion cellulaire importante mettant en jeu le pronostic vital des patients<sup>777</sup>.

Le système immunitaire joue un rôle prépondérant dans le développement et la progression de cancers. En effet, la présence d'une inflammation chronique est une caractéristique centrale des cancers<sup>778-780</sup> pouvant résulter d'altérations du système immunitaire. EZH2 est requis pour le recrutement et la potentialisation du rôle immunosuppresseur des cellules T régulatrices aux sites inflammatoires<sup>781</sup>. Cibler spécifiquement EZH2 dans ce cas engendre une augmentation de la réponse anticancéreuse du système immunitaire et prévient l'apparition de tumeurs<sup>756</sup>.

Enfin, lorsqu'on se focalise sur le rôle d'EZH2 dans le développement cancéreux, nous pouvons remarquer que celui-ci peut agir en tant que répresseur ou bien d'activateur transcriptionnel. Ces fonctions lui confèrent un pouvoir oncogène favorisant la prolifération accrue et la survie des cellules cancéreuses.

Afin de tester le potentiel thérapeutique de l'inhibition d'EZH2 dans le traitement de cancers, plusieurs molécules ont été développées afin de cibler le plus spécifiquement ce facteur épigénétique. Le premier inhibiteur largement utilisé dans les modèles expérimentaux est le 3-deazaneplanocin A (DZNep) réprimant l'activité méthylation dépendante du SAM<sup>782</sup> et présentant une efficacité antitumorale démontrée<sup>783</sup>. Néanmoins, cet inhibiteur n'est pas spécifique et peut induire une inhibition globale de la méthylation d'histone favorisant la réactivation de certains gènes rendant cet inhibiteur toxique pour les modèles animaux<sup>783</sup>.

Les résultats initiaux ont permis de développer de nouvelles molécules plus spécifiques de la catégorie des inhibiteurs compétitifs du donneur SAM.

L'EPZ-6438 (tazemetostat) est un inhibiteur hautement sélectif<sup>784</sup> présentant de meilleurs paramètres pharmacocinétiques permettant une administration facilitée chez les patients. En 2013, l'étude de l'efficacité de cet inhibiteur a été explorée au cours d'une étude clinique de phase I/II sur des lymphomes (NCT01897571). Les résultats préliminaires de ces premières explorations ont démontré le caractère sécuritaire de son administration ainsi qu'un effet inhibiteur efficace<sup>785,786</sup>. D'autres études cliniques sont encore en cours afin d'étudier les effets de cet inhibiteur sur différents types de cancers<sup>787</sup>.

Parmi les études cliniques en cours, nous retrouvons un second inhibiteur hautement sélectif le GSK126. Cet inhibiteur a démontré des effets prometteurs dans les modèles précliniques de nombreux cancers<sup>788-790</sup> et est actuellement en étude clinique phase I sur des lymphomes<sup>791</sup> (NCT02082977).

A noter que ce sont ces deux inhibiteurs spécifiques qui ont été utilisés dans notre étude.

### **4.3 EZH2 dans le développement et la physiologie cardiaque**

En dehors de son rôle dans le développement de certains cancers, EZH2 a été décrit dans le développement et la mise en place des structures cardiaques ainsi que dans le processus d'hypertrophie cardiaque. Nous nous proposons de mettre en évidence tout d'abord son implication dans le développement cardiaque pour ensuite nous attarder sur son rôle dans l'hypertrophie cardiaque.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, le complexe PRC2 est très impliqué au cours du développement<sup>724</sup> notamment par sa fonction enzymatique *via* EZH2<sup>792,793</sup>.

Le développement normal des structures cardiaques est essentiel à la survie d'un embryon, et est caractérisé par un processus complexe de remodelage<sup>794</sup>.

Il a été démontré que la répression *via* la méthylation d'histones permettait de stabiliser la structure de la chromatine et maintenait la répression transcriptionnelle dans les cellules progénitrices embryonnaires cardiaques<sup>795</sup>. EZH2 est requis tout au long du développement cardiovasculaire en déposant une marque de méthylation H3K27<sup>713,794,796,797</sup>. En effet, celui-ci permet la mise en place des structures cardiaques et leur remodelage. Après la naissance, la présence d'EZH2 est primordiale pour réprimer l'expression de gènes responsables du

développement cardiaque<sup>713</sup>. Un défaut dans cette régulation engendre des malformations cardiaques menant à des cardiopathies congénitales à la naissance<sup>798</sup>.

Lors d'une délétion du gène codant pour EZH2 dans la région responsable du développement du ventricule droit, du septum interventriculaire et de l'interface ventricule-artère (aire antérieure cardiaque)<sup>799</sup>, a démontré un potentiel anti-hypertrophique et anti-fibrotique d'EZH2<sup>713</sup>. En effet, l'hypertrophie et la fibrose cardiaque n'a été observé que dans la paroi ventriculaire droite des animaux ayant une délétion d'EZH2<sup>713</sup>.

EZH2 semble réprimer certains gènes responsables de l'hypertrophie et de la fibrose cardiaque, tel que *Nppb*, *Nppa* ou encore *Myh7*. En effet, la levée de la répression, par la perte de fonction d'EZH2, favorise l'hypertrophie et la fibrose cardiaque *via* une augmentation de l'expression de ces gènes (par l'intermédiaire de la protéine Six1 (Sineoculis homeobox homolog1))<sup>713</sup>. EZH2 représente donc un acteur important dans la réponse à un signal hypertrophique.

Dans la littérature, le complexe PRC2 a été associé à la défaillance cardiaque puisque la répression épigénétique du complexe se retrouve diminuée dans un cœur en défaillance<sup>800</sup>.

L'expression d'EZH2 dans le tissu cardiaque peut être réprimée par différents facteurs, tels que des microARN par exemple<sup>800</sup>, favorisant ainsi une réponse hypertrophique.

Il est à noter que le potentiel de régénération et de réparation cardiaque à l'âge adulte est limité. En effet, après la naissance la capacité de prolifération des cardiomyocytes diminue progressivement<sup>801</sup>.

#### **4.4 EZH2 et son implication dans d'autres pathologies**

En tant que facteur épigénétique, EZH2 a été démontré jouant un rôle dans plusieurs processus physiologiques et pathologiques. Nous présenterons ici les différentes voies et pathologies dans lesquelles EZH2 est décrit dans la littérature scientifique.

EZH2 est un acteur important lors du développement et de la différenciation cellulaire<sup>714,802</sup>. Cependant, outre son implication dans le processus cancéreux, EZH2 a été démontré associé à une rare anomalie congénitale, le syndrome de Weaver<sup>803-808</sup>. Ce syndrome est caractérisé

par une croissance rapide débutant durant la période prénatale et se poursuivant aux premières années après la naissance. Cette croissance rapide produit des anomalies neurologiques et musculosquelettiques ainsi que des malformations osseuses. Les premiers cas décrits dans la littérature datent de 1974<sup>808</sup> et ont été retrouvés dans deux familles présentant des anomalies musculaires et osseuses. En 2012 des mutations sur le gène codant pour EZH2 ont été découvertes, notamment chez l'une des premières familles décrite en 1974<sup>807</sup>. Les mutations du gène retrouvées chez les patients atteints du syndrome altèrent la fonction de méthylation de l'histone<sup>806</sup>. En effet, certaines mutations retrouvées chez des patients atteints du syndrome de Weaver engendrent une diminution de la méthylation de la lysine 27 de l'histone 3<sup>804</sup>.

D'autres voies physiologiques sont perturbées lorsqu'EZH2 subit des modifications d'expression comme la régulation de l'inflammation notamment en ciblant des acteurs du processus inflammatoire tels que les macrophages ou certaines interleukines<sup>809-812</sup>. EZH2 a aussi été décrit comme médiateur de la réponse inflammatoire allergique dans l'asthme<sup>813</sup>.

Comme nous l'avons vu plus tôt, EZH2 joue un rôle dans le processus d'autophagie au sein de certains cancers. Néanmoins, celui-ci a aussi été démontré comme régulateur négatif de l'autophagie au sein de cellules musculaires lisses de la paroi vasculaire aortique<sup>814</sup>.

Finalement, les multiples études indiquent qu'EZH2 est un facteur épigénétique impliqué dans plusieurs voies biologiques et une modification d'expression peut avoir des effets délétères. Les études d'inhibition démontrent également un effet thérapeutique non négligeable, notamment dans le traitement de certains cancers.

## Objectifs et hypothèses de recherche

Comme nous l'avons vu précédemment, l'hypertension artérielle pulmonaire est une pathologie qui à ce jour ne possède aucun traitement curatif. Le besoin urgent de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques se fait donc ressentir.

Cette pathologie est caractérisée par de multiples dérèglements cellulaires ayant des origines diverses. Nous nous sommes penchés sur les facteurs épigénétiques puisque ceux-ci sont de plus en plus associées au développement de la pathologie comme nous avons pu le présenter précédemment. Ces facteurs sont de plus en plus étudiés dans la littérature notamment au niveau du développement cancéreux puisque ceux-ci peuvent favoriser la transcription de gènes pro-prolifératifs et anti-apoptotiques<sup>815,816</sup>. De nos jours, de nombreux outils pharmacologiques sont disponibles permettant de pouvoir cibler ces facteurs et ainsi pouvoir moduler leurs réponses cellulaires. Cela facilite l'exploration de nouvelles voies thérapeutiques potentielles en HTAP.

Parmi ces facteurs épigénétiques, nous nous sommes intéressés à l'histone méthyltransférase EZH2, qui comme nous l'avons présenté est un acteur important dans le développement et la progression de cancers. Étant donné que ce facteur est très important dans la prolifération et la survie importante des cellules cancéreuses, nous avons émis l'hypothèse que celui-ci serait également responsable de la prolifération et la survie des CMLAPs-HTAP.

Nos objectifs ont été d'étudier, dans un premier temps, son niveau d'expression dans les tissus pulmonaires de patients HTAP. Ensuite, nous nous sommes attardés sur son implication potentielle dans la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires des patients HTAP. Enfin, nous nous sommes concentrés sur le mécanisme cellulaire par lequel EZH2 pouvait mener à ses effets sur ces cellules.

Dans la seconde partie de notre étude, nous nous sommes basés sur le rôle cardioprotecteur d'EZH2 décrit dans la littérature<sup>817</sup>. Comme nous l'avons mentionné, EZH2 a été décrit comme un acteur anti-hypertrophique et anti-fibrotique dans le tissu cardiaque. Étant donné

la présence d'un remodelage important du ventricule droit en HTAP, nous avons émis l'hypothèse qu'EZH2 permettrait de protéger le cœur en freinant le processus d'hypertrophie et de fibrose cardiaque droite.

Les objectifs de ce volet de l'étude ont été de déterminer le niveau d'expression d'EZH2 dans les ventricules droits de patients comparativement à des personnes saines. Ensuite, de déterminer si celui-ci joue un rôle dans les processus hypertrophique et fibrotique pour enfin étudier par quel mécanisme cellulaire celui-ci fait ces effets.

## **Méthodologie générale**

### **Tissus et cellules humaines**

Les échantillons de poumons humains contrôles ont été prélevés lors d'une procédure de résection tumorale (à distance de la tumeur pulmonaire). Les échantillons de patients malades ont été prélevés lors de transplantation pulmonaire ou très peu de temps après le décès. Les tissus de ventricules droits ont été obtenus à la suite de chirurgie cardiaque ou bien d'autopsie avec consentement. La catégorisation des patients malades a été validée par cathétérisme cardiaque droit. Les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires ont été isolées d'artères pulmonaires distales de patients HTAP et contrôles. Pour les expériences, les cellules ont été utilisées entre passage 6 et 9 et ont été maintenues en culture dans un milieu commercial spécifique (supplémenté de 10% de sérum fœtal bovin et 1% d'antibiotique/antimycotique). Pour notre étude du rôle d'EZH2 dans le tissu cardiaque, la lignée cellulaire H9C2 fut utilisée ainsi que des cardiomyocytes néonataux isolés d'embryons de rats par digestion enzymatique. Ces deux types cellulaires sont utilisés dans la littérature pour mimer les effets de l'hypertrophie *in vitro*<sup>818</sup>. Afin de stimuler l'hypertrophie cellulaire *in vitro*, la phényléphrine (PE) fut utilisée.

### **Les modèles animaux et la mesure des paramètres hémodynamiques**

Afin d'étudier le potentiel rôle d'EZH2 dans le tissu cardiaque, nous avons eu recours aux modèles monocrotaline, présenté précédemment, et PAB (Pulmonary Artery Banding) que nous présentons ci-dessous.

En 1952, Muller et Dammann décrivent une chirurgie temporaire dans le but de soigner des enfants atteints de maladie congénitale cardiaque associée à une hypertension artérielle pulmonaire<sup>819</sup>. L'objectif de cette chirurgie était de protéger les poumons d'un flux sanguin excessif en attendant un meilleur moment pour faire subir une chirurgie plus lourde aux enfants<sup>820</sup>. En effet, les maladies cardiaques congénitales sont associées à une hypertension pulmonaire par un reflux sanguin trop important au niveau de l'artère pulmonaire. Ce flux excessif provient de la communication entre les deux ventricules, le ventricule droit recevant du sang du ventricule gauche étant donné sa pression plus faible à la base.

Pour le modèle animal, la chirurgie consiste à réaliser une ligation de l'artère pulmonaire (pulmonary artery banding) afin de réduire son diamètre. Avec ce rétrécissement de diamètre, le ventricule droit compensera initialement mais n'empêchera pas la défaillance cardiaque droite. Ce modèle permet d'étudier la progression du stade compensé au stade décompensé, puisque à ce jour cette transition n'est pas encore totalement comprise<sup>821</sup>.

D'un point de vue technique chirurgicale, brièvement, les rats sont anesthésiés avec de l'isoflurane puis intubés. Une sternotomie médiane est réalisée, et l'artère pulmonaire est ensuite disséquée de l'aorte et de l'oreillette gauche. L'artère pulmonaire est ensuite ligaturée autour d'une aiguille de calibre 19G, avec un fil de suture en soie. Une fois la suture réalisée, l'aiguille est retirée. Des rats témoins subissent également la même procédure chirurgicale mais sans la ligation.

Une fois les traitements effectués sur les modèles animaux, ceux-ci ont été euthanasiés en respect des protocoles éthiques. Des mesures hémodynamiques ont été obtenues peu avant l'euthanasie par cathétérisme cardiaque droit sous anesthésie générale par isoflurane 2-3%. Brièvement, la procédure chirurgicale débute par une incision (environ 1 cm) dans la partie ventrale droite du cou de l'animal. Les tissus sont dilacérés avec précaution de façon à entrevoir la veine jugulaire externe droite. Après avoir mis en tension la veine jugulaire, une fine incision est effectuée afin de pouvoir y introduire un cathéter en polyéthylène connecté à un transducteur de pression. La sonde est ensuite lentement poussée le long de la veine jugulaire puis dans la veine cave pour atteindre l'oreillette droite. Une fois dans l'oreillette

droite, la sonde est guidée dans le ventricule droit permettant de mesurer les pressions dans cette chambre cardiaque (figure 24). Ces mesures effectuées dans le ventricule droit sont la pression systolique du VD (RVSP : right ventricle systolic pressure), la pression à la fin de la diastole (RVEDP : right ventricle end diastolic pressure) ainsi que le débit cardiaque (CO). La sonde est ensuite guidée lentement dans l'artère pulmonaire afin de mesurer la pression artérielle pulmonaire (figure 24). À la suite des mesures hémodynamiques les rats sont euthanasiés et les différents organes d'intérêt sont récoltés et conservés pour les expériences. La mesure de ces paramètres hémodynamiques est nécessaire à l'évaluation de l'induction de la pathologie dans les modèles expérimentaux mais aussi primordiale pour évaluer les effets d'une thérapie.

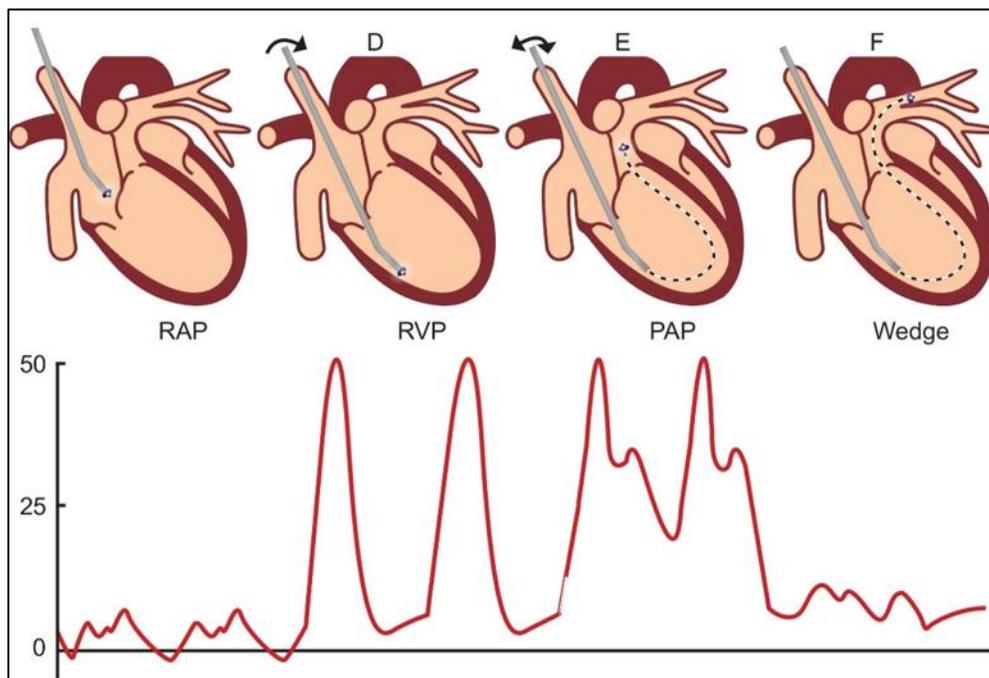


Figure 24. Cathétérisme cardiaque droit.

RAP : pression dans l'oreillette droite. RVP : pression dans le ventricule droit. PAP : pression dans l'artère pulmonaire. Tracé des pressions obtenues au cours d'un cathétérisme cardiaque droit. Figure extraite de<sup>822</sup>.

# **Chapitre I: Implication of EZH2 in the pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells in PAH: a transcriptomic and proteomic approach**

Authors: Karima Habbout<sup>1</sup>, Junichi Omura<sup>1</sup>, Charifa Awada<sup>1</sup>, Alice Bourgeois<sup>1</sup>, Yann Grobs<sup>1</sup>, Vinod Krishna<sup>2</sup>, Sandra Breuils-Bonnet<sup>1</sup>, Eve Tremblay<sup>1</sup>, Ghada Mkannez<sup>1</sup>, Sandra Martineau<sup>1</sup>, Valérie Nadeau<sup>1</sup>, Florence Roux-Dalvai<sup>3</sup>, Mark Orchowski<sup>1</sup>, Jey Jeyaseelan<sup>2</sup>, David Gutstein<sup>2</sup>, François Potus<sup>1</sup>, Steeve Provencher<sup>1,4</sup>, Sébastien Bonnet<sup>1,4</sup>, Roxane Paulin<sup>1,4</sup> and Olivier Boucherat<sup>1,4</sup>, \*

<sup>1</sup> Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec City, Québec, Canada.

<sup>2</sup> Janssen Research & Development, Spring House, PA, USA

<sup>3</sup> Proteomics platform, CHU de Quebec, Université Laval Research Center, Quebec City, Québec, Canada.

<sup>4</sup> Department of Medicine, Université Laval, Québec City, Québec, Canada.

\* Correspondence: [olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca)

Pulmonary Hypertension research Group  
IUCPQ Research Centre  
2725, chemin Sainte-Foy  
Québec, QC  
Canada, G1V 4G5  
Phone: (418) 656-8711 ext 1487  
E-mail: [olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca)

Article publié en mars 2021 dans International Journal of Molecular Science

## Résumé

L'HTAP est caractérisée par une augmentation de la pression artérielle pulmonaire, une insuffisance ventriculaire droite et une mort prématurée. La prolifération et de la résistance à l'apoptose des CMLAP favorise un remodelage vasculaire. Des études indiquent un rôle important d'EZH2 dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses, cependant, son implication dans l'HTAP reste inconnue. Dans notre étude, nous avons démontré qu'EZH2 est surexprimé dans les tissus pulmonaires et les CMLAPs-HTAP ainsi que dans deux modèles expérimentaux. Nous avons montré qu'EZH2 favorise la prolifération et la survie des CMLAPs-HTAP. Par une approche multiomique, nous avons constaté que l'inhibition d'EZH2 régule l'expression de facteurs impliqués dans le cycle cellulaire, notamment des cibles d'E2F, et contribue à maintenir la production d'énergie. Dans l'ensemble, cette étude démontre que la surexpression d'EZH2 contribue à la prolifération et la survie des CMLAPs-HTAP et suggère qu'EZH2 ou des facteurs en aval pourraient servir de cibles thérapeutiques.

## **Abstract**

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive disorder characterized by a sustained elevation of pulmonary artery (PA) pressure, right ventricular failure, and premature death. Enhanced proliferation and resistance to apoptosis (as seen in cancer cells) of PA smooth muscle cells (PASMCs) is a major pathological hallmark contributing to pulmonary vascular remodeling in PAH, for which current therapies have only limited effects. Emerging evidence points toward a critical role for Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) in cancer cell proliferation and survival. However, its role in PAH remains largely unknown. The aim of this study was to determine whether EZH2 represents a new factor critically involved in the abnormal phenotype of PAH-PASMCs. We found that EZH2 is overexpressed in human lung tissues and isolated PASMCs from PAH patients compared to controls as well as in two animal models mimicking the disease. Through loss- and gain-of-function approaches, we showed that EZH2 promotes PAH-PASMC proliferation and survival. By combining quantitative transcriptomic and proteomic approaches in PAH-PASMCs subjected or not to EZH2 knockdown, we found that inhibition of EZH2 downregulates many factors involved in cell-cycle progression, including E2F targets, and contributes to maintain energy production. Notably, we found that EZH2 promotes expression of several nuclear-encoded components of the mitochondrial translation machinery and tricarboxylic acid cycle genes. Overall, this study provides evidence that, by overexpressing EZH2, PAH-PASMCs remove the physiological breaks that normally restrain their proliferation and susceptibility to apoptosis and suggests that EZH2 or downstream factors may serve as therapeutic targets to combat pulmonary vascular remodeling.

## Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease defined by a mean pulmonary artery (PA) pressure at rest greater than 20 mmHg. Pathological changes in this disease involve vasoconstriction and remodeling of distal PAs, leading to increased vascular resistance, right ventricular failure, and premature death [1,2]. Despite major effort to understand the complex and interrelated pathways underlying PAH, current available drugs that primarily address the vasoconstrictive phenotype fail to substantially improve patient outcomes, thus necessitating redirection of therapeutic strategies [3,4].

Excessive proliferation and resistance to apoptosis of PA smooth muscle cells (PASMCs), as observed in cancer cells, are considered as critical contributors to vascular remodeling in PAH [1,2]. A complex web of alterations that converge towards the acquisition and maintenance of this abnormal phenotype has been documented. Among these, PAH-PASMCs undergo improper mitochondrial dynamics coupled with a multifaceted metabolic reprogramming with a shift from oxidative phosphorylation to aerobic glycolysis [5] accompanied by increased glutaminolysis [6]. Alongside this bioenergetic adaptation to fulfill their biosynthetic demands during proliferation, PAH-PASMCs have developed different strategies to tolerate stress and promote their survival, such as enhanced DNA repair capacity and autophagy [1], pinpointing the complex mechanisms underlying PAH.

Over the last few years, epigenetic alterations with functional impacts on gene expression such as DNA methylation, histone modifications, and noncoding RNAs have gained significant interest as drivers of pulmonary vascular remodeling [7]. The influence of epigenetic dysregulation in the abnormal PAH-PASMC behavior is perhaps best exemplified by in vitro data showing that PAH cells isolated from PAH patients exhibit a persistently hyperproliferative, apoptosis-resistant, and proinflammatory phenotype over several passages [8]. Owing to the ability of one single epigenetic modifier to regulate the expression of multiple genes involved in distinct cellular pathways affected, epigenetic modifiers are considered to be attractive therapeutic targets in complex diseases. Nevertheless, although epigenetic modifications are increasingly appreciated as an important contributing factor to PAH, the nature of epigenetic modifier enzymes crucially involved in disease development and progression remains largely unknown.

Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2), the catalytic component of the polycomb repressive complex 2 (PRC2), is responsible for H3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3), a chromatin mark associated with gene repression [9]. EZH2 was documented to be overexpressed in a wide range of cancer types, including lung, liver, prostate, and breast cancers [9]. By inhibiting the expression of tumor suppressor genes, EZH2 was shown to govern the acquisition of a prosurvival and pro-proliferative phenotype providing rationale for PRC2 inhibition as a novel antineoplastic strategy. However, mounting evidence indicates that EZH2-mediated H3K27 trimethylation and subsequent gene silencing is not sufficient to account for all functions of EZH2 in cancer. Indeed, besides its PRC2-dependent methylation function, EZH2 was also documented in cancer cells to physically interact with various proteins to positively regulate their protein stability [10] as well as to cooperate with several transcription factors to stimulate gene transcription [11–15]. Thus, EZH2 appears to rely on multiple cell context-dependent mechanisms to facilitate neoplastic transformation and sustain tumor growth. Although EZH2 was previously shown to be implicated in right ventricular dysfunction [16], its role in pulmonary vascular remodeling process in the setting of PAH remains largely unknown.

In the present study, we demonstrate that EZH2 is overexpressed in PASMCs from PAH patients and animal models mimicking the disease enhancing their proliferation and resistance to apoptosis. By combining transcriptome and proteome profiling in PAH-PASMCs subjected or not to EZH2 knockdown, we found that EZH2 positively regulates a large array of factors critically involved in cell-cycle progression, mitochondrial translation, and tricarboxylic acid (TCA) cycle. Accordingly, we found that molecular inhibition of EZH2 in PAH-PASMCs compromises mitochondrial respiratory capacity. Our study therefore uncovered a critical function of EZH2 in pulmonary vascular remodeling associated with PAH.

## Results

### **EZH2 Levels in Human PAH and Experimental Models**

To determine whether EZH2 is implicated in the obliterative vasculopathy that characterized PAH, we first measured its protein expression level in lungs, dissected PAs (< 1000  $\mu$ m in diameter), and isolated PASMCs from control and PAH patients. Regardless of the anatomical level, increased expression of EZH2 was observed in PAH patients (Figure 1A). We next evaluated whether similar changes also occur in animal models recapitulating PAH. To this end, dissected PAs from monocrotaline (MCT)- and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-treated rats were used. As observed in human, EZH2 expression was significantly upregulated in MCT- and Su/Hx-challenged rats compared to their normal counterparts (Figure 1B). In agreement with this, marked nuclear localization of EZH2 expression was detected in PASMCs from rat remodeled distal PAs (< 75  $\mu$ m in diameter) identified by co-staining with  $\alpha$ SMA, while the signal of EZH2 was barely detectable in normotensive rat PAs (Figure 1C). To complement our approach, we measured EZH2 expression in PA endothelial cells (PAECs) as well as in muscle (quadriceps), liver, and kidney biopsies from control and PAH patients. Contrary to PASMCs, EZH2 expression was unchanged between control and PAH-PAECs (Figure S1). Furthermore, no signal was detected in quadriceps muscle (data not shown), and no major change was seen in kidney and liver (Figure S1). These data, combined with our previous finding showing that EZH2 is augmented in human compensated right ventricle (RV) but markedly decreased in decompensated RV from PAH patients [16], indicate that altered expression of EZH2 in PAH appears to be mainly restricted to the cardiopulmonary system.

### **Effects of EZH2 Loss- and Gain-of-Function Approaches on PASMC Proliferation and Resistance to Apoptosis**

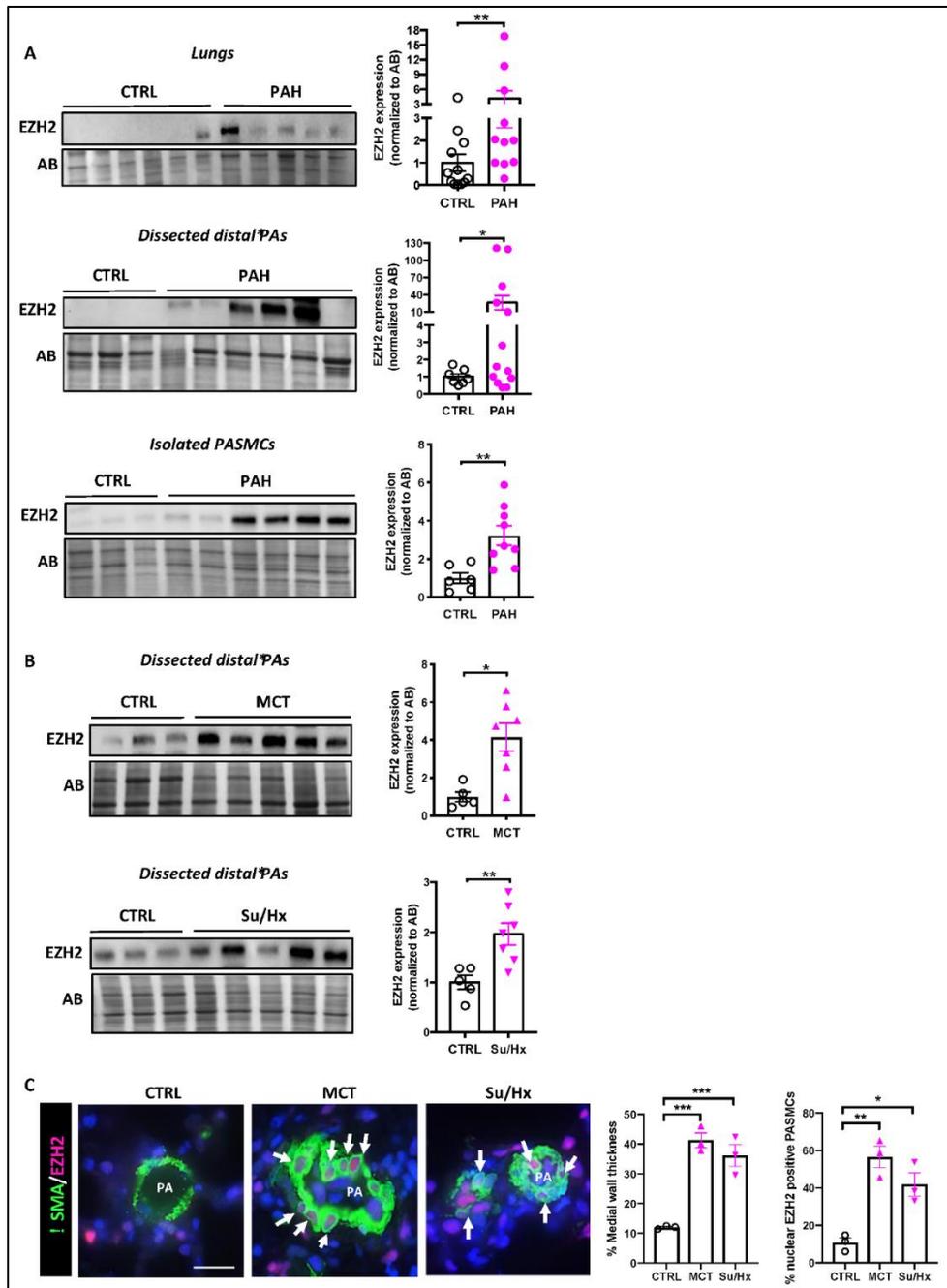
To investigate whether upregulation of EZH2 contributes to the abnormal phenotype of PAH-PASMCs, we first measured EZH2 expression levels in response to serum starvation and serum stimulation. We found that EZH2 is increased in serum-fed proliferating cells compared to serum-deprived quiescent cells (Figure 2A), indicating that EZH2 abundance is intimately associated with the proliferative capacity of cells. We next exposed PAH-

PASMCs to escalating doses of EPZ-6438 (Tazemetostat) and GSK-126 for 48 hours; two selective S-adenosyl methionine competitive inhibitors of histone methyl transferase EZH2 currently being evaluated in clinical trials for the treatment of cancer [17,18]. As expected, treatment with EPZ-6438 or GSK-126 dose-dependently reduced overall H3K27me3 levels in PAH-PASMCs (Figure 2B). We found that both compounds elicited marked antiproliferative effects, as demonstrated by a sharp reduction in the percentage of cells positive for Ki67 or EdU (Figures 2C and S2A). Moreover, using Annexin V labeling as a readout of early-stage apoptosis, EPZ-6438 and GSK-126 dose-dependently reverted the apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMCs (Figure 2D). These effects were accompanied with reduced levels of the proliferative and antiapoptotic markers minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) and Survivin, respectively (Figure S2B). Because these pharmacological inhibitors might have off-target effects, we next examined the impact of EZH2 silencing using siRNA. Compared to scrambled siRNA transfected PAH-PASMCs, cells transfected with EZH2 siRNAs had significantly reduced EZH2 protein expression levels, indicating EZH2 knockdown efficiency (Figure 2B). As observed with pharmacological inhibitors, the hyperproliferation and resistance to apoptosis of PAH-PASMCs was diminished upon endogenous EZH2 depletion (Figures 2C, D and S2). As a complementary approach, we sought to determine whether EZH2 gain-of-function is sufficient to enhance proliferation of control PASMCs and render them resistant to apoptosis. To this end, PASMCs isolated from control patients were infected with an adenovirus encoding human EZH2 for 48 h. Increased expression of EZH2 protein was observed in cells transfected with Ad-EZH2 compared with noninfected cells or cells infected with empty adenoviral vector (Ad-Null) (Figure S2C). As revealed by Ki67 labeling and EdU incorporation, upregulation of EZH2 in control cells significantly promoted their proliferation (Figure S2D). Moreover, overexpression of EZH2 markedly reduced serum starvation-induced apoptosis in control PASMCs (Figure S2D). Collectively, these data demonstrate that EZH2 plays a prominent role in the abnormal phenotype of PAH-PASMCs.

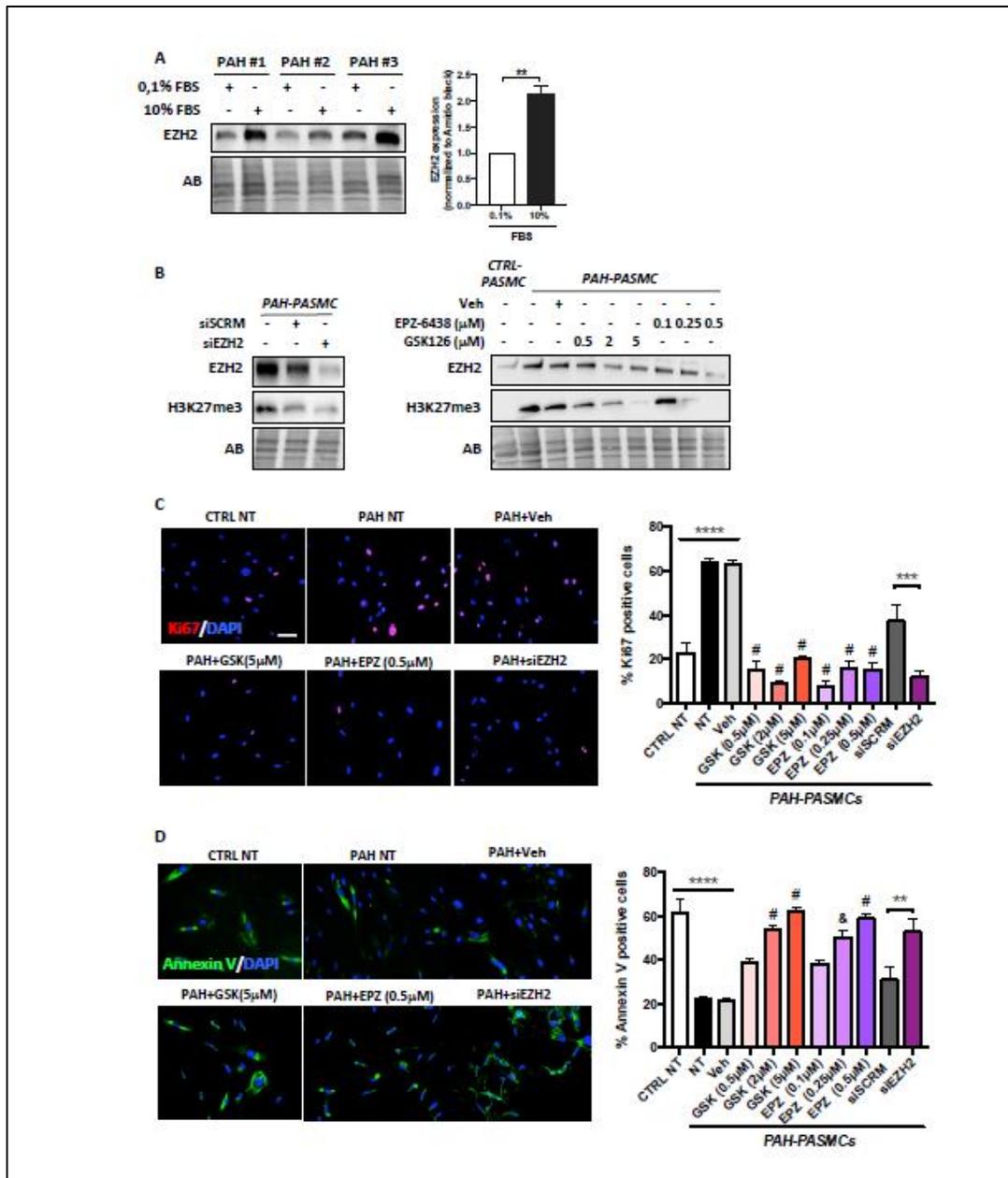
### **Impact of Molecular Inhibition of EZH2 on the PAH-PASMC Transcriptome**

To identify the downstream targets and signaling pathways governed by EZH2 and accounting for the abnormal phenotype of PAH-PASMCs, we examined global gene

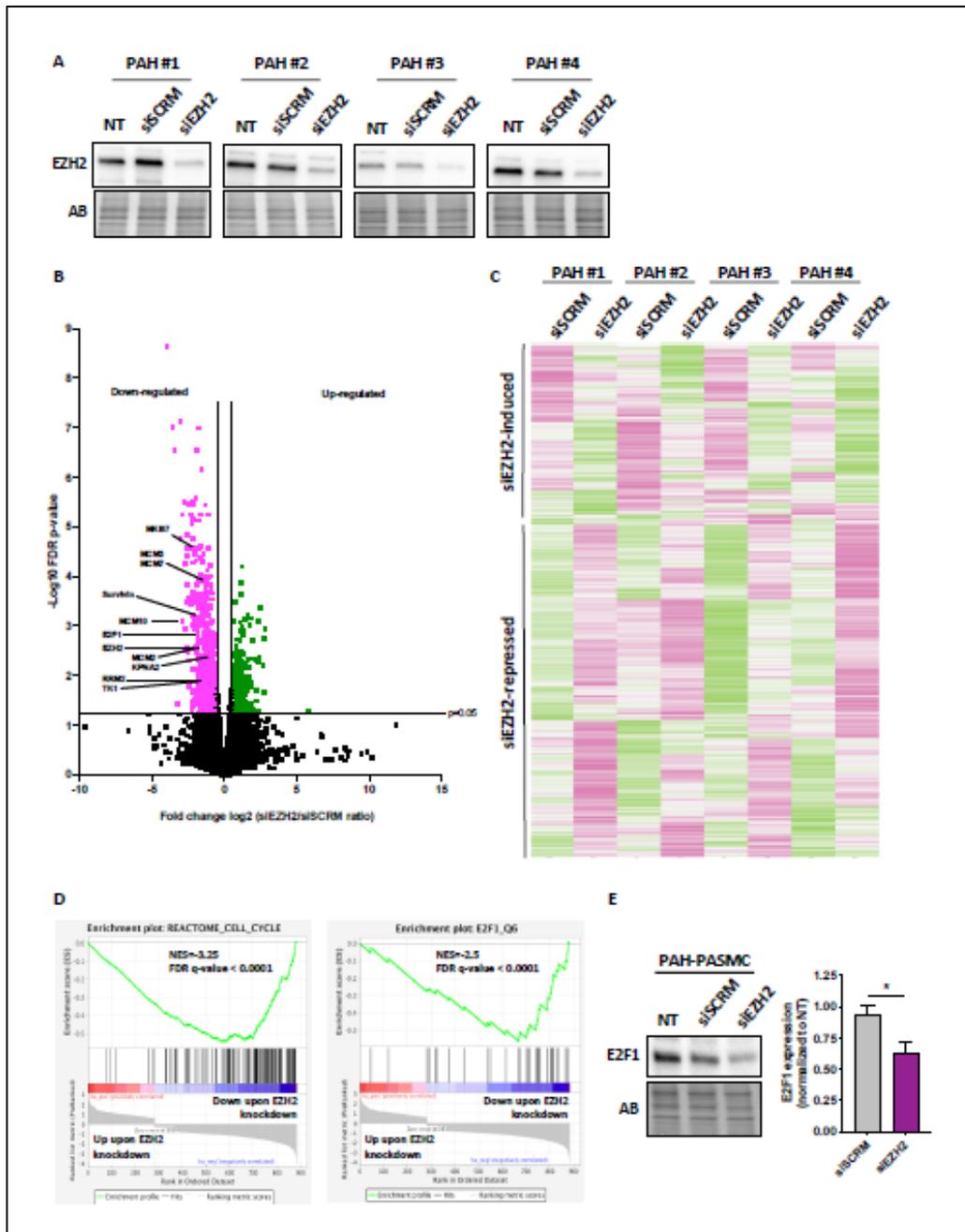
expression changes due to EZH2 knockdown by comparative RNA sequencing (RNA-Seq) analyses. These experiments were conducted in four different PAH-PASMCs, for which efficient EZH2 knockdown was previously examined by Western blot (Figure 3A). Using a fold-change cutoff value of 1.5 with FDR < 0.05, 884 differentially expressed genes (DEG) were identified (Figure 3B, C). Among them, 601 genes were significantly downregulated in EZH2-depleted cells compared to nontargeting siRNA controls. Based upon the RNA-Seq data, we ranked all genes by their fold change between EZH2 knockdown versus control cells and performed gene set enrichment analysis (GSEA) to identify biological pathways enriched among the most up- or down-regulated mRNAs. Analysis revealed that the downregulated genes in siEZH2-treated PAH-PASMCs were particularly enriched in the cell proliferation-related processes (Figure 3D). Interestingly, our data displayed significant enrichment of a gene set regulated in prostate cancer cell after siRNA-mediated depletion of EZH2 (Figure S3A) [19]. The identified up- and down-regulated DEGs were then separately subjected to gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses using the online database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID). The results of the GO analysis revealed that the downregulated DEGs were mainly enriched in biological processes including “DNA replication initiation”, “mitotic cytokinesis”, and “cell division” (Figure S3B). Indeed, expression levels of multiple genes found to be upregulated and implicated in the pro-proliferative and apoptosis resistant phenotype of PAH-PASMCs were downregulated in siEZH2-treated cells. These include members of the minichromosome maintenance (MCM) family (MCM2 to MCM7), pituitary tumor-transforming gene 1 (PTTG1), ribonucleotide reductase regulatory subunit M2 (RRM2), thymidine kinase 1 (TK1), and Survivin [20,21]. In terms of molecular function, the downregulated DEGs were enriched in “protein binding”, “microtubule binding”, and “DNA helicase activity” (Figure S3B). Accordingly, KEGG pathway analysis of the downregulated genes demonstrated a significant representation of those involved in cell cycle and DNA replication (Figure S3B), supporting the GSEA analysis. On the other hand, there were no enriched categories of GO functional annotations for upregulated genes, and enrichment of biological pathways supplied by KEGG was limited to Pi3-Akt signaling and ECM-receptor interaction (Figure S3B).



**Figure 1.** Expression of EZH2 in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) and animal models. (A) Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of EZH2 expression in lung biopsies, dissected pulmonary arteries (PA), and isolated PA smooth muscle cells (PASMCS) from control (n = 6–12) and PAH (n = 9–13) patients; (B) Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of EZH2 expression in PAs dissected from control rats as well as monocrotaline (MCT)- and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-induced pulmonary hypertension rat models (n = 5–7 rats per group); (C) Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA (green) and EZH2 (red) and DAPI nuclear staining showing nuclear expression of EZH2 in remodeled distal PAs after MCT injury or Sugen/hypoxia exposure compared to nontreated rats. Graphs on the right represent the quantification of the medial wall thickness of distal PAs and the percentage of PASMCS positive for EZH2 in distal pulmonary vessels (n = 3 per group, mean of 15 vessels/rat). Arrows mark positive cells. Scale bar = 20  $\mu$ m. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*p < 0.05; \*\*p < 0.01; and \*\*\*p < 0.001.



**Figure 2.** Effects of molecular and pharmacological inhibition of EZH2 on PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis. **(A)** Western blot and corresponding densitometric analysis of EZH2 in PAH-PASMCs that were serum-starved or not for 48 h; **(B)** Representative Western blots of EZH2 and H3K27me3 in PAH-PASMCs treated with either EZH2 small interference siRNA or nontargeting scrambled (siSCRMs) or escalating concentrations of GSK126 and EPZ-6438 (two catalytic EZH2 inhibitors) for 48 h; **(C)** Proliferation (Ki67) was measured in control ( $n = 5$ ) and PAH-PASMCs ( $n = 5$ ) treated or not with siEZH2, GSK126, and EPZ-6438 or their respective controls for 48 h. Graph shows the percentage of cells with positive nuclear Ki67 staining. PAH-PASMCs are significantly more proliferative than control PASMCs. Pharmacological inhibition of EZH2 or its knockdown decreases PAH-PASMC proliferation; **(D)** Apoptosis (Annexin V) was measured in serum-starved control ( $n = 5$ ) and PAH-PASMCs ( $n = 5$ ) treated or not with siEZH2, GSK126, and EPZ-6438 or their respective controls for 48 h. Graph shows the percentage of cells with positive Annexin-V staining. PAH-PASMCs are more resistant to starvation-induced apoptosis than control cells. Pharmacological inhibition of EZH2 or its knockdown increases PAH-PASMC apoptosis. Scale bar = 50  $\mu$ m. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ; and & $p < 0.001$  compared with Veh and # $p < 0.0001$  compared with Veh.



**Figure 3.** EZH2 knockdown in PAH-PASMCs and quantification of global transcript abundances by RNA sequencing. (A) Western blots of EZH2 in four different PAH-PASMC cell lines transfected or not with a siRNA targeting EZH2 (siEZH2) or a scrambled control siRNA (siSCRN). EZH2 siRNA markedly reduces EZH2 levels in the four PAH-PASMC cell lines; (B) Volcano plot comparing the transcriptome of siSCRN and siEZH2-treated PAH-PASMCs. Vertical lines indicate a fold change  $\pm 1.5$  and the horizontal line is indicative of a false-discovery-rate value threshold of 0.05. Pink (downregulated) and green (upregulated) points: transcripts that meet both criteria for significant change (i.e. FDR < 0.05 and fold change > 1.5) between control and EZH2-depleted cells; (C) Heatmap representation of all mRNAs whose expression levels were significantly impacted (FDR < 0.05) after silencing of EZH2 by a fold change > 1.5 or < 1.5. The columns represent the results of four independent PAH-PASMC cell lines transfected with siSCRN and siEZH2. Rows show individual differentially expressed genes. The color key from pink to green represents transcript abundance from low to high. Selected genes are marked on the right side; (D) Selected gene set enrichment analysis

(GSEA) charts showing enrichment for genes in the cell cycle process and E2F1 targets. The top portion of each panel represents the normalized enrichment score (NES) for each gene; the bottom portion of the plot shows the value of the ranking metric moving down the list of ranked genes; (E) Western blot showing expression levels of E2F1 in PAH-PASMCs subjected or not to EZH2 knockdown for 48 h. Quantitative densitometric analysis is shown. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \* $p < 0.05$ .

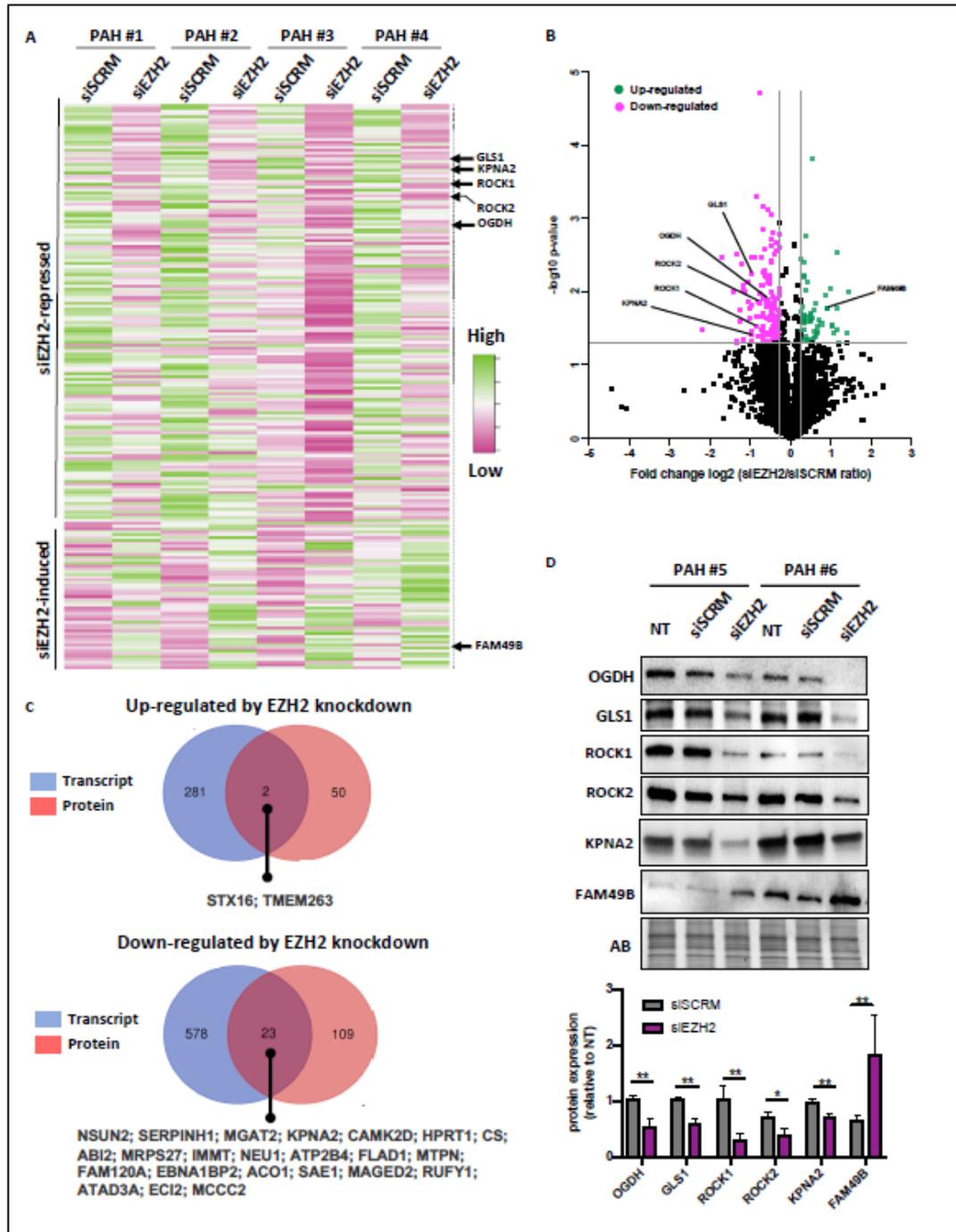
Based on our data showing that most of the DEGs are decreased upon EZH2 knockdown and recent studies showing that EZH2 can cooperate with various transcription factors to stimulate gene transcription [14,22], we thus hypothesized that the downstream effects of EZH2, may be mediated, in part, by a transcription factor. We thus conducted GSEA analysis using the C3 transcription factor targets database. As shown in figure 3D, rank-based analysis revealed a strong negative enrichment for the hallmark E2Fs targets signatures upon EZH2 knockdown, suggesting that EZH2 influences the transcriptome of the E2F pathway in PAH-PASMCs. In addition, consensus TF motif analysis unraveled by the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) and ChIP enrichment analysis (ChEA) data sets determined using EnrichR revealed E2F members at top candidates with significant P values (Figure S4A). Consistently, E2F transcription factors are pivotal regulators of genes required for mitochondrial homeostasis, DNA repair, and cell-cycle progression [23,24]. The above findings pushed us to investigate whether members of the E2F family are significantly impacted by EZH2 knockdown. Among the DEGs, we found that only E2F1 was markedly decreased ( $\log_{2}FC = -1,857$ ;  $FDR = 0.001$ ) (Figure 3B). Likewise, E2F1 protein levels were decreased in siEZH2-treated PASMCs (Figure 3E), suggesting involvement of E2F1 in the EZH2-mediated upregulation of gene expression. In support of this, we found that expression levels of well-established cell promoting factors and E2F1 targets genes, i.e., MCM2, RRM2, KPNA2, and PTTG1 [22], were diminished by EZH2 knockdown and further reduced in PAH-PASMCs simultaneously exposed to the pan-E2F inhibitor HLM006474 and siEZH2 (Figure S4B). Because EZH2 was documented to physically interact and cooperate with E2F1 to stimulate the expression of a group of genes involved in cancer progression [15,22], we thus tested by co-immunoprecipitation whether such an interaction occurs in four different PAH-PASMC cell lines. Although EZH2 was found to interact with YY1 (a known binding partner of EZH2) as expected [25], no inter-action between EZH2 and E2F1 was detected (Figure S4C), adding further evidence that physical interaction between EZH2 and

E2F1 is not required for EZH2 to promote E2F1 signaling in PAH-PASMCs. Together with previous transcriptomic data, these findings point to a dominant role of increased EZH2 in stimulating pro-proliferative signaling pathways.

### **Analysis of siEZH2-Associated Proteome Changes by Quantitative Proteomics**

To further dissect the EZH2 downstream signaling pathways in PAH-PASMCs, an LC-MS/MS proteomics approach was applied to appreciate global protein abundance changes in PAH-PASMCs treated or not with siEZH2. These experiments were conducted in the same four different PAH-PASMCs used for RNA-Seq analysis for which efficiency of EZH2 knockdown was previously confirmed (data not shown). Using a fold change  $> 1.2$  and a  $p$  value  $< 0.05$ , we identified 184 differentially expressed proteins (DEPs) upon EZH2 knockdown (Figure 4A, B). Of these 184 DEPs, 132 were downregulated, and 52 were upregulated upon EZH2 depletion (Figure 4A, B). Not surprisingly, only a small number of genes was found to be dysregulated at both the transcription and translation levels with all these genes exhibiting the same direction of change at the two levels (Figure 4C). To confirm the robustness and sensitivity of the expression changes observed in our proteomic data sets, expression levels of six DEPs (ROCK1, ROCK2, OGDH, GLS, KPNA2, and FAM49B), already known to be implicated in the pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMC or cancer cells [6,20,26,27], were measured by Western blotting in six different PAH-PASMC lines (including the four used in our unbiased proteomic approach). Consistent with the results of LC-MS/MS proteomics, ROCK1, ROCK2, KPNA2, OGDH, and GLS were significantly downregulated in siEZH2-treated PAH-PASMCs, whereas FAM49B was augmented (Figure 4D). Interestingly, no significant modulation of these factors was seen upon exposure to EPZ-6438, indicating that EZH2 regulates these genes in a PRC2-independent manner and supporting the notion that EZH2 mediates dual transcription programs in PAH-PASMCs (Figure S5A, B). To get a better insight into the biological significance of these DEPs, both up- and down-regulated proteins were subject to GO enrichment analysis using the DAVID database. We found that downregulated proteins in siEZH2-treated cells were significantly enriched in pathways involved in tricarboxylic acid (TCA) cycle and mitochondrial translation (Figure S5C). In the cell component ontology, most of the categories that satisfy the cutoff criteria of Benjamini–Hochberg

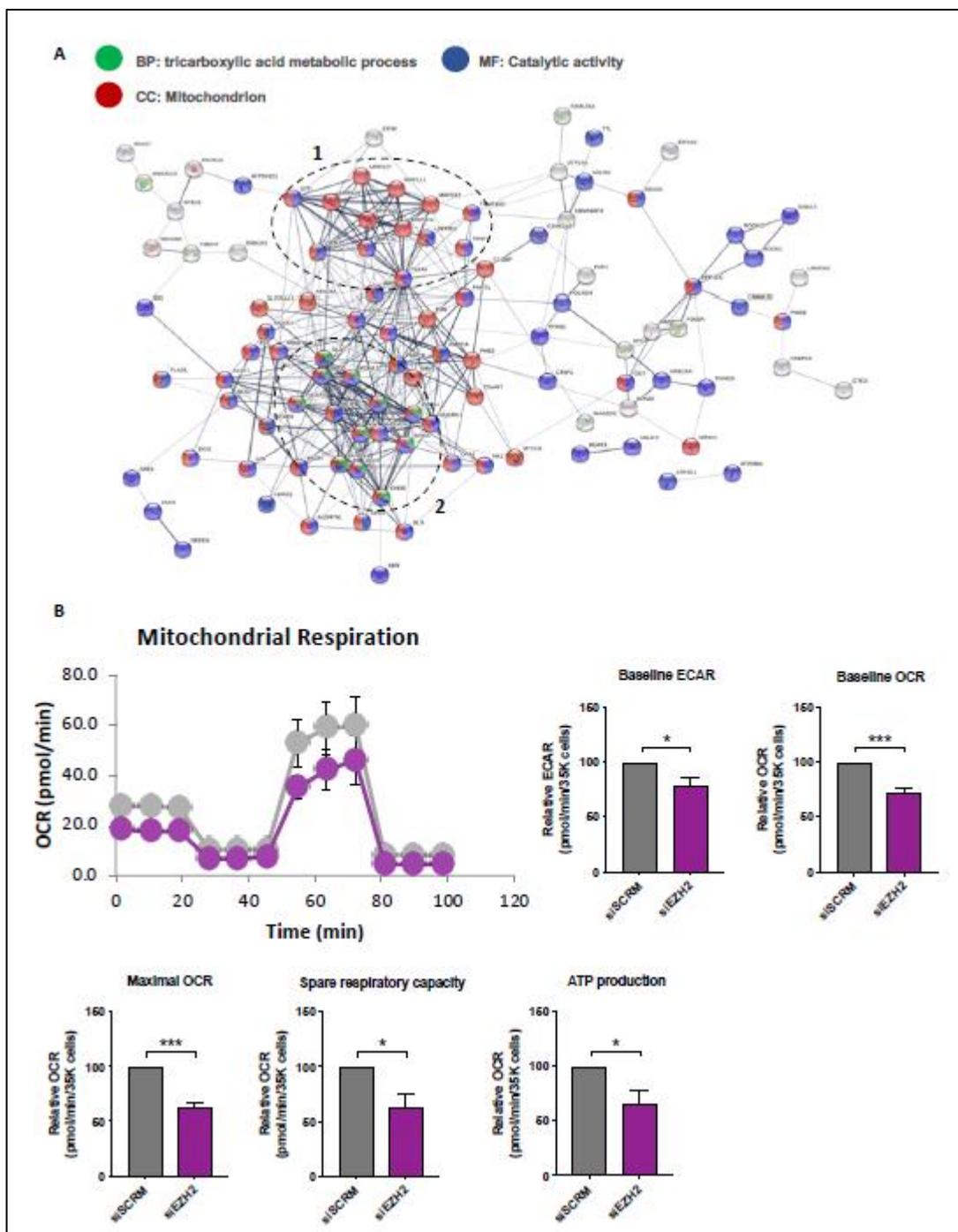
adjusted  $p < 0.01$  were associated with the mitochondria (Figure S5C). By contrast, no enriched categories of GO functional annotation nor KEGG pathways were found for upregulated proteins.



**Figure 4.** Proteomic analysis of siRNA-mediated silencing of EZH2 in PAH-PASMCs. (A) Heatmap representation of all proteins whose expression levels were significantly impacted (FDR < 0.05) after silencing of EZH2 by a fold change > 1.2 or < 1.2. The columns represent the results of four independent PAH-PASMC

cell lines transfected with siSCRM and siEZH2. Rows show individual differentially expressed proteins. The color key from pink to green represents protein abundance from low to high. Selected proteins are marked on the right side; **(B)** Volcano plot comparing the proteome of siSCRM and siEZH2-treated PAH-PASMCs. Vertical lines indicate a fold change  $\pm 1.2$ , and the horizontal line is indicative of a paired t-test  $p$ -value threshold of 0.05. Pink (downregulated) and green (upregulated) points: transcripts that meet both criteria for significant change (i.e. paired t-test  $p$ -value  $< 0.05$  and fold change  $> 1.5$ ) between control and EZH2 depleted cells; **(C)** Venn diagrams showing the numbers of common and unique differentially expressed genes (blue) and differentially expressed proteins (red) found to be significantly up- and down-regulated upon EZH2 knockdown in PAH-PASMCs; **(D)** Validation of proteomic results by Western blot. Representative immunoblots and corresponding densitometric analysis of selected proteins (OGDH, GLS1, ROCK1, ROCK2, KPNA2, and FAM48B) in PAH-PASMCs ( $n = 6-10$ ) subjected or not to EZH2 knockdown for 48 h. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

To further investigate the protein–protein interaction network among the downregulated proteins in both four biological replicates, a comprehensive interaction network of the 134 DEPs was performed through the String website. Following the elimination of nodes with no predicted interactions, a network of DEGs was constructed (Figure 5A). Two highly connected clusters of protein nodes emerged. Cluster 1 was composed of proteins required for mitochondrial gene expression, including factors involved in mRNA maturation and stability (TRMT10C and LRPPRC), translational elongation factors (GFM1 and TUFM), and mitoribosomal proteins of the small (MRPS) and large (MRPL) subunits (MRPS12, MRPS16, MRPS27, MRPL11, MRPL44, and MRPL58 (also called ICT1)). The second cluster comprises factors involved in glutamine-dependent biosynthetic pathway and TCA cycle, including GLS, GLUD1, CS, SDHA, OGDH, IDH3A/B, and SUCLA2 (Figure 5A). Data derived from proteomic analysis prompted us to examine functional assessment of the PAH-PASMC mitochondria upon EZH2 knockdown using the Seahorse assay. Suppression of EZH2 significantly diminished the glycolytic capacity of PAH-PASMCs after 48 hours (Figure 5B). Moreover, basal oxygen consumption rate (OCR), a surrogate marker of OXPHOS activity, was significantly impaired (Figure 5B). Subsequent measurements with application of inhibitors and uncouplers demonstrated that siRNA-mediated silencing of EZH2 significantly reduced ATP production, maximal respiration and spare respiratory capacity in comparison to siSCRM-treated cells (Figure 5B). Altogether, these results suggest that siEZH2-induced altered mitochondrial function and associated bioenergetics defects likely contribute to reduced PAH-PASMC proliferation and survival.



**Figure 5.** Impact of EZH2 suppression on PAH-PASMC bioenergetics. (A). Network analysis via STRING of the proteins found to be downregulated following EZH2 knockdown, revealing the presence of two major clusters of proteins associated with (1) mitochondrial gene expression and (2) glutamine-dependent biosynthetic pathway and tricarboxylic acid (TCA) cycle. Proteins belonging to the top enriched biological process (i.e. TCA cycle metabolism), molecular function (i.e. catalytic activity), and cellular component (i.e. mitochondrion) are colored in green, blue, and red, respectively. Proteins (nodes) with no predicted interactions were excluded. Thickness of the connecting lines correspond to the confidence level. Labels report protein names; (B) Assessment of mitochondrial function by the Seahorse XF96 analyzer in PAH-PASMCs exposed to siEZH2 or siSCRIM for 48 h. The basal extracellular acidification rate (ECAR), basal oxygen consumption rate (OCR), maximal OCR, spare respiratory capacity, and ATP production were quantified following indicated injection

of the specific stressors oligomycin (1  $\mu$ M), carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP, 5  $\mu$ M), and rotenone (1  $\mu$ M). Seahorse data were normalized to the total cell numbers plated in each well. Experiments were performed in triplicate in three different PAH-PASMC cell lines. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \* $P$  < 0.05 and \*\*\* $P$  < 0.001.

## Discussion

Originally described as the catalytic subunit of the PRC2, EZH2 mediates H3K27 trimethylation and gene silencing. Over the last decade, numerous studies have demonstrated that increased expression of EZH2 is a common denominator of multiple cancers promoting uncontrolled cell proliferation, at least in part, through transcriptional repression of critical target genes [9,14]. More recently, noncanonical oncogenic functions of EZH2 have been documented. Indeed, a growing number of studies indicate that EZH2 can also methylate nonhistone proteins to regulate their activity or half-life [11,28] and serves as a coactivator of several pro-oncogenic transcription factors such as androgen receptor [13], NF- $\kappa$ B subunits [29], SWI/SNF [30], and E2F members [15,22,31] to name a few. The importance of the oncogenic role of EZH2 independent of its methyltransferase activity was further underscored in natural killer/T-cell lymphoma in which ectopic expression of an EZH2 mutant form lacking methyltransferase activity was able to confer a growth advantage as well as to rescue growth inhibition as a result of endogenous EZH2 depletion [32]. Furthermore, studies have revealed that the canonical and noncanonical functions of EZH2 are not mutually exclusive but coexist in the same cell [30], pinpointing the cell-context-dependent and multifaceted effects of EZH2 on tumor progression. Consistent with the fact that PAH-PASMCs express many protumorigenic factors, we found that increased EZH2 expression is a shared feature of human PAH and animal models. More importantly, we demonstrated that blockade of EZH2 methyltransferase activity using EPZ-6438 and GSK126 markedly impedes the pro-proliferative and apoptosis-resistant state of PAH-PASMCs; the findings were recapitulated by EZH2 knockdown using siRNAs. To rule out possible off-target effects of EZH2 pharmacological inhibitors and gain some meaningful insights into the downstream signaling pathways governed by EZH2, high-throughput RNA sequencing, and quantitative proteomics were performed in four different PAH-PASMCs cell lines subjected to EZH2 silencing using siRNA. Surprisingly, we found that a large set (nearly 70%) of transcripts and proteins differentially expressed upon EZH2 silencing were downregulated. This result

likely indicates that effects of EZH2 on gene expression are, in a large part, mediated by noncanonical functions, as inhibition of its catalytic function is expected to relieve transcriptional repression and thus promote gene expression. Furthermore, we showed that selected proteins significantly down- or up-regulated upon EZH2 knockdown were not impacted by EPZ-6438. In support of this, by comparing the transcriptome of human prostate adenocarcinoma cells treated with siEZH2 or EPZ-6438, Kim and colleagues found that the majority of siEZH2 downregulated genes were unaffected by EPZ treatment [14].

Although it is generally assumed that a high concordance exists across transcriptome and proteome data sets, numerous studies have revealed that transcriptomic-proteomic modestly overlap challenging this dogma [33,34]. In the present study, a low level of concordance was found between changes in mRNA expression and protein abundance levels. Indeed, global proteomic analysis identified impaired mitochondrial translation and associated defects in oxidative phosphorylation as the main biological processes altered in EZH2-depleted PAH-PASMCs, whereas downregulated genes in siEZH2-treated cells were mainly enriched in functions linked to cell-cycle progression and cell division, indicating that changes in mRNA expression provide only limited in-sight into the downstream mechanisms regulated by EZH2. Several factors may explain this low correlation, including intermediate transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms, experimental timing, and limited sensitivity of mass spectrometry. In this regard, Survivin and E2F1, found to be significantly downregulated by RNA-Seq, were significantly decreased by Western blot but not by LC-MS/MS proteomics. Importantly, we found that numerous transcripts of genes already known to be implicated in the pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMCs, such as Survivin [21], ADAMTS8 [35], PBK [20], TK1 [36], and E2F1 [37], were significantly repressed under EZH2 inhibition, which is consistent with the hypothesis that EZH2 plays a critical role in the abnormal phenotype of disease cells. Furthermore, several factors implicated in the protection of DNA damage or in DNA repair itself were diminished. These include NUDT1, RAD51, LIG1, CLSPN, and XRCC3. In a prior study, depletion of EZH2 was documented to decrease the efficiency of double-strand-break repair and increases sensitivity of cells to DNA-damaging agents [38]. As we previously demonstrated that PAH-PASMCs have developed multiple complementary mechanisms dedicated to pre-serve genome integrity [39–41], siEZH2-induced inhibition of these factors

may collectively interfere with the PAH-PASMC DNA repair capacity, thus impairing cell proliferation and survival. Interestingly, we also observed a diminution in the abundance of a large array of proteins implicated in mitochondrial translation and TCA in siEZH2-treated PAH-PASMCs and accordingly reduced OXPHOS capacity. This confirms previous data showing that EZH2 silencing in glioblastoma cells reduces oxygen consumption rates [42]. As observed in cancer cells, PAH-PASMCs are characterized by a metabolic reprogramming towards aerobic glycolysis (also called Warburg effect) allowing the generating of a large amount of ATP and biosynthetic precursors necessary to sustain their growth [5]. Despite enhanced glycolysis, oxidative phosphorylation remains essential for disease cell survival [41,43], making oxidative phosphorylation an emerging target in hyperproliferating disease. Proteins encoded by the mitochondrial DNA are essential for oxidative phosphorylation and thus, energy production. Therefore, it can be assumed that defective expression of nuclear-encoded components of the mitochondrial translation machinery largely contributes to the pro-apoptotic and antiproliferative effects of EZH2 knockdown. In agreement with this, emetine, a cytoplasmic translation inhibitor, was recently documented to ameliorate pulmonary hypertension in two animal models by reducing the expression of Rho-kinases and surviving in PAH-PASMCs [44]. Finally, upregulation of the mitochondrial-localized protein FAM49B [27] was seen in EZH2-inhibited PAH-PASMCs. Although the molecular functions of the latter remain largely unknown, FAM49B was reported to act as a tumor suppressor by regulating mitochondrial integrity and metabolism [27].

Taken together, it is tempting to speculate that inhibition of EZH2 may exert beneficial effects in improving pulmonary vascular remodeling in PAH. Nevertheless, EZH2 loss-of-function targeted to RV cardiomyocytes was shown to induce cardiac hypertrophy and fibrosis [45]. In addition, we recently reported a dramatic downregulation of EZH2 in decompensated RV from PAH patients and animal models as well as an increased expression of EZH2 in animals presenting improved cardiac function secondary to therapeutic intervention [16]. These findings strongly suggest that interfering with EZH2 function may induce detrimental effects in the vulnerable PAH right ventricle and that specific delivery of EZH2 inhibitor to target cells should be envisioned. Further research is needed to better understand the complexity of EZH2 and the relative contribution of its PRC2-dependent and

independent roles in the abnormal phenotype of PAH-PASMCs, a prerequisite for developing the most relevant therapeutic approach.

In conclusion, we provide evidence that increased expression of EZH2 contributes to the hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMCs through both canonical and noncanonical mechanisms. By combining transcriptomic and proteomic analysis in siEZH2-depleted PAH-PASMCs, we identified disease-relevant functions of EZH2 in maintaining the bioenergetic machinery of oxidative phosphorylation and stimulating expression of genes associated with cell-cycle progression and survival; providing a useful resource that can be exploited to identify new actionable targets to improve pulmonary vascular remodeling in the setting of PAH.

## **Materials and Methods**

### **Human Lung Samples and Animal Models**

Experimental procedures using human tissues or cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Written informed consent was obtained for all subjects and the study was approved by the IUCPQ-UL ethics committee (CER #20773). Clinical and hemodynamic characteristics of patients are shown in Table S1. Animal experiments were approved by the Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec—Université Laval Biosafety and Ethics Committees (#2019-018). To induce pulmonary hypertension, adult Sprague Dawley rats (Charles River laboratories, Laval, QC, Canada) were injected with monocrotaline (MCT, 60 mg/kg s.c.) or injected with SU5416 (20 mg/kg s.c.) before exposition to normobaric hypoxia for 3 weeks, as previously described [20]. Experiments were terminated 4 and 5 weeks after MCT or SU5416 injection, respectively. The animals were sacrificed, and the lungs were collected for analysis.

### **Cell Culture and Treatments**

PAH-PASMCs (n = 11 cell lines) were isolated from small PAs (< 1000 µm diameter) from PAH patients. Control PASMCs (n = 10 cells lines) were either purchased from Cell Application (San Diego, CA, USA) or isolated from non-PAH patients (Table S2). PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and containing 1% penicillin/streptomycin. The purity of the PASMCs in the primary cultures

was confirmed by staining for alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA) using immunofluorescence technique. Only cells between passages 3 to 9 were used for experiments. EPZ-6438 and GSK-126 were purchased from SelleckChem (Burlington, ON, Canada), dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), and then added to the culture medium at the indicated concentrations immediately before use. The E2F inhibitor, HLM006474, was purchased from MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA) and dissolved in DMSO. Human EZH2 and null adenoviruses were provided by Vector Biolabs (Burlington, ON, Canada). Infection was performed at a multiplicity of infection of 100 plaque-forming units for 48 h before harvesting and analysis. PAH-PASMCs were transfected with silencer RNA targeting EZH2 mRNA (Cat#S102665166, Qiagen, final concentration of 10 nM) using lipofectamine RNAiMAX reagent (Thermo Fischer Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) according to the manufacturer's protocol. siRNA with scramble sequence (siSCRM) was used as negative control siRNA. Cells were cultured for 48 h before collecting material for transcriptomic, proteomic, and immunofluorescence analysis.

To assess cell proliferation and resistance to apoptosis, control and PAH-PASMCs were cultured for 48 h in 10% fetal bovine serum (FBS, a condition that is known to promote proliferation) or 0.1% FBS (a starvation condition that promotes apoptosis) [46,47]. Cell proliferation was determined with either Ki67 labeling or 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) incorporation assay (Click-iT EdU assay kit, Thermo Fischer Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) according to the manufacturer's instructions. Briefly, EdU was added during the last 2 h. After incubation, EdU-positive DNA duplicating cells were fixed with 3.7% formaldehyde diluted in PBS1X for 15 min at room temperature, washed with PBS1X, and then permeabilized during 20 min in 0.5% Triton X-100 in PBS. After washing in 3% BSA in PBS1X, cells were stained with the Click-iT reaction mix for 30 mins and counterstained with DAPI. Apoptosis was evaluated by Annexin V assay, as previously described [41]. The Ki67/EdU proliferative and Annexin V apoptotic index were calculated by counting the number of positive-staining cells divided by the total number of DAPI-positive cells multiplied by 100. For each cell line, experiments were performed in triplicate, and at least 500 cells per condition were counted.

### **Real-Time Quantitative PCR**

Total RNA was isolated from human PASMCS using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of total RNA were then determined with a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Fischer Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada). RNA integrity was confirmed by electrophoresis on a denaturing agarose gel. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the qScript Flex cDNA Synthesis Kit (Quanta bio, Beverly, MA, USA). Real-time PCR was carried out in a QuantStudio 7 Flex real-time PCR system (Thermo Fischer Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada) using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada). Each sample was analyzed in triplicate. Gene expression levels were normalized to the housekeeping gene 18S. Relative expression levels were calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method. Primer sequences are listed in Table S3.

### **RNA Sequencing**

RNA-sequencing analysis was carried out on total RNA extracted from PAH-PASMCS with or without siRNA-mediated silencing of EZH2. Qualitative and quantitative analysis of RNA was performed using NanoDrop2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Saint-Laurent, QC, Canada). Library preparation and paired-end RNAseq were performed by Cofactor genomics (St. Louis, MO, USA) using Illumina HiSeq, on the PASC samples at a read length of 150 bp and an average read depth of 50 million read pairs. Adapters were removed by the sequencing provider. The raw fastq files were examined for sequencing quality and adapter contamination using FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>), after which alignment to the human transcriptome was performed using STAR [48]. After the alignment was read, quantification of the reads at the transcript level were performed using RSEM [49], and gene level quantification was obtained by the summarizeToGene function in the tximport R package [50]. Genes/transcripts that had low or no counts were filtered out using the filterByExpr function implemented in the edgeR Bioconductor package [51,52]. Following this sample specific normalization factors were estimated using the calcNormFactors function, while accounting for the treatment and control design of the study. Differential expression analysis was performed using the voom-limma framework [53], and an FDR-corrected p-

value cutoff of 0.05 was used to determine the significantly differentially expressed genes/transcripts. High-throughput sequencing data used in this study have been deposited in NCBI's gene expression omnibus [54] and are accessible through GEO Series accession number GSE166996.

## **Proteomics**

### **Protein in-Gel Digestion**

Cells were lysed and protein concentration was determined using the Bradford assay (Bio-Rad). Protein samples (10  $\mu\text{g}$ ) were reduced in Laemmli buffer for 5 min at 95 °C and then loaded on a homemade one-dimensional SDS-PAGE gel (8% separating gel overlaid with a 5% stacking gel). Electrophoresis was stopped as soon as the protein sample entered the separating gel. The gel was fixed, stained with Coomassie Blue R250, and a single band containing the whole sample was excised from the gel, placed in 96-well plate, and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, MA, USA) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of Shevchenko et al [55] with the modifications suggested by Havlis et al [56]. Briefly, proteins were reduced with 10 mM DTT and alkylated with 55 mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126 nM of modified porcine trypsin (sequencing grade, Promega, Madison, WI, USA) at 37 °C overnight. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, and 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried, and then resuspended at 0.4  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  with 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid.

### **NanoLC/MSMS Analysis**

For each sample, 5  $\mu\text{L}$  of resuspended peptide digestion (equivalent to 2 $\mu\text{g}$  peptides) was injected and separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ESI MS/MS). The experiments were performed with a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific/Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) connected to an Orbitrap Fusion Tribrid ETD mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 20  $\mu\text{L}/\text{min}$

in loading solvent (2% acetonitrile, 0.05% TFA) on a 5 mm length 300  $\mu\text{m}$  I.D., 5  $\mu\text{m}$  particles Acclaim™ PepMap™ 100 precolumn cartridge (Thermo Fisher Scientific/Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) during 5 min. Then, the precolumn was switched online with 500 mm length, 75  $\mu\text{m}$  I.D., 3  $\mu\text{m}$  particles, Acclaim™ PepMap™ 100 C18 analytical column (Thermo Fisher Scientific/Dionex Softron GmbH, Germering, Germany), and the peptides were eluted with a linear gradient from 5–40% solvent B (A: 0.1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 270 min, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a data dependent acquisition mode using Thermo XCalibur software version 3.0.63. Full scan mass spectra (350 to 1800  $m/z$ ) were acquired in the orbitrap using an AGC target of  $4e5$ , a maximum injection time of 50 ms, and a resolution of 120,000. Internal calibration using lock mass on the  $m/z$  445.12003 siloxane ion was used. Each MS scan was followed by acquisition of fragmentation MSMS spectra of the most in-tense ions for a total cycle time of 3 s (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer in a window of 1.6  $m/z$  and fragmented by higher-energy collision-induced dissociation (HCD) with 35% of collision energy. The resulting fragments were detected by the linear ion trap in rapid scan rate with an AGC target of  $1e4$  and a maximum injection time of 50 ms. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 20 s and a tolerance of 10 ppm.

#### Database Searching and Label Free Quantification

Spectra were searched against a human proteins database (Uniprot Complete Proteome—taxonomy Homo sapiens—29 March 2017) using the Andromeda module of MaxQuant software v. 1.5.5.1 [57]. Trypsin/P enzyme parameter was selected with two possible missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteins was set as fixed modification, methionine oxidation, and acetylation of protein N-terminus as variable modifications. Mass search tolerance were 5 ppm and 0.6Da for MS and MS/MS, respectively. For protein validation, a maximum false discovery rate of 1% at peptide and protein level was used based on a target/decoy search. MaxQuant was also used for label-free quantification. The “match between runs” option was used with 20 min as alignment time window and 3 min as match time window values. Only unique and razor peptides were used for quantification. All other parameters were set at default values.

## Data Treatment and Statistical Analysis Related to Proteomics

The peptides.txt file generated by MaxQuant was used in R software v 3.4. The intensity values of each peptide in each sample were normalized using the median of all intensity values in each sample (normalization by column). Only peptides having at least two values in one of the two conditions to compare were considered as quantified. Other missing values were imputed using a noise value calculated as the first centile of all intensity values per sample. Quantifiable peptides were then aggregated into proteins using the leading razor protein accession number given by MaxQuant, and the intensity values of their corresponding peptides were summed for each sample. Only proteins with at least two quantified peptides were kept for further analysis. For each protein, a ratio between the two conditions to compare was calculated using the average of protein intensities in all samples of the same group. A paired Student's t-test was finally performed in R software to determine the probability of variation (p-value) of each protein between two groups of samples while taking into account the original cell line of each sample. Proteins with a p-value < 0.05 and fold change > 1.2 were considered as significantly variant between the two conditions.

## Bioinformatic Analysis

Pathway enrichment analysis of differentially expressed genes and proteins were performed using a combination of pathway enrichment methods, including gene set enrichment analysis (GSEA) [58], and DAVID 6.7 Bioinformatics resource tools [59]. Significantly enriched GO terms and pathways were selected based on Benjamini p-value < 0.01. The protein-protein interaction (PPI) analysis of DEPs was performed with the String website (<http://string-db.org>). An interaction score > 0.4 (medium confidence score) was considered significant and the PPI was visualized.

## Western Blotting and Immunoprecipitation

For Western blotting, proteins were extracted from tissues or cell pellets using a 2% Chaps lysis buffer supplemented with a protease inhibitor cocktail (Roche). Lysates were centrifuged at 16,000× g for 20 min at 4 °C, and the supernatant was collected as total protein. Protein concentrations were determined by the Bradford method. Equal amounts of proteins were separated by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels and transferred to

polyvinylidene fluoride membranes. Membranes were subsequently blocked with either 5% nonfat dry milk or 5% goat serum in TBS-T buffer and incubated with primary anti-bodies (Table S4) in 3% BSA overnight at 4 °C. After being rinsed three times with TBS-T buffer, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 2 h at RT in 5% nonfat milk or in 5% goat serum in TBS-T buffer. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin–Elmer) and labelled proteins were detected with the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to Amido black as previously described [41].

For the co-immunoprecipitation, cell proteins were extracted with RIPA buffer (10 mM Tris-HCL pH7.6, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% sodium dodecyl sulfate) containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Surebeads magnetic beads (Bio-Rad Laboratories) were preincubated with an anti-EZH2 antibody or anti-IgG isotype control antibody for 4 h on a low-speed rotating shaker at room temperature. Then, protein extracts were mixed with anti-EZH2 antibodies bound to magnetic beads and incubated overnight at 4 °C on rotating shaker. The beads were magnetized using SureBeads magnetic rack, and the supernatant was discarded. Then, elution buffer was used to collect purified target protein for western blot analysis.

### **Immunofluorescence Studies**

Paraffin-embedded lungs were serially sectioned at 5 µm. Lung sections were dewaxed and rehydrated in graded ethanol solutions. Once rehydrated, slides were subjected to antigen retrieval in citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) in a microwaveable pressure cooker for 20 min. Sections were blocked with 5% goat serum for 2 h and then incubated with indicated primary antibodies in a humidified chamber overnight at 4 °C. After washes, sections were further incubated for 1 h at room temperature with appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies. The Cyanine 3 Tyramide Signal Amplification Kit (PerkinElmer, Woodbridge, ON, Canada) was used for EZH2 detection. Sections were mounted onto coverslips using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) Fluoromount G mounting medium. Sections were examined by microscopy using an Axio Observer microscope (Zeiss), and images were acquired using Zen system (Zeiss).

### **In Vitro Metabolism (Seahorse XF24) Assays**

Mitochondrial bioenergetics/function was assessed using the Seahorse XF24 Analyzer (Agilent Technologies, Saint-Laurent, QC, Canada), as previously published [41]. Twenty-four hours after transfection, PAH-PASMCs were seeded in Seahorse 24-well tissue culture plates at a density of  $3.5 \times 10^4$  cells/well and allowed to adhere for 24 h. Prior to the assay, cell confluence was confirmed the media was changed to unbuffered DMEM containing pyruvate and glutamine, and the cells were equilibrated for 1 h at 37 °C in a non-CO<sub>2</sub> incubator. After measuring basal OCR and ECAR, the mitochondrial stress was carried out, and OCR was determined after sequential injections with oligomycin (1 μM), carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP, 5 μM), and rotenone (1 μM) according to the manufacturer's protocol. OCR rates were automatically calculated and recorded by the Seahorse XF24 software. The maximum respiration capacity was calculated by using the OCR measurement after the addition of FCCP. The maximum glycolytic capacity was calculated by the ECAR measurement after oligomycin addition. Rates of OCR and ECAR were normalized to cell number per well.

### **Statistical Analysis**

All analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA). The unpaired Student t-test and one-way analysis of variance (ANOVA) test were used for comparisons between two and two or more normally distributed groups, respectively. The Mann–Whitney and Kruskal–Wallis nonparametric tests were used to compare two or more non-normally distributed groups. A significance level inferior to 5% ( $P < 0.05$ ) was considered statistically significant.

**Supplementary Materials:** The following are available online at [www.mdpi.com/xxx/s1](http://www.mdpi.com/xxx/s1)

**Author Contributions:** Conceptualization, K.H., S.P., S.B.; and O.B.; formal analysis, K.H., J.O., C.A., A.B., Y.G., V.K., S.B.-B., E.T., G.M., S.M., V.N., F.R.-D., and M.O.; funding acquisition, O.B.; investigation, K.H., J.O., C.A., A.B., Y.G., V.K., S.B.-B., E.T., G.M., S.M., V.N., F.R.-D., M.O., J.J., and D.G.; methodology, K.H., J.O., C.A., A.B., Y.G., V.K., S.B.-B., E.T., G.M., S.M., V.N., F.R.-D., and M.O.; resources, F.P. R.P., S.B., S.P., J.J., D.G., and O.B.; supervision, R.P., S.B., S.P., J.J., D.G., and O.B.; writing—original draft, S.B., S.P., and O.B.; writing—review and editing, S.B., S.P., R.P., and O.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Québec Respiratory Health research network.

**Institutional Review Board Statement:** Experimental procedures using human tissues or cells were conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec—Université Laval (IUCPQ-UL) (CER #20773). Animal experiments were approved by the Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec—Université Laval Biosafety and Ethics Committees (#2019-018).

**Informed Consent Statement:** All subjects gave their written informed consent.

**Data Availability Statement:** The data presented in this study are available in this article and in the supplementary material.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Boucherat, O.; Vitry, G.; Trinh, I.; Paulin, R.; Provencher, S.; Bonnet, S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **2017**, *7*, 285–299.
2. Humbert, M.; Guignabert, C.; Bonnet, S.; Dorfmueller, P.; Klinger, J.R.; Nicolls, M.R.; Olschewski, A.J.; Pullamsetti, S.S.; Schermuly, R.T.; Stenmark, K.R.; et al. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: State of the art and research perspectives. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801887.
3. Lajoie, A.C.; Lauziere, G.; Lega, J.C.; Lacasse, Y.; Martin, S.; Simard, S.; Bonnet, S.; Provencher, S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: A meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* **2016**, *4*, 291–305.
4. Sitbon, O.; Gomberg-Maitland, M.; Granton, J.; Lewis, M.I.; Mathai, S.C.; Rainisio, M.; Stockbridge, N.L.; Wilkins, M.R.; Zamanian, R.T.; Rubin, L.J. Clinical trial design and new therapies for pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **2019**, *53*, 1801887.
5. Sutendra, G.; Michelakis, E.D. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 558–573.
6. Bertero, T.; Oldham, W.M.; Cottrill, K.A.; Pisano, S.; Vanderpool, R.R.; Yu, Q.; Zhao, J.; Tai, Y.; Tang, Y.; Zhang, Y.Y.; et al. Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **2016**, *126*, 3313–3335.
7. Gamen, E.; Seeger, W.; Pullamsetti, S.S. The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **2016**, *48*, 903–917.
8. Hu, C.J.; Zhang, H.; Laux, A.; Pullamsetti, S.S.; Stenmark, K.R. Mechanisms contributing to persistently activated cell phenotypes in pulmonary hypertension. *J. Physiol.* **2019**, *597*, 1103–1119.
9. Kim, K.H.; Roberts, C.W. Targeting EZH2 in cancer. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 128–134.
10. Lei, A.; Chen, L.; Zhang, M.; Yang, X.; Xu, L.; Cao, N.; Zhang, Z.; Cao, Y. EZH2 Regulates Protein Stability via Recruiting USP7 to Mediate Neuronal Gene Expression in Cancer Cells. *Front. Genet.* **2019**, *10*, 422.
11. Kim, E.; Kim, M.; Woo, D.H.; Shin, Y.; Shin, J.; Chang, N.; Oh, Y.T.; Kim, H.; Rhee, J.; Nakano, I.; et al. Phosphorylation of EZH2 activates STAT3 signaling via STAT3 methylation and promotes tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Cell* **2013**, *23*, 839–852.
12. Jung, H.Y.; Jun, S.; Lee, M.; Kim, H.C.; Wang, X.; Ji, H.; McCrea, P.D.; Park, J.I. PAF and EZH2 induce Wnt/beta-catenin signaling hyperactivation. *Mol. Cell* **2013**, *52*, 193–205.
13. Xu, K.; Wu, Z.J.; Groner, A.C.; He, H.H.; Cai, C.; Lis, R.T.; Wu, X.; Stack, E.C.; Loda, M.; Liu, T.; et al. EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is Polycomb-independent. *Science* **2012**, *338*, 1465–1469.
14. Kim, J.; Lee, Y.; Lu, X.; Song, B.; Fong, K.W.; Cao, Q.; Licht, J.D.; Zhao, J.C.; Yu, J. Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Rep.* **2018**, *25*, 2808–2820.
15. Xu, H.; Xu, K.; He, H.H.; Zang, C.; Chen, C.H.; Chen, Y.; Qin, Q.; Wang, S.; Wang, C.; Hu, S.; et al. Integrative Analysis Reveals the Transcriptional Collaboration between EZH2 and E2F1 in the Regulation of Cancer-Related Gene Expression. *Mol Cancer Res.* **2016**, *14*, 163–172.
16. Omura, J.; Habbout, K.; Shimauchi, T.; Wu, W.H.; Breuils-Bonnet, S.; Tremblay, E.; Martineau, S.; Nadeau, V.; Gagnon, K.; Mazoyer, F.; et al. Identification of Long Noncoding RNA H19 as a New

- Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **2020**, *142*, 1464–1484.
17. Knutson, S.K.; Kawano, S.; Minoshima, Y.; Warholic, N.M.; Huang, K.C.; Xiao, Y.; Kadowaki, T.; Uesugi, M.; Kuznetsov, G.; Kumar, N.; et al. Selective inhibition of EZH2 by EPZ-6438 leads to potent antitumor activity in EZH2-mutant non-Hodgkin lymphoma. *Mol. Cancer Ther.* **2014**, *13*, 842–854.
  18. Chen, Y.T.; Zhu, F.; Lin, W.R.; Ying, R.B.; Yang, Y.P.; Zeng, L.H. The novel EZH2 inhibitor, GSK126, suppresses cell migration and angiogenesis via down-regulating VEGF-A. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **2016**, *77*, 757–765.
  19. Nuytten, M.; Beke, L.; Van Eynde, A.; Ceulemans, H.; Beullens, M.; Van Hummelen, P.; Fuks, F.; Bollen, M. The transcriptional repressor NIPPI is an essential player in EZH2-mediated gene silencing. *Oncogene* **2008**, *27*, 1449–1460.
  20. Vitry, G.; Paulin, R.; Grobs, Y.; Lampron, M.C.; Shimauchi, T.; Lemay, S.E.; Tremblay, E.; Habbout, K.; Awada, C.; Bourgeois, A.; et al. Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2021**, *203*, 614–627.
  21. McMurtry, M.S.; Archer, S.L.; Altieri, D.C.; Bonnet, S.; Haromy, A.; Harry, G.; Bonnet, S.; Puttagunta, L.; Michelakis, E.D. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **2005**, *115*, 1479–1491.
  22. Tabbal, H.; Septier, A.; Mathieu, M.; Drelon, C.; Rodriguez, S.; Djari, C.; Batisse-Lignier, M.; Tauveron, I.; Pointud, J.C.; Sahut-Barnola, I.; et al. EZH2 cooperates with E2F1 to stimulate expression of genes involved in adrenocortical carcinoma aggressiveness. *Br. J. Cancer* **2019**, *121*, 384–394.
  23. Ren, B.; Cam, H.; Takahashi, Y.; Volkert, T.; Terragni, J.; Young, R.A.; Dynlacht, B.D. E2F integrates cell cycle progression with DNA repair, replication, and G(2)/M checkpoints. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 245–256.
  24. Blanchet, E.; Annicotte, J.S.; Lagarrigue, S.; Aguilar, V.; Clape, C.; Chavey, C.; Fritz, V.; Casas, F.; Apparailly, F.; Auwerx, J.; et al. E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat. Cell Biol.* **2011**, *13*, 1146–1152.
  25. Caretti, G.; Di Padova, M.; Micales, B.; Lyons, G.E.; Sartorelli, V. The Polycomb Ezh2 methyltransferase regulates muscle gene expression and skeletal muscle differentiation. *Genes Dev.* **2004**, *18*, 2627–2638.
  26. Shimizu, T.; Fukumoto, Y.; Tanaka, S.; Satoh, K.; Ikeda, S.; Shimokawa, H. Crucial role of ROCK2 in vascular smooth muscle cells for hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2013**, *33*, 2780–2791.
  27. Chattaragada, M.S.; Riganti, C.; Sassoe, M.; Principe, M.; Santamorenna, M.M.; Roux, C.; Curcio, C.; Evangelista, A.; Allavena, P.; Salvia, R.; et al. FAM49B, a novel regulator of mitochondrial function and integrity that suppresses tumor metastasis. *Oncogene* **2018**, *37*, 697–709.
  28. Dasgupta, M.; Dermawan, J.K.; Willard, B.; Stark, G.R. STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2015**, *112*, 3985–3990.
  29. Lee, S.T.; Li, Z.; Wu, Z.; Aau, M.; Guan, P.; Karuturi, R.K.; Liou, Y.C.; Yu, Q. Context-specific regulation of NF-kappaB target gene expression by EZH2 in breast cancers. *Mol. Cell* **2011**, *43*, 798–810.
  30. Kim, K.H.; Kim, W.; Howard, T.P.; Vazquez, F.; Tsherniak, A.; Wu, J.N.; Wang, W.; Haswell, J.R.; Walensky, L.D.; Hahn, W.C.; et al. SWI/SNF-mutant cancers depend on catalytic and non-catalytic activity of EZH2. *Nat. Med.* **2015**, *21*, 1491–1496.
  31. Feng, Y.; Li, L.; Du, Y.; Peng, X.; Chen, F. E2F4 functions as a tumour suppressor in acute myeloid leukaemia via inhibition of the MAPK signalling pathway by binding to EZH2. *J. Cell. Mol. Med.* **2020**, *24*, 2157–2168.
  32. Yan, J.; Ng, S.B.; Tay, J.L.; Lin, B.; Koh, T.L.; Tan, J.; Selvarajan, V.; Liu, S.C.; Bi, C.; Wang, S.; et al. EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood* **2013**, *121*, 4512–4520.
  33. Ghazalpour, A.; Bennett, B.; Petyuk, V.A.; Orozco, L.; Hagopian, R.; Mungrue, I.N.; Farber, C.R.; Sinsheimer, J.; Kang, H.M.; Furlotte, N.; et al. Comparative analysis of proteome and transcriptome variation in mouse. *PLoS Genet.* **2011**, *7*, e1001393.
  34. Manzoni, C.; Kia, D.A.; Vandrovцова, J.; Hardy, J.; Wood, N.W.; Lewis, P.A.; Ferrari, R. Genome, transcriptome and proteome: The rise of omics data and their integration in biomedical sciences. *Brief. Bioinform.* **2018**, *19*, 286–302.
  35. Omura, J.; Satoh, K.; Kikuchi, N.; Satoh, T.; Kurosawa, R.; Nogi, M.; Ohtsuki, T.; Al-Mamun, M.E.; Siddique, M.A.H.; Yaoita, N.; et al. ADAMTS8 Promotes the Development of Pulmonary Arterial

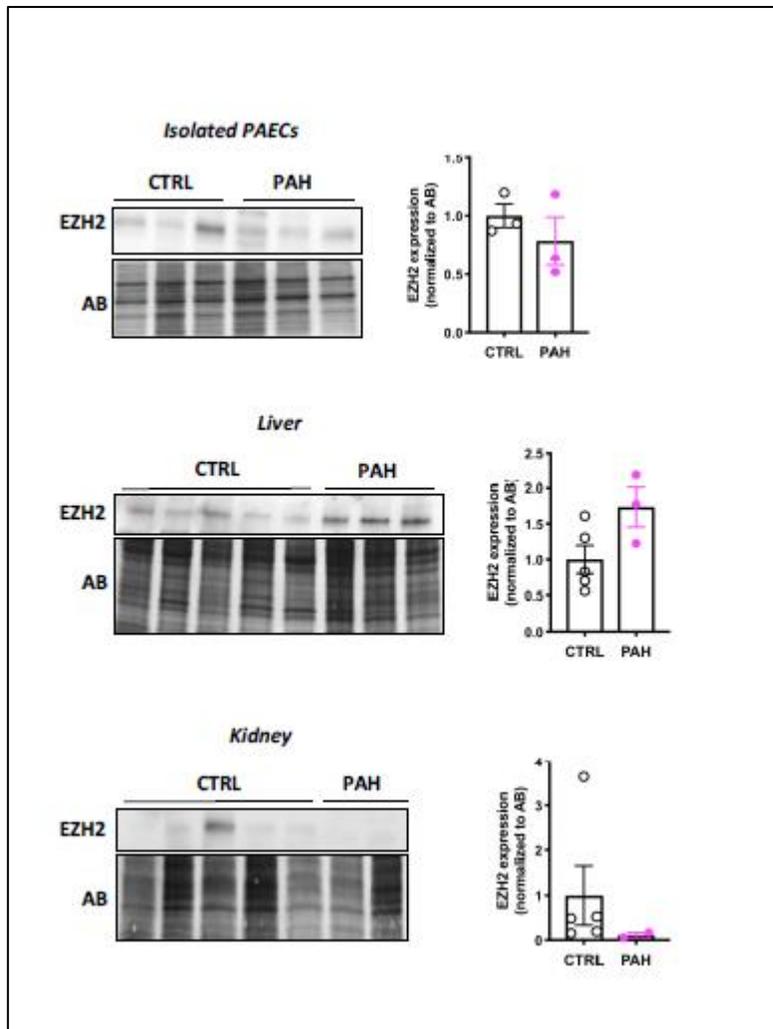
- Hypertension and Right Ventricular Failure: A Possible Novel Therapeutic Target. *Circ. Res.* **2019**, *125*, 884–906.
36. Ashek, A.; Spruijt, O.A.; Harms, H.J.; Lammertsma, A.A.; Cupitt, J.; Dubois, O.; Wharton, J.; Dabral, S.; Pullamsetti, S.S.; Huisman, M.C.; et al. 3'-Deoxy-3'-[18F]Fluorothymidine Positron Emission Tomography Depicts Heterogeneous Proliferation Pathology in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patient Lung. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **2018**, *11*, e007402.
  37. Yu, L.; Hales, C.A. Silencing of sodium-hydrogen exchanger 1 attenuates the proliferation, hypertrophy, and migration of pulmonary artery smooth muscle cells via E2F1. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **2011**, *45*, 923–930.
  38. Campbell, S.; Ismail, I.H.; Young, L.C.; Poirier, G.G.; Hendzel, M.J. Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair. *Cell Cycle* **2013**, *12*, 2675–2683.
  39. Meloche, J.; Pflieger, A.; Vaillancourt, M.; Paulin, R.; Potus, F.; Zervopoulos, S.; Graydon, C.; Courboulain, A.; Breuils-Bonnet, S.; Tremblay, E.; et al. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **2014**, *129*, 786–797.
  40. Bourgeois, A.; Bonnet, S.; Breuils-Bonnet, S.; Habbout, K.; Paradis, R.; Tremblay, E.; Lampron, M.C.; Orcholski, M.E.; Potus, F.; Bertero, T.; et al. Inhibition of CHK 1 (Checkpoint Kinase 1) Elicits Therapeutic Effects in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 1667–1681.
  41. Boucherat, O.; Peterlini, T.; Bourgeois, A.; Nadeau, V.; Breuils-Bonnet, S.; Boilet-Molez, S.; Potus, F.; Meloche, J.; Chabot, S.; Lambert, C.; et al. Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **2018**, *198*, 90–103.
  42. Pang, B.; Zheng, X.R.; Tian, J.X.; Gao, T.H.; Gu, G.Y.; Zhang, R.; Fu, Y.B.; Pang, Q.; Li, X.G.; Liu, Q. EZH2 promotes metabolic reprogramming in glioblastomas through epigenetic repression of EAF2-HIF1alpha signaling. *Oncotarget* **2016**, *7*, 45134–45143.
  43. Rivadeneira, D.B.; Caino, M.C.; Seo, J.H.; Angelin, A.; Wallace, D.C.; Languino, L.R.; Altieri, D.C. Survivin promotes oxidative phosphorylation, subcellular mitochondrial repositioning, and tumor cell invasion. *Sci. Signal.* **2015**, *8*, ra80.
  44. Siddique, M.A.H.; Satoh, K.; Kurosawa, R.; Kikuchi, N.; Elias-Al-Mamun, M.; Omura, J.; Satoh, T.; Nogi, M.; Sunamura, S.; Miyata, S.; et al. Identification of Emetine as a Therapeutic Agent for Pulmonary Arterial Hypertension: Novel Effects of an Old Drug. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2019**, *39*, 2367–2385.
  45. Delgado-Olguin, P.; Huang, Y.; Li, X.; Christodoulou, D.; Seidman, C.E.; Seidman, J.G.; Tarakhovskiy, A.; Bruneau, B.G. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 343–347.
  46. Li, L.; Zhang, X.; Li, X.; Lv, C.; Yu, H.; Xu, M.; Zhang, M.; Fu, Y.; Meng, H.; Zhou, J. TGF-beta1 inhibits the apoptosis of pulmonary arterial smooth muscle cells and contributes to pulmonary vascular medial thickening via the PI3K/Akt pathway. *Mol. Med. Rep.* **2016**, *13*, 2751–2756.
  47. Savai, R.; Al-Tamari, H.M.; Sedding, D.; Kojonazarov, B.; Muecke, C.; Teske, R.; Capecchi, M.R.; Weissmann, N.; Grimminger, F.; Seeger, W.; et al. Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* **2014**, *20*, 1289–1300.
  48. Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Batut, P.; Chaisson, M.; Gingeras, T.R. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **2013**, *29*, 15–21.
  49. Li, B.; Dewey, C.N. RSEM: Accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics* **2011**, *12*, 323.
  50. Soneson, C.; Love, M.I.; Robinson, M.D. Differential analyses for RNA-seq: Transcript-level estimates improve gene-level inferences. *F1000Res* **2015**, *4*, 1521.
  51. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140.
  52. McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40*, 4288–4297.
  53. Ritchie, M.E.; Phipson, B.; Wu, D.; Hu, Y.; Law, C.W.; Shi, W.; Smyth, G.K. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e47.
  54. Edgar, R.; Domrachev, M.; Lash, A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 207–210.
  55. Shevchenko, A.; Wilm, M.; Vorm, O.; Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **1996**, *68*, 850–858, doi:10.1021/ac950914h.

56. Havlis, J.; Thomas, H.; Sebela, M.; Shevchenko, A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 1300–1306.
57. Cox, J.; Mann, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat. Biotechnol.* **2008**, *26*, 1367–1372.
58. Subramanian, A.; Tamayo, P.; Mootha, V.K.; Mukherjee, S.; Ebert, B.L.; Gillette, M.A.; Paulovich, A.; Pomeroy, S.L.; Golub, T.R.; Lander, E.S.; et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **2005**, *102*, 15545–15550.
59. Huang da, W.; Sherman, B.T.; Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **2009**, *4*, 44–57.

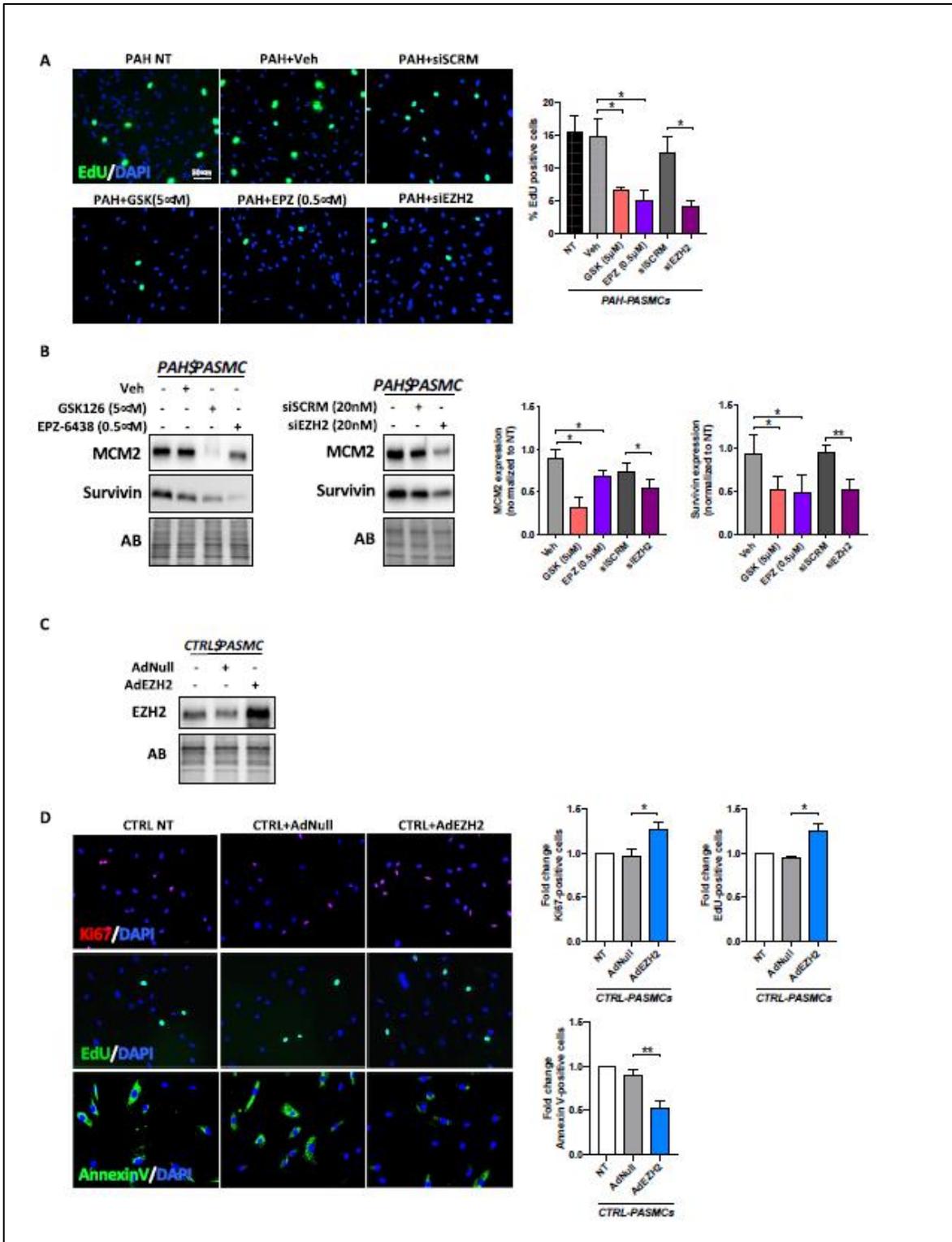
## Supplemental Data

### **Implication of EZH2 in the proliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells in PAH: a transcriptomic and proteomic approach.**

Karima Habbout<sup>1</sup>, Junichi Omura<sup>1</sup>, Charifa Awada<sup>1</sup>, Alice Bourgeois<sup>1</sup>, Yann Grobs<sup>1</sup>, Vinod Krishna<sup>2</sup>, Sandra Breuils-Bonnet<sup>1</sup>, Eve Tremblay<sup>1</sup>, Ghada Mkannez<sup>1</sup>, Sandra Martineau<sup>1</sup>, Valérie Nadeau<sup>1</sup>, Florence Roux-Dalvai<sup>3</sup>, Mark Orcholski<sup>1</sup>, Jey Jeyaseelan<sup>2</sup>, David Gutstein<sup>2</sup>, François Potus<sup>1</sup>, Steeve Provencher<sup>1,4</sup>, Sébastien Bonnet<sup>1,4</sup>, Roxane Paulin<sup>1,4</sup> and Olivier Boucherat<sup>1,4,\*</sup>

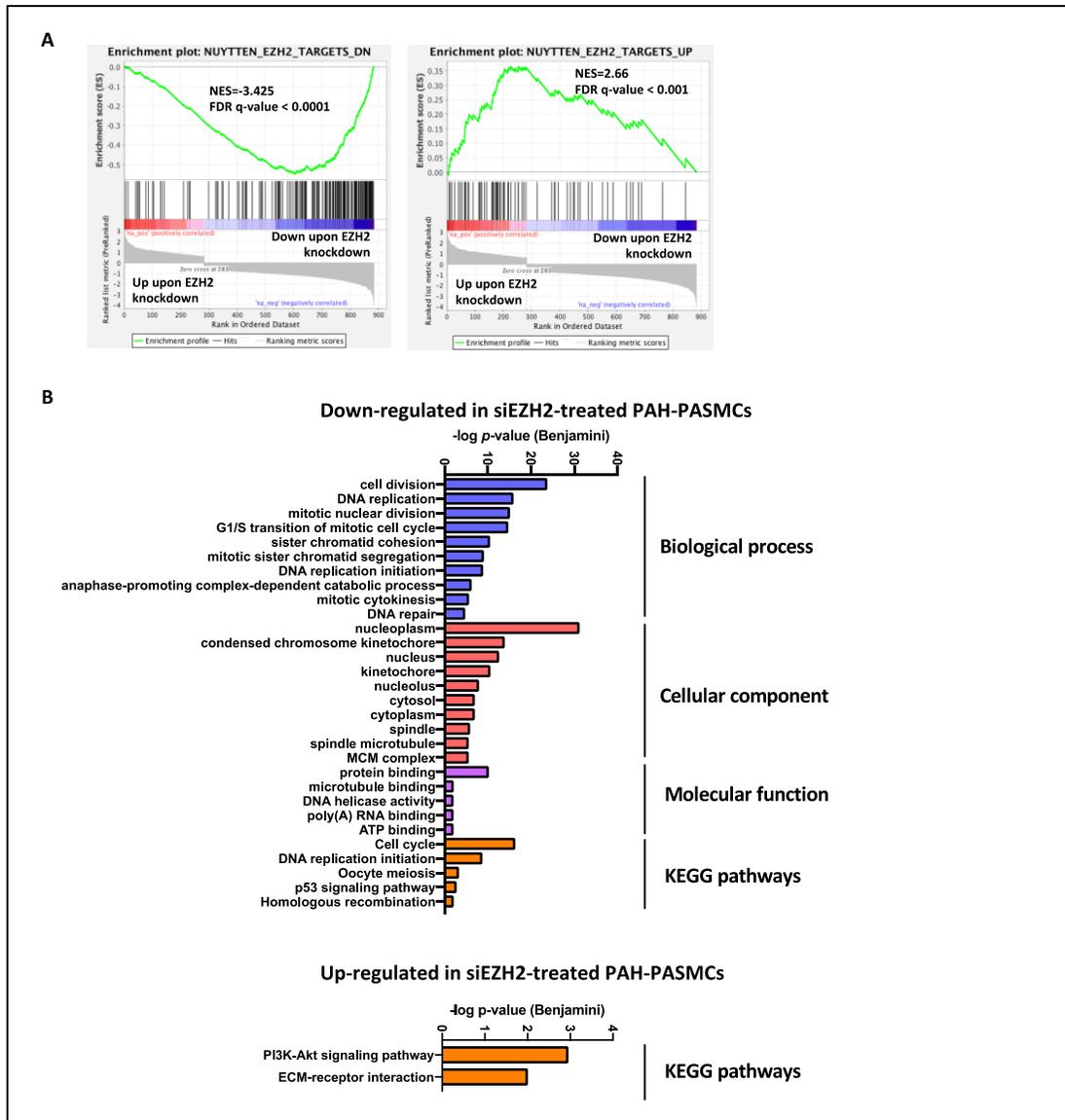


**Figure S1. Expression of EZH2 in PA endothelial cells and tissues from control and PAH patients.** Western blots and corresponding densitometric analyses of EZH2 in isolated pulmonary artery endothelial cells (PAECs), liver and kidney biopsies from control and PAH patients. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean±SEM.

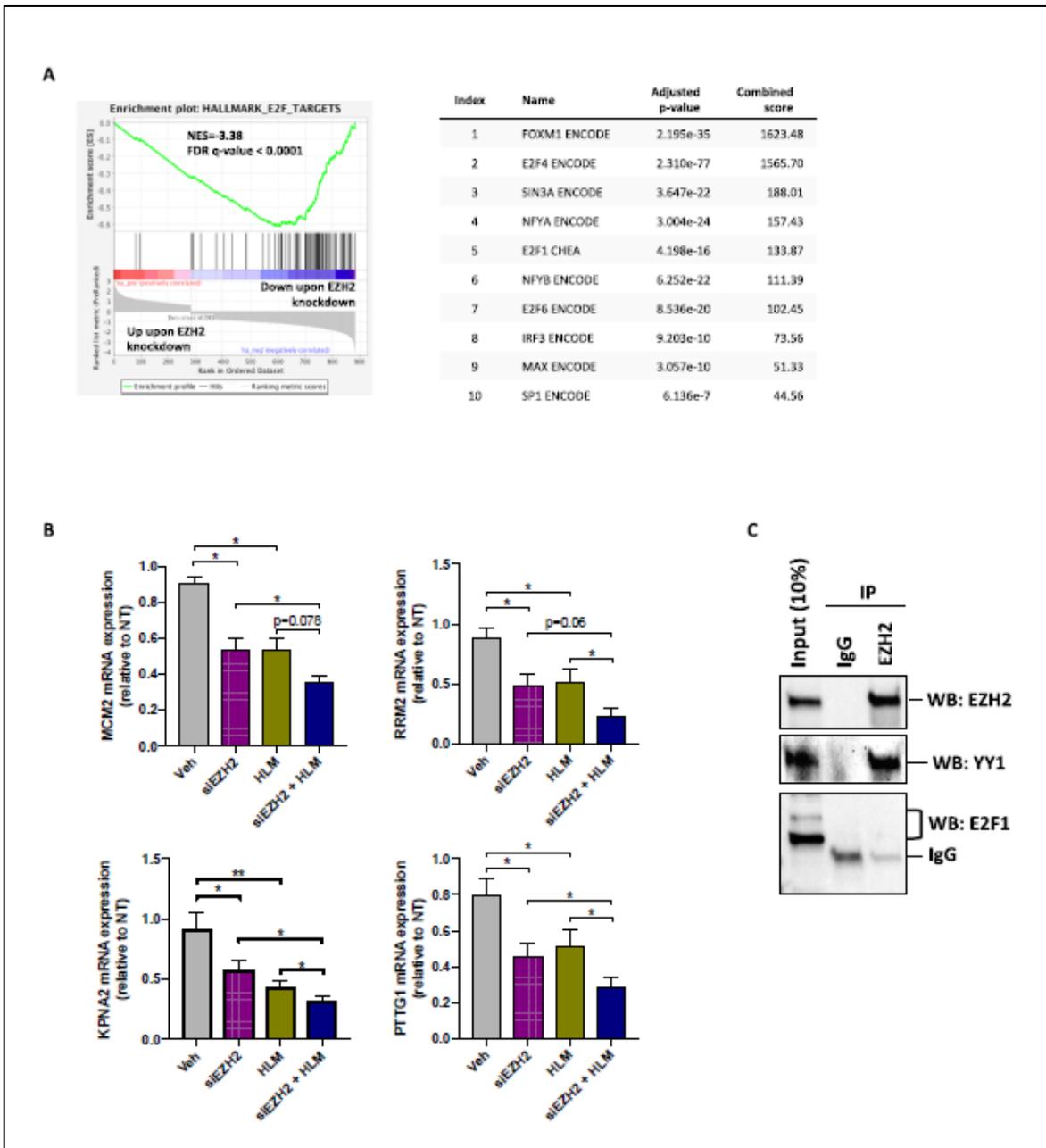


**Figure S2. Effects of EZH2 inhibition and overexpression on PASMC proliferation and resistance to apoptosis.** **A.** Proliferation (EdU labeling) was measured in PAH-PASMCs (n=3) treated or not with siEZH2, GSK126 and EPZ-6438 or their respective controls for 48 hours. Graph shows the percentage of cells with positive nuclear EdU staining. Pharmacological or molecular inhibition of EZH2 reduces PAH-PASMC proliferation. **B.** Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of MCM2 and

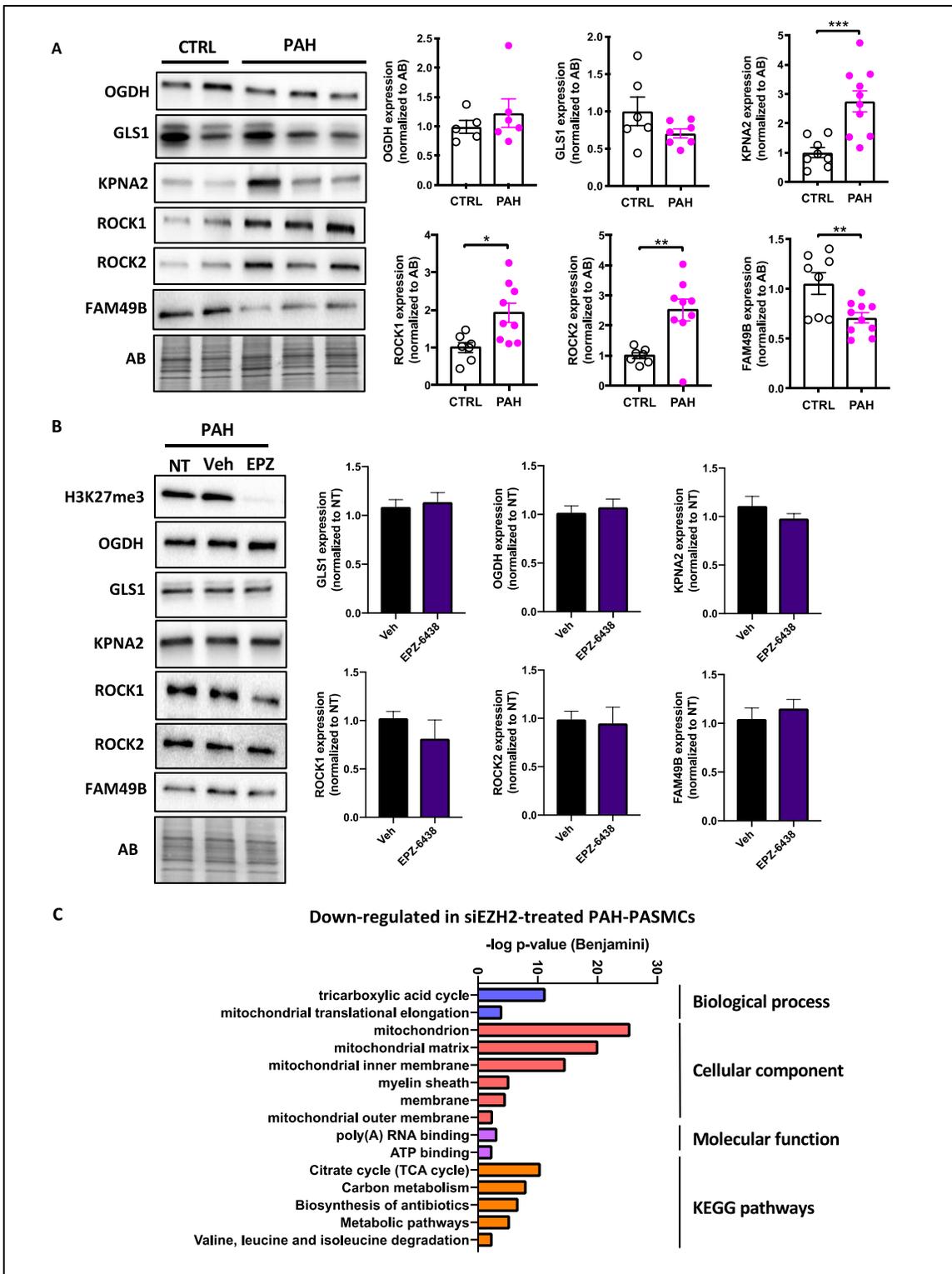
Survivin in PAH-PASMCs (n=3-6) exposed to GSK126, EPZ6438, siEZH2 or their respective controls for 48 hours. Inhibition of EZH2 diminishes MCM2 and Survivin expression levels in PAH-PASMCs. **C.** Representative Western blot of EZH2 in control (CTRL) PASMCs infected or not with an adenovirus encoding human EZH2 (AdEZH2) or with an “empty” adenoviral vector (AdNull). **D.** Representative images and quantitative analysis of Ki67, EdU and Annexin V-positive CTRL-PASMCs (n=4) overexpressing or not EZH2. Forced expression of EZH2 increases CTRL-PASMC proliferation and resistance to apoptosis. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean±SEM; \*P<0.05 and \*\*P<0.01.



**Figure S3. GO and KEGG analysis of differentially expressed genes upon EZH2 knockdown.** **A.** Gene set enrichment analysis (GSEA) charts showing that siEZH2-affected genes in PAH-PASMCs from our RNA-seq data display a significant positive relationship with predefined subset of genes significantly altered in human prostate cancer cells following EZH2 suppression by siRNA. **B.** Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes (KEGG) pathway enrichment results for down- and up-regulated genes between siEZH2- and siSCRN-treated PAH-PASMCs. Blue, red, pink and orange bars indicate biological process, cellular component, molecular function and KEGG pathways, respectively.



**Figure S4. Potential cooperation between EZH2 and E2Fs in stimulation of genes involved in cell proliferation.** **A.** Gene set enrichment analyses using GSEA and Enrichr showing that genes downregulated upon EZH2 silencing are enriched in targets of E2Fs. **B.** Expression levels of MCM2, RRM2, KPNA2 and PTTG1 assessed by real time quantitative PCR in PAH-PASMCs ( $n=5$ ) treated with siEZH2 and/or HLM006474 (HLM) for 48 hours. **C.** PAH-PASMC cell lysate was pulled down with IgG or EZH2 antibody followed by Western blotting with YY1, a positive control, and E2F1 antibody. Representative immunoblot showing that EZH2 does not interact with E2F1 in PAH-PASMCs. Results are representative of four independent experiments performed on four different PAH-PASMC cell lines. Data are presented as mean $\pm$ SEM; \* $P<0.05$  and \*\* $P<0.01$ .



**Figure S5. Analysis of protein expression levels of selected DEPs between control and PAH-PASMCS, and effects of pharmacological EZH2 inhibition.** **A.** Representative Western blots and corresponding densitometric analysis of OGDH, GLS1, KPNA2, ROCK1, ROCK2 and FAM49B in PASMCS isolated from control (n=5-8) and PAH (n=6-10) patients. **B.** Representative Western blots and corresponding densitometric analysis of H3K27me3, OGDH, GLS1, KPNA2, ROCK1, ROCK2 and FAM49B in PAH-PASMCS (n=6) treated or not with EPZ-6438 or its vehicle for 48 hours. **C.** Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of

Gene and Genomes (KEGG) pathway enrichment results for down-regulated proteins between siEZH2- and siSCRM-treated PAH-PASMCs. Blue, red, pink and orange bars indicate biological process, cellular component, molecular function and KEGG pathways, respectively. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean±SEM; \*P<0.05; \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001.

	CTL (n=22)	PAH (n=20)
Age (years)	45±17	51±15
Gender (female (%))	8 (36.4%)	13 (65%)
PAH group		
HPAH		3 (15%)
IPAH		9 (45%)
SSc-PAH		8 (40%)
Autopsy (n(%))		10 (50%)
Transplantation (n(%))		10 (50%)
Pulmonary hemodynamics		
mPAP (mmHg)		55,6±12
CO (L.min-1)		4.5±1.5
PVR (dyne.sec-1.cm-5)		744±223
Medication		
Endothelin receptor antagonist		10 (50%)
PDE5 inhibitor		12 (60%)
Prostacyclin analog		6 (30%)
Unknown		2 (10%)

**Table S1. Clinical characteristics of PAH patients and controls.** Values are means ± SD. HPAH: heritable PAH; IPAH: idiopathic PAH; SSc-PAH: Systemic sclerosis-associated PAH; mPAP: mean pulmonary arterial pressure; CO: cardiac output; PVR: pulmonary vascular resistance; PDE5: phosphodiesterase-5. Note that some patients take more than one type of medication.

		Sexe	Age	PAH	Tissues/Cells used
<b>CTL</b>	#1	M	41	-	PASMCs
	#2	M	45	-	PASMCs
	#3	F	17	-	PASMCs
	#4	F	35	-	PASMCs
	#5	M	21	-	PASMCs
	#6	M	43	-	PASMCs
	#7	F	56	-	PASMCs
	#8	M	21	-	PASMCs
	#9	F	32	-	PASMCs
	#10	F	49	-	PA, Lungs
	#11	M	56	-	PA, Lungs
	#12	M	68	-	PA, Lungs
	#13	M	65	-	PA, Lungs
	#14	F	48	-	PA, Lungs
	#15	M	52	-	PA, Lungs
	#16	M	78	-	PA, Lungs
	#17	F	43	-	Lungs
	#18	F	74	-	Lungs
	#19	M	29	-	Lungs
	#20	M	31	-	Lungs
	#21	M	28	-	Lungs
	#22	M	58	-	PASMCs
<b>PAH</b>	#1	F	23	iPAH	PASMCs, PA, Lungs
	#2	M	52	iPAH	PASMCs, PA, Lungs
	#3	M	59	iPAH	PASMCs, PA
	#4	M	45	iPAH	PASMCs, Lungs
	#5	F	35	Heritable (BMPR2)	PASMCs
	#6	F	32	Heritable	PASMCs
	#7	M	39	iPAH	PASMCs
	#8	M	65	iPAH	PASMCs, PA
	#9	F	45	SSc-PAH	PASMCs, PA
	#10	F	76	SSc-PAH	PASMCs, PA, Lungs

#11	M	52	iPAH	PASMCs
#12	F	61	Heritable (BMPR2)	PA, lungs
#13	F	72	PAH-SSc	PA, lungs
#14	F	46	iPAH	PA, lungs
#15	F	47	PAH-SSc	PA, lungs
#16	F	53	PAH-SSc	PA, lungs
#17	F	54	PAH-SSc	PA
#18	M	77	HTAP-SSc	PA
#19	F	57	iPAH	Lungs
#20	F	36	PAH-SSc	Lungs

**Table S2. Detailed tissue characteristics used in this study.**

Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Exon location
RRM2	F: GGT TCT TTT GCG TCG ATA TTC TG R: GGT TTG TGT ACC AGG TGT TTG	140	7-8
PTTG1	F: GAT GAA TGC GGC TGT TAA GAC R: CTT CAG CCC ATC CTT AGC AA	111	1-2
MCM2	F: CAC CGC TTC AAG AAC TTC CT R: TGC CAA GTC CTC ATA GTT CAC	126	4-5
KPNA2	F: AAG GAT GAC CAG ATG CTG AAG R: ATC AAC AGA CCA ATT TAC AGT GC	111	3-4
18S	F: CGC ACG GCC GGT ACA GTG AA R: GGG AGA GGA GCG AGC GAC CA	76	1

**Table S3. List of primer sequences.**

Antigen	Antibody/clone	Source	Application	Dilution
EZH2	Rabbit monoclonal (D2C9)	Cell Signaling (#5246)	WB IF	1:1000 1:100
$\alpha$ SMA	Mouse monoclonal (1A4)	Sigma-Aldrich (#A2547)	IF	1:200
H3K27me3	Rabbit monoclonal (C36B1)	Cell Signaling (#9733)	WB	1:1000
MCM2	Rabbit polyclonal	Bethyl Laboratories (A300-191A)	WB	1:1000
Survivin	Rabbit monoclonal (71G4B7)	Cell Signaling (#2808)	WB	1:1000
E2F1	Mouse monoclonal (KH95)	Invitrogen (#32-1400)	WB	1:1000
YY1	Mouse monoclonal (H-10)	Santa Cruz Biotechnology (sc-7341)	WB	1:500
OGDH	Rabbit polyclonal	Proteintech (15212-1)	WB	1:5000
GLS1	Mouse monoclonal (3A12A1)	Proteintech (66265-1-Ig)	WB	1:1000
ROCK1	Mouse monoclonal (46)	BD Biosciences (#611137)	WB	1:500
ROCK2	Rabbit polyclonal	Bethyl Laboratories (A300-047A)	WB	1:1000
KPNA2	Rabbit polyclonal	Abcam (ab70150)	WB	
FAM49B	Mouse monoclonal (D-8)	Santa Cruz Biotechnology (sc-390478)	WB	1:1000
Ki67	Rabbit polyclonal	Millipore (AB9260)	IF	1:300

**Table S4. List of primary antibodies used for IF, WB and Co-IP**

# **Chapitre II : L'ARN long non codant H19, *via* miR-675, régule EZH2 par l'intermédiaire d'E2F1**

## **Avant-propos**

Pour cette partie de notre étude, nous allons présenter certains résultats obtenus pour la publication de l'article suivant publié en juillet 2020 dans *Circulation* et intitulé:

### **Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension**

Junichi Omura, MD, PhD1#; **Karima Habbout**, MSc1#; Tsukasa Shimauchi, MD, PhD1 ; Wen-Hui Wu, MD, PhD1,6; Sandra Breuils-Bonnet, MSc1 ; Eve Tremblay, BSc1 ; Sandra Martineau, MSc1 ; Valérie Nadeau, PhD1 ; Kassandra Gagnon, BSc1 ; Florence Mazoyer, BSc1 ; Jean Perron, MD1 ; Francois Potus, PhD2 ; Jian-Hui Lin, MSc3 ; Hamza Zafar, MD3,4; David G. Kiely MD3,4; Allan Lawrie, PhD3 ; Stephen L. Archer, MD2 ; Roxane Paulin, PhD1,5; Steeve Provencher, MD1,5; Olivier Boucherat, PhD1,5\* ; Sébastien Bonnet, PhD1,5\*

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

2 Department of Medicine, Queen's University, Kingston, ON, Canada.

3 Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Science, University of Sheffield, Sheffield, UK.

4 Sheffield Pulmonary Vascular Disease Unit, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, UK.

5 Department of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada.

6 Department of Cardio-Pulmonary Circulation, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

# Authors have equally contributed

\* Co-corresponding authors: Sébastien Bonnet and Olivier Boucherat

\*Addresses for Correspondence: Sébastien Bonnet, PhD and Olivier Boucherat, PhD Pulmonary Hypertension research Group IUCPQ Research Centre 2725, chemin Sainte-Foy Québec, QC Canada, G1V 4G5 Tel: (418) 656-8711 ext 2134

E-mail: [sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca](mailto:sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca)

[olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca)

## Résumé

**Contexte :** La fonction du ventricule droit (VD) est le principal déterminant de la survie chez les patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP). Malgré l'importance clinique reconnue de la préservation de la fonction du VD, les mécanismes cellulaires qui régissent la transition d'un état compensé à un état décompensé restent mal compris et, par conséquent, il n'existe pas de traitements pouvant prévenir la défaillance ventriculaire droite. De plus en plus de preuves indiquent que les ARN longs non codants (ARNlnc) sont des régulateurs importants du développement cardiaque ainsi que de l'apparition de pathologies cardiovasculaires. Néanmoins, leur implication dans le remodelage du VD en HTAP reste à ce jour inconnue.

**Méthodes :** L'expression de l'ARNlnc H19 a été évaluée par PCR quantitative dans le VD de patients classés comme VD contrôle, VD compensé (VDc) ou VD décompensé (VDd) en fonction de l'historique clinique et de l'index cardiaque. L'impact de la suppression d'H19 a été étudié dans deux modèles expérimentaux de défaillance ventriculaire droite : le modèle MCT (monocrotaline) et le modèle PAB (pulmonary artery banding), à l'aide d'un GapmeR. Des analyses d'échocardiographies, de mesures hémodynamiques, histologiques et biochimiques ont été effectuées. Des expériences *in vitro* de gain et de perte de fonction ont été réalisées sur des cardiomyocytes de rat.

**Résultats :** Nous avons démontré qu'H19 est surexprimé dans le VDd des patients HTAP et est corrélé à l'hypertrophie et la fibrose du VD. Des résultats similaires ont été observés dans les modèles MCT et PAB. Nous avons constaté que l'inhibition de l'expression d'H19 limite l'hypertrophie pathologique du VD, la fibrose et la raréfaction capillaire, préservant ainsi la fonction du VD dans les modèles MCT et PAB sans pour autant affecter le remodelage vasculaire pulmonaire. Cet effet cardioprotecteur était accompagné d'une surexpression d'EZH2 (enhancer of zeste homologue 2) médiée par le facteur de transcription E2F1. *In vitro*, la suppression d'H19 empêche l'hypertrophie des cardiomyocytes induite par la phényléphrine, tandis que sa surexpression produit l'effet inverse.

**Conclusions :** Nos résultats identifient H19 comme une nouvelle cible thérapeutique pour empêcher prévenir le développement du remodelage néfaste du VD.

## Abstract

**Background:** Right ventricular (RV) function is the major determinant for both functional capacity and survival in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). Despite the recognized clinical importance of preserving RV function, the subcellular mechanisms that govern the transition from a compensated to a decompensated state remain poorly understood and consequently there are no clinically established treatments for RV failure. Accumulating evidence indicates that long non-coding RNAs (lncRNAs) are powerful regulators of cardiac development and disease. Nonetheless, their implication in adverse RV remodeling in PAH is unknown.

**Methods:** Expression of the lncRNA H19 was assessed by quantitative PCR in RV from patients categorized as control RV, compensated RV (cRV) or decompensated RV (dRV) based on clinical history and cardiac index. The impact of H19 suppression using GapmeR was explored in two rat models mimicking RV failure, namely the monocrotaline (MCT) and pulmonary artery banding (PAB). Echocardiographic, hemodynamic, histological, and biochemical analyses were conducted. *In vitro* gain- and loss-of-function experiments were performed in rat cardiomyocytes.

**Results:** We demonstrated that H19 is up regulated in dRV from PAH patients and correlates with RV hypertrophy and fibrosis. Similar findings were observed in MCT and PAB rats. We found that silencing H19 limits pathological RV hypertrophy, fibrosis and capillary rarefaction, thus preserving RV function in MCT and PAB rats without affecting pulmonary vascular remodeling. This cardioprotective effect was accompanied by E2F transcription factor 1- mediated up-regulation of EZH2 (enhancer of zeste homolog 2). *In vitro*, knockdown of H19 suppressed cardiomyocyte hypertrophy induced by phenylephrine, while its overexpression has the opposite effect.

**Conclusions:** Our findings identify H19 as a new therapeutic target to impede the development of maladaptive RV remodeling.

## Introduction

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie caractérisée par vasoconstriction et une obstruction progressive des artères pulmonaires distales (AP) conduisant à une élévation de la pression artérielle pulmonaire menant à une défaillance du ventricule droit<sup>1</sup>. Malgré les progrès des thérapies ciblant le tonus vasculaire pulmonaire, l'HTAP reste une maladie mortelle avec une survie à 3 ans d'environ 60% pour les patients nouvellement diagnostiqués atteints d'HTAP idiopathique<sup>2,3</sup>. Bien que la fonction ventriculaire droite soit le principal facteur pronostique de morbidité et de mortalité chez les patients atteints d'HTAP, aucune thérapie ciblant le VD n'existe à ce jour. Cela souligne la nécessité de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires du dysfonctionnement ventriculaire droit dans l'HTAP.

Il est maintenant reconnu que le développement de l'hypertrophie du VD dans l'HTAP connaît deux stades<sup>4</sup>. Au stade précoce de la maladie, l'hypertrophie du VD est considérée comme une réponse physiologique à une postcharge accrue (également appelé état compensé) préservant les pressions de remplissage, le débit cardiaque (CO : cardiaque output) et la capacité d'exercice. En réponse à une élévation persistante de la postcharge, les mécanismes compensatoires du VD sont insuffisants et celui-ci transitionne vers une hypertrophie inadaptée, caractérisée par une dilatation du VD, une diminution du CO, une fibrose excessive et une raréfaction capillaire qui contribuent collectivement à la défaillance cardiaque droite et à la mort prématurée du patient<sup>5,6</sup>. Ainsi, les stratégies thérapeutiques devraient viser à soutenir le remodelage adaptatif et / ou à inverser les voies de signalisation responsables de la transition vers un remodelage inadapté du VD.

Les ARN non codants longs (ARNlnc), définis comme des transcrits non codants de plus de 200 nucléotides, sont récemment apparus comme une classe importante de molécules impliquées dans de nombreux processus ainsi que dans le développement de diverses maladies<sup>7</sup>. En interagissant avec l'ARN, l'ADN et les protéines, les ARNlnc peuvent réguler l'expression génique à plusieurs niveaux<sup>7,8</sup>. Bien que plusieurs études aient mis en évidence l'implication des ARNlnc dans l'hypertrophie et la défaillance cardiaque, leur contribution dans le dysfonctionnement ventriculaire en HTAP reste inconnue<sup>9-11</sup>. L'ARNlnc hautement conservé H19 est fortement exprimé durant le développement *in utero* puis diminue après la naissance, sauf dans le muscle squelettique et le cœur<sup>12</sup>.

H19 est connu pour servir de précurseur primaire au micro-ARN miR-675, ajoutant une complexité supplémentaire à ses multiples fonctions biologiques<sup>8</sup>.

Les études transcriptionnelles ont identifié à plusieurs reprises H19 comme l'un des ARNlnc le plus surexprimé dans la défaillance ventriculaire gauche chez l'homme et dans les modèles animaux<sup>13,14</sup>. D'un point de vue mécanisme cellulaire, des études *in vitro* ont montré que H19 régule l'hypertrophie des cardiomyocytes (CM)<sup>15</sup>, favorise l'apoptose de ceux-ci dans des cardiomyopathies et stimule également la prolifération des fibroblastes cardiaques et la fibrose<sup>17,18</sup>; mécanismes impliqués également dans la défaillance cardiaque droite.

De façon intéressante, comme nous l'avons mentionné en introduction, EZH2 est également documenté dans la littérature comme un acteur dans le remodelage cardiaque. En effet, celui-ci une fois inhibé favorise l'hypertrophie et la fibrose dans le tissu cardiaque. La littérature rapporte également H19 comme un régulateur possible d'EZH2.

Compte tenu de ces études, nous émettons l'hypothèse que H19 est impliqué de manière critique dans le dysfonctionnement du VD *via* une régulation d'EZH2 et de ce fait représente une cible moléculaire rare au potentiel thérapeutique prometteur.

## **Méthodes**

### **Tissus humains**

Les procédures expérimentales utilisant des tissus ou des cellules humaines sont conformes aux principes énoncés dans la déclaration d'Helsinki et ont été réalisées avec l'approbation de l'Université Laval et de l'IUCPQ Comités de biosécurité et d'éthique (CER # 20773, CER # 20735 et CER # 21747). Les tissus ont été obtenus auprès de patients ayant préalablement donné leur consentement éclairé écrit. Les échantillons de ventricule droit ont été classés comme VD témoin, VD compensé ou VD décompensé sur la base de leur historique et de l'index cardiaque (IC). En bref, le VD témoin a été obtenu de patients ayant une fonction ventriculaire droite normale qui ont subi une chirurgie de la valve aortique ou une autopsie précoce après mort subite pour laquelle les antécédents médicaux et l'autopsie n'ont révélé aucune maladie respiratoire. Le VD compensé a été obtenu à partir d'une biopsie cardiaque ou d'une autopsie de patients avec hypertrophie du VD et IC préservé (> 2,2 L / min / m<sup>2</sup>)

mesurée par échocardiographie. Le VD décompensé a été obtenu à partir d'une autopsie précoce de patients atteints d'HTAP en phase terminale. Les tissus pulmonaires témoins ou HTAP ont été obtenus au moment d'une transplantation ou d'une autopsie précoce. Les échantillons de ventricule gauche (VG) ont été isolés des patients HTAP et non-HTAP (contrôles) au moment de l'autopsie.

## **Modèles animaux**

Les modèles animaux utilisés pour notre étude sont les modèles MCT et PAB.

Les expériences de notre étude ont été réalisées selon les lignes directrices du Conseil canadien de protection des animaux et approuvées par les comités institutionnels de soins et d'utilisation des animaux de l'Université Laval (2014-176 et 2018-015). Pour les études animales, seuls les rats mâles ont été inclus car ceux-ci développent une HTAP plus sévère lorsqu'ils sont exposés à la monocrotaline. Des rats mâles Sprague-Dawley (pesant entre 250-300g) ont été achetés à Charles River. L'HTAP a été induite par une injection de MCT sous-cutanée (60 mg / kg; Sigma, St. Louis, USA). Les rats contrôles ont reçu une injection de solution saline. Entre les semaines 1 et 5 suivant l'injection de MCT ou à la fin du protocole expérimental, les rats ont été anesthésiés avec 2-3% d'isoflurane et ont subi un cathétérisme cardiaque droit comme présenté dans la partie méthodologie. Les rats ont été classés en ventricule droit compensé précoce ou tardif (VDc) et décompensé précoce ou tardif (VDd) en fonction du débit cardiaque (CO), de la RVEDP (right ventricle end diastolic pressure) et des signes de défaillance cardiaque (figure 1). La RVEDP étant un très bon indicateur de la rigidité ventriculaire, son augmentation est un signe d'hypertrophie importante associée à une rigidité élevée. Également, cette classification a été validée avec les paramètres histologiques et moléculaires tels que : la résistance pulmonaire totale (TPR), l'indice de Fulton, l'expression du peptide natriurétique auriculaire (Nppa) et natriurétique de type B peptide (Nppb), la fibrose cardiaque ainsi que la section transversale des myocytes cardiaques.

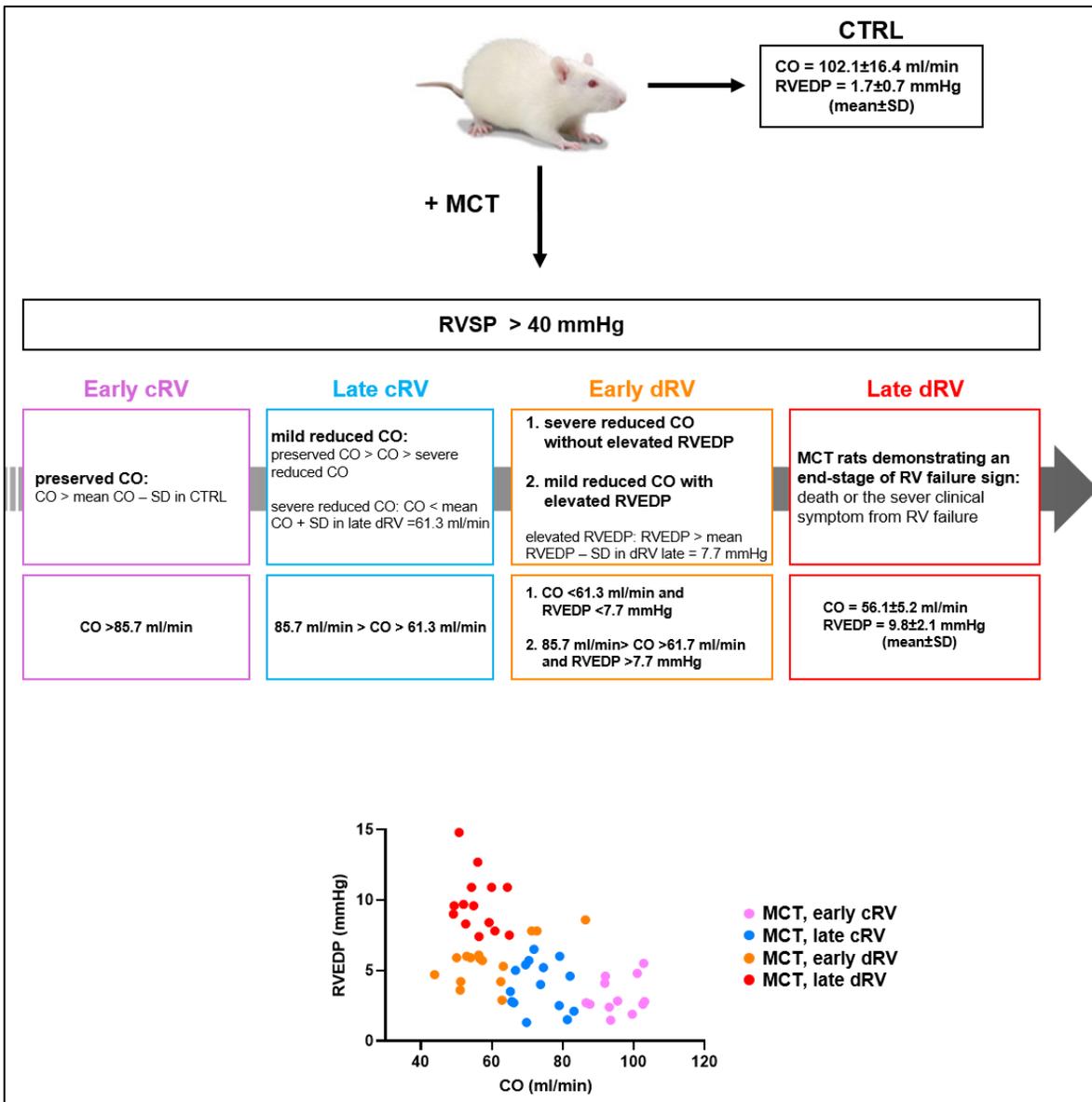


Figure 1. Classification du modèle MCT.

Les rats MCT sont classés en 4 groupes en fonction de leurs paramètres hémodynamiques. En rose : Le groupe ventricule droit compensé précoce (early cRV: compensated right ventricle) avec un débit cardiaque préservé. En bleu : Le groupe ventricule droit compensé tardif regroupant les rats ayant une diminution du débit cardiaque modéré. En orange : Le groupe ventricule droit décompensé précoce (late dRV: decompensated right ventricle) présentant une diminution du débit cardiaque associé ou non à une augmentation de la RDVEP. En rouge : Le groupe ventricule droit décompensé tardif ou les rats démontrent des signes cliniques de défaillance cardiaque droite.

Pour le modèle PAB des rats mâles Sprague-Dawley (environ 200 g) ont été randomisés en deux groupes: contrôle (Sham) ou PAB. Entre les semaines 3 et 8 suivant la chirurgie, les rats ont été euthanasiés lorsqu'ils présentaient des symptômes cliniques de défaillance cardiaque droite ou à la fin du protocole expérimental. Les rats ont été classés en ventricule droit compensé (VDc) et ventricule droit décompensé (VDd) en fonction des signes cliniques de défaillance cardiaque droite. En bref, les rats PAB sans signes cliniques de défaillance cardiaque droite ont été classés comme VDc. Les rats PAB démontrant des forts signes de défaillance du ventricule droit ont été classés comme VDd. À la suite des mesures hémodynamiques, le cœur, les poumons et d'autres organes d'intérêt ont été prélevés. Le VD a été disséqué du VG et du septum (S) afin de calculer l'indice de Fulton (rapport pondéral  $RV / (LV + S)$ ). Toutes les mesures et analyses ont été effectuées en aveugle.

### **Traitement au GapmeR**

Dans le modèle MCT, les rats ont été affecté dans deux groupes de façon aléatoire : 1) MCT avec GapmeR H19 (Exiqon) et 2) MCT avec contrôle négatif GapmeR (Exiqon). Le GapmeR a été administré par voie intrapéritonéale 2 et 3 semaines après l'injection de MCT. Le GapmeR H19 et le contrôle négatif ont été dilués dans une solution isotonique de NaCl à 0,9% pour obtenir la concentration finale exacte (10 mg / kg) avant l'injection. Cette dose a été choisie sur la base d'expériences antérieures. Des rats contrôle ont été injectés avec une solution saline. Dans le modèle PAB, les rats ont également été randomisés dans deux groupes suivants : 1) PAB avec GapmeR H19 et 2) PAB avec contrôle négatif. Le GapmeR (10 mg / kg) a été administré par voie intrapéritonéale une fois par semaine pendant 5 semaines, 3 semaines après la chirurgie PAB. Le cathétérisme cardiaque droit a été réalisé à la fin des protocoles expérimentaux ou le jour où le comité d'éthique a recommandé l'euthanasie pour le bien-être de l'animal. La séquence du GapmeR H19 était de 5'-GAACCACACCATGCTC-3'. La séquence de contrôle GapmeR-négatif était de 5'-AACACGTCATACGC-3'.

### **Culture cellulaire et traitement**

Les cellules de rat H9c2 ont été achetées auprès de l'ATCC (Manassas, USA) et cultivées comme recommandé par la compagnie. Les cardiomyocytes néonataux ont été isolés par

digestion enzymatique de ventricules droits de rats Sprague Dawley (âgés de 2 à 3 jours). Les cellules ont été remises en suspension dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS, Gibco, Karlsruhe, Allemagne) et ensemencées dans des boîtes de culture en plastique pendant 90 minutes afin d'éliminer les cellules qui ne sont pas des cardiomyocytes. Les fibroblastes cardiaques humains ont été prélevés sur les échantillons de biopsies du VD obtenus de patients au moment de la chirurgie de remplacement de la valve aortique et isolés par une digestion enzymatique (élastase et collagénase).

Des petits ARN interférents (siARN) spécifiques pour H19, EZH2 et E2F1 ainsi que leurs contrôles respectifs ont été achetés auprès de Life Technologies (Waltham, États-Unis). Les cellules ont été transfectées de façon transitoire avec le siARN H19 de rat (50 nmol / L ID # 4390771), siEZH2 (50 nmol / L, ID # 1330001), siE2F1 (50 nmol / L, ID # 173618), le siH19 humain (50 nmol / L, ID # 272452) ou leurs contrôles correspondants. Toutes les transfections ont été effectuées en utilisant un agent de transfection, la lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Waltham, USA) selon le protocole du fabricant. Les cellules ont été cultivées dans du DMEM contenant 0,1% de FBS pendant 24 heures suivi d'une transfection. Vingt-quatre heures après la transfection, la phényléphrine (PE, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) ou son véhicule (PBS) a été ajouté au milieu (concentration finale de 50  $\mu$ mol / L) pour induire une hypertrophie. Pour étudier les effets d'une surexpression d'H19 ou d'EZH2, les cellules ont été cultivées dans une solution à 10% de FBS et ont été infectées avec un adénovirus humain H19 ou un adénovirus de rat EZH2 (Applied Biological Materials, Richmond, Canada) à une multiplicité d'infection de 100. Quarante-huit heures après l'infection, le milieu de culture a été remplacé par du DMEM contenant 0,1% de FBS avec ou non de la PE (final concentration de 50  $\mu$ M). Les cellules ont été récoltées 24 heures après le traitement PE pour de l'extraction d'ARN / protéine ou des expériences d'immunofluorescence. Pour étudier les effets de miR-675, les cellules ont été infectées avec un mimic miR-675-3p (mimic-675, 5 nmol / L) ou contrôle négatif mimic-CTRL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, États-Unis). Les cellules ont été cultivées dans du DMEM contenant 0,1% de FBS pendant 24 heures suivi d'une infection puis ont été récoltées pour de l'extraction d'ARN / protéine ou des expériences d'immunofluorescence. Pour étudier les effets de l'inhibition pharmacologique d'E2F, des cellules ont été cultivées dans du DMEM contenant 0,1% FBS et exposées à HLM006474 (Medchemexpress, Monmouth Junction,

USA) avec une concentration finale de 40  $\mu\text{mol} / \text{L}$  ou son véhicule (DMSO) pendant 24 heures. Les résultats d'expériences *in vitro* ont été obtenus au cours d'au moins 3 expériences indépendantes.

### **Mesure de la surface cellulaire *in vitro***

La surface cellulaire a été mesurée à l'aide d'un marque fluorescent de l'actine fibrillaire (actine-F). Pour ce marquage, les cardiomyocytes ont été fixés avec du paraformaldéhyde à 4% dans du PBS pendant 15 minutes. Après un lavage au PBS, les cellules ont été colorées avec de la phalloïdine conjuguée à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) pendant 30 minutes à température ambiante. Ensuite, un marquage nucléaire au DAPI a été effectué. Les cellules ont été observées par microscopie confocale à l'aide d'un microscope Axio Observer (Zeiss). Les images ont été acquises en utilisant le système Zen et analysées semi-quantitativement pour la surface cellulaire avec le logiciel ImageJ. Dans chaque expérience, au moins 50 cellules ont été mesurées dans chaque groupe.

### **RT-qPCR**

Des RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) quantitatives (qRT-PCR) ont été réalisées avec les amorces référencées dans le tableau 1. En bref, l'ARN total des cellules / tissus a été extrait à l'aide de Trizol (Invitrogen) conformément aux instructions du fabricant. L'ARN total a été rétro-transcrit en ADNc (ADN complémentaire) à l'aide du kit de synthèse d'ADNc qScript Flex (Quanta Bio, Beverly, USA) en utilisant 1  $\mu\text{g}$  d'ARN ou le kit TaqMan RNA-to-CT 1-Step (Applied Biosystems). Les microARN ont été rétro-transcrits à l'aide du kit de transcription inverse TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems, Foster City, USA) avec des amorces spécifiques miARN fournies par Thermo Fisher Scientific. La PCR quantitative a été réalisée en triplicata avec le système de PCR en temps réel QuantStudio 7 Flex (Applied Biosystems). Les amorces utilisées sont présentées dans le tableau ci-dessous. Le niveau d'expression relatif de chaque cible a été déterminé par la méthode  $\Delta\Delta\text{Ct}$ . L'ARN ribosomal 18S et U6 snRNA (U6 RNU6B) ont été utilisés comme gènes de références pour les études d'ARNm et de microARN respectivement.

TaqMan Assay (Thermo Fisher Scientific)	
Human H19	Hs00262142 g1
Rat NPPA	Rn00664637 g1
Rat NPPB	Rn00580641 m1
SYBR Green Primers	
Human H19	LPH01147A (Qiagen)
Rat 18s rRNA	PPR57734E (Qiagen)
Rat H19	LPR07420A (Qiagen)
Human 18s rRNA (forward 5'-3')	CGCACGGCCGGTACAGTGAA
Human 18s rRNA (reverse 5'-3')	GGGAGAGGAGCGAGCGACCA
Rat Coll1 $\alpha$ 1 (forward 5'-3')	CATTGTGTATGCAGCTGACTTC
Rat Coll1 $\alpha$ 1 (reverse 5'-3')	CGCAAAGAGTCTACATGTCTAGG
Rat Col3 $\alpha$ 1 (forward 5'-3')	TCTCTAGACTCATAGGACTGACC
Rat Col3 $\alpha$ 1 (reverse 5'-3')	TTCTTCTCACCTGCTTCAC
Rat Myh6 (forward 5'-3')	TCATCCACGGCCAATTCTTG
Rat Myh6 (reverse 5'-3')	CACCAGAATCCAGGCTCAA
Rat Myh7 (forward 5'-3')	TCATGGACCTGGAGAACGAC
Rat Myh7 (reverse 5'-3')	CCTGGCGTTGAGTGCATTT
Rat EZH2 (forward 5'-3')	CGCTCTTTTGTGCGACGATGT
Rat EZH2 (reverse 5'-3')	TATCCGCTCAGCAGTAAGGG
MicroRNA TaqMan Assays (Thermo Fisher Scientific)	
Human miR-675-5p	002005
Human miR-675-3p	121124 mat
Rat miR-675-3p	465021 mat
U6 snRNA	001973

Tableau 1. Liste des amorces utilisées en RT-qPCR.

### Immunobuvardage (Western blot)

Les protéines totales ont été extraites du ventricule droit humain et des modèles expérimentaux en utilisant un tampon d'extraction contenant 2% de Chaps et un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche, Bâle, Suisse). La concentration de protéine a été déterminée en utilisant la méthode colorimétrique de Bradford. Des quantités égales de protéines ont été chargées sur des gels d'électrophorèse SDS page et transférées sur des membranes de polyfluorure de vinylidène (PVDF) à l'aide d'un système de transfert semi-liquide (Bio-Rad, Hercules, USA). Les membranes ont ensuite été bloquées avec du lait en poudre écrémé à 5% ou 5% de sérum de chèvre dans un tampon TBS-T pendant 1 heure. Puis

les membranes ont été incubées pendant une nuit à 4 ° C avec des anticorps primaires (tableau 2). Les membranes ont par la suite été incubées avec l'anticorps secondaire approprié conjugué à la HRP pendant 2 heures. Les anticorps ont été révélés en utilisant un réactif ECL (Perkin – Elmer) et utilisant le système d'imagerie Chemidoc MP (Bio-Rad). L'expression de protéine a été quantifiée à l'aide du logiciel Image lab (Bio-Rad) et normalisée par rapport à l'amidoblack, comme indiqué précédemment.

<b>Primary antibody</b>	<b>Vendor</b>	<b>Catalog #</b>	<b>Blocking solution</b>
AMPK $\alpha$	Cell Signaling	2532	5% non fat dry milk
p(Thr172)-AMPK $\alpha$	Cell Signaling	2535	5% non fat dry milk
CAMKII $\delta$	Abcam	Ab181052	5% non fat dry milk
4E-BP1	Cell Signaling	9644	5% non fat dry milk
p(Thr70)-4E-BP1	Cell Signaling	9455	5% non fat dry milk
p(Thr37/46)-4E-BP1	Cell Signaling	2855	5% non fat dry milk
EZH2	Cell Signaling	5246	5% non fat dry milk
IGF1R	Cell Signaling	3027	5% goat serum
S6K1	Cell Signaling	9202	5% non fat dry milk
p(Thr389/412)-S6K1	Cell Signaling	9234	5% non fat dry milk
E2F1	Invitrogen	32-1400	5% non fat dry milk
$\alpha$ SMA	Abcam	Ab5694	5% non fat dry milk

Tableau 2. Liste des anticorps utilisés pour les réactions d'immunobuvardage.

### **Analyse statistique**

Les valeurs ont été exprimées en moyenne  $\pm$  ESM. Pour tester si les données collectées étaient normalement distribuées, le test de normalité de Shapiro-Wilk a été appliqué. Les comparaisons des moyennes entre 2 groupes ont été effectuées en utilisant un test t de Student

non apparié pour des échantillons normalement distribués ou un test U de Mann-Whitney pour échantillons non distribués normalement. Les comparaisons des moyennes entre trois groupes ou plus étaient effectuées par analyse unidirectionnelle de la variance (ANOVA) pour les échantillons normalement distribués suivi par la méthode Tukey DSH (différence significative honnête) ou la méthode Dunnett, selon le cas. Des tests de comparaison multiples pour les données non distribuées normalement ont été effectués en utilisant le test Kruskal-Wallis non paramétrique.

## Résultats

### **H19 est surexprimé dans le ventricule droit décompensé et corrèle avec la fibrose et l'hypertrophie chez les patients HTAP**

Pour explorer le rôle d'H19 dans le remodelage du ventricule droit en HTAP, nous avons d'abord mesuré l'expression d'H19 dans le VD contrôle, par rapport au VDc et au VDd (figure 2.A). L'expression d'H19 était augmentée de façon significative dans le VDc par rapport au témoin et un peu plus dans les VDd de patients HTAP. L'expression de miR-675-3p et miR-675-5p, les produits issus d'H19 ont montré un profil d'expression similaire (figure 2.B-C), avec une tendance à augmenter dans le VDc et plus encore dans le VDd. Nous avons ensuite quantifié l'expression d'H19 dans le VG et les poumons contrôles et HTAP (figure 2. D-E). Cependant, aucune différence significative dans l'expression d'H19 n'a été observée. Pour étayer ces résultats, nous avons effectué une hybridation *in situ* à l'aide d'une sonde dirigée contre H19 sur des tissus humains contrôles de ventricules droits, de VDc et de VDd (figure 2. F). Conformément aux résultats obtenus par qRT-PCR, l'intensité globale du signal d'H19 est nettement augmentée dans le groupe VDd. Ces analyses ont en outre révélé qu'H19 est exprimé dans toutes les cellules cardiaques. Pour établir le rôle physiopathologique d'H19 dans la défaillance cardiaque droite, la fibrose cardiaque et l'hypertrophie des cardiomyocytes ont été mesurées dans nos biopsies de ventricules droits (figure 2. G-K). Les analyses ont révélé que l'expression d'H19 est en corrélation positive avec la fibrose et l'hypertrophie.

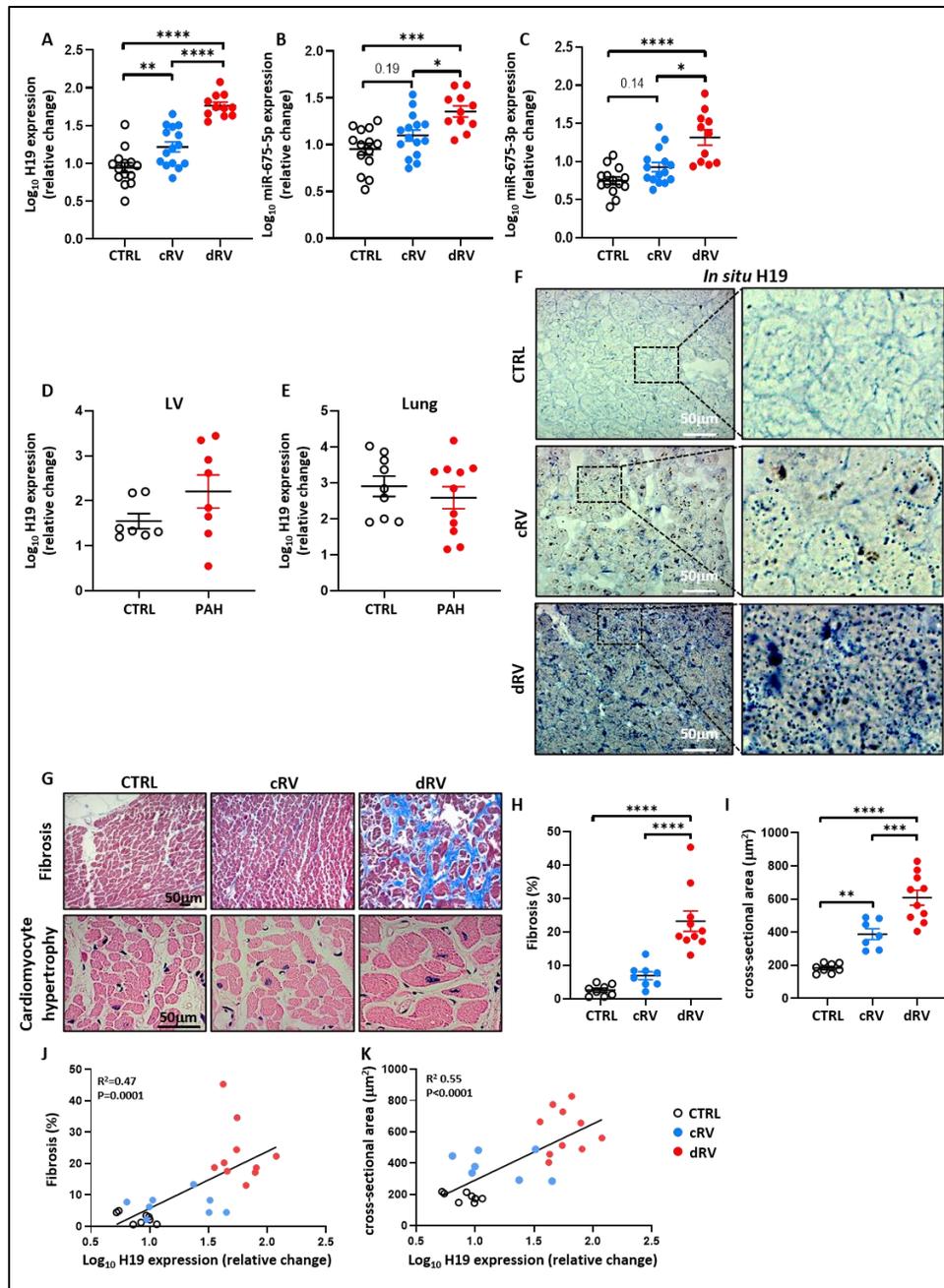


Figure 2. Expression d'H19 dans le ventricule droit HTAP.

(A) Analyses quantitatives RT-PCR (qRT-PCR) de H19 dans les RV humains à partir de contrôles (CTRL) RV compensée (cRV) et RV décompensée (dRV). (B) et (C) analyses qRT-PCR de miR675-5p (B) et miR-675-3p (C) dans les RV humains de CTRL, cRV et dRV. (D) qRT-PCR analyses de H19 dans les VG humains de patients CTL et HTAP. (E) Analyses qRT-PCR de H19 dans poumons de patients CTRL et HTAP. (F) Images représentatives de l'hybridation in situ H19 dans RV humains de CTRL, cRV et dRV. Les points bleus représentent le signal de la sonde H19. À droite, les images montrent une imagerie à fort grossissement réalisée dans la zone délimitée par le carré en pointillé (G) Images représentatives de RV humains colorés au trichrome

de Masson ou hématoxyline-éosine. (H) Analyse quantitative de la zone fibrotique dans les RV humains de CTRL, cRV et dRV. (I) Analyse quantitative de l'aire transversale des cardiomyocytes dans les RV humains à partir de CTRL, cRV et dRV. (J et K) Corrélations entre les niveaux d'expression de H19 et la zone de fibrose (Pearson  $R^2 = 0,47$ ,  $p = 0,0001$ ) ou l'aire transversale des cardiomyocytes (Pearson  $R^2 = 0,55$ ,  $p < 0,0001$ ) dans le RV humain. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  EMS.  $n = 7$  à 14 patients / groupe. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

De façon intéressante, nous avons également observé que l'expression d'EZH2 était augmentée dans le ventricule droit compensé. Dans le ventricule droit décompensé son expression est diminuée, stade durant lequel l'expression d'H19 est augmentée (figure 3).

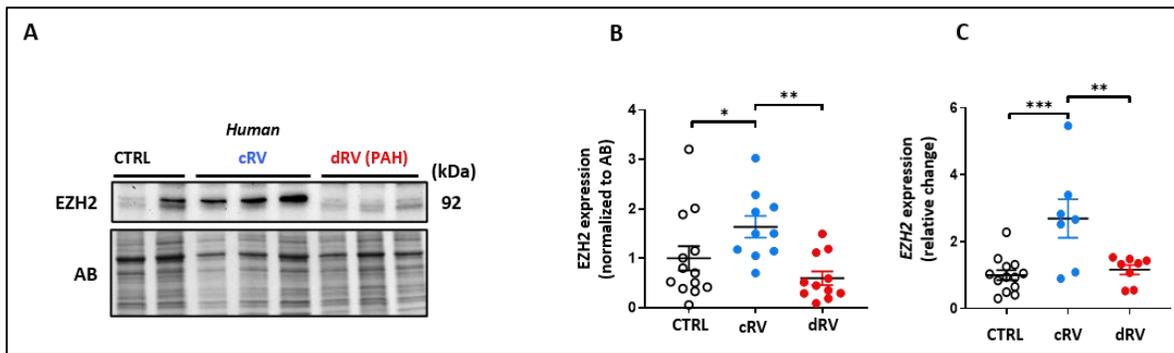


Figure 3. Expression d'EZH2 dans le ventricule droit.

(A) Expression d'EZH2 (western blot) dans les RV humains à partir de contrôles (CTRL), de RV compensé (cRV) et RV décompensé (dRV). (B) et (C) quantification de l'expression d'EZH2.

### H19 est surexprimé dans le ventricule droit décompensé des modèles expérimentaux

La classification des rats MCT est supportée par l'altération du débit cardiaque et de la RVEDP (figure 4. A-B). Dans ce modèle, H19 et miR-675 se retrouvent significativement et spécifiquement surexprimés dans le VD de rats MCT aux stades précoces et tardifs de décompensation par rapport aux stades compensés précoces et tardifs (figure 4. C-D). De façon similaire à nos résultats chez l'homme, le niveau d'expression d'H19 est négativement corrélé au débit cardiaque (figure 4. A) et positivement corrélée avec la fibrose et l'hypertrophie des myocytes (figure 4. E).

Pour renforcer davantage nos résultats, un deuxième modèle a été utilisé, le modèle PAB. Les rats PAB ont été classés en 1) VDc et 2) VDd en fonction des signes cliniques de défaillance cardiaque droite (figure 4.F-G). Par rapport au groupe contrôle, H19 et miR-675 étaient inchangés dans le VDc mais considérablement augmentés dans le VDd (figure 4. H-I). En revanche, aucun changement d'expression n'a été observé dans le ventricule gauche. De plus, l'expression d'H19 était corrélée positivement à la fibrose, à l'hypertrophie des myocytes (figure 4. J), également mesurée avec *Nppa* et *Nppb* (données supplémentaires présentées en annexe I). Ici aussi, le niveau d'expression d'H19 étaient négativement corrélé avec le débit cardiaque. Cela suggère qu'H19 est impliqué dans la transition du VDc au VDd dans les modèles animaux mais aussi chez les patients HTAP.

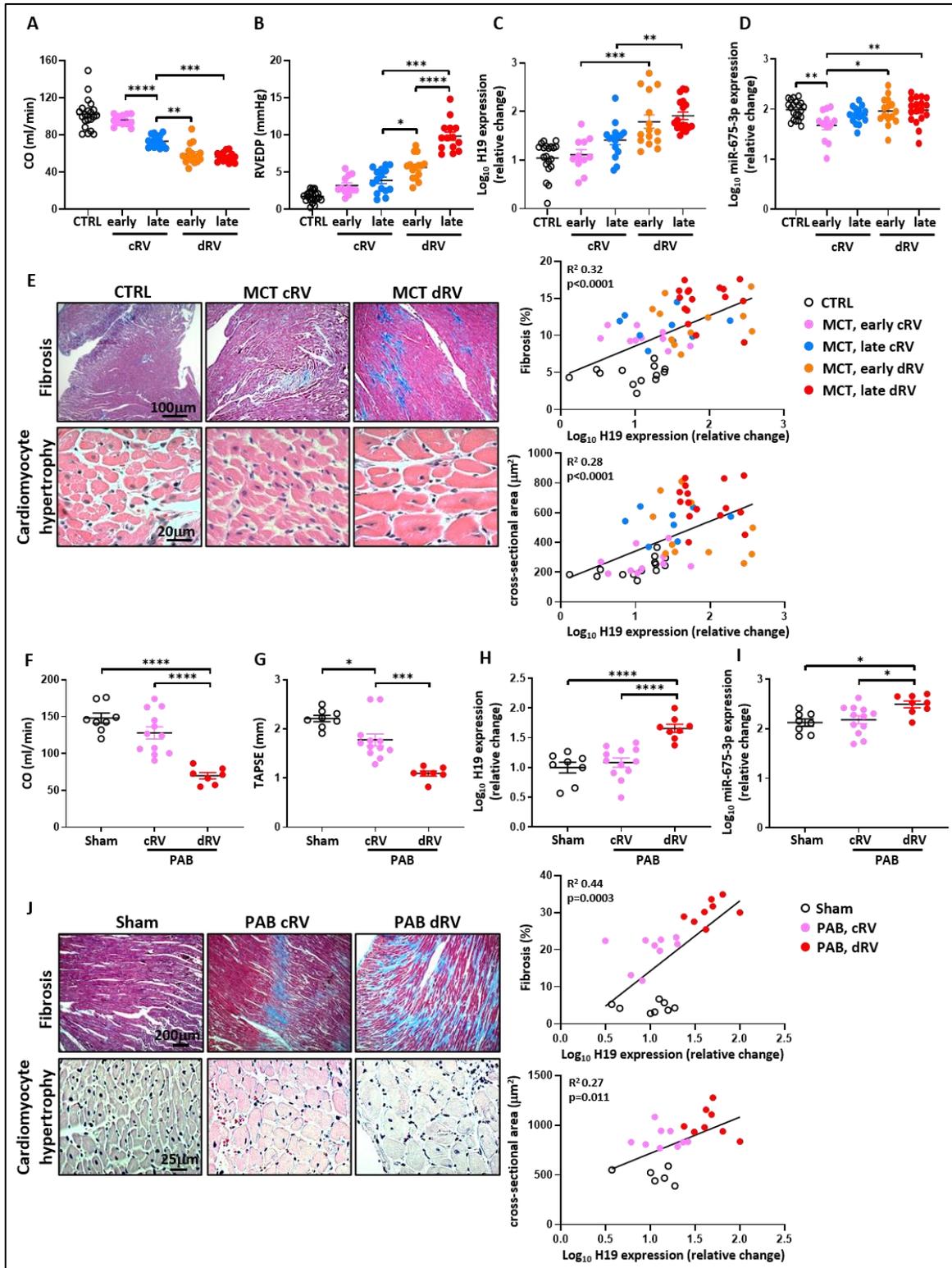


Figure 4. H19 est surexprimé dans les modèles expérimentaux.

(A et B) Mesures du débit cardiaque (CO, A) et de la pression diastolique ventriculaire droite (RVEDP, B) chez les rats témoins (CTRL) et MCT avec RV compensé précoce et tardif (cRV), décompensé précoce et tardif

(dRV). (C) qRT-PCR de l'expression d'H19 dans les RV de rats CTRL et MCT avec un cRV précoce, tardif cRV, dRV précoce et dRV tardif. (D) qRT-PCR de miR-675-3p dans les RV de CTRL et MCT présentant un cRV précoce, un cRV tardif, un dRV précoce et un dRV tardif. (E) Gauche, images représentatives de RV colorés au trichrome de Masson ou hématoxyline-éosine de rat CTRL ou MCT avec cRV ou dRV. À droite, corrélation entre les niveaux d'expression d'H19 et la zone de fibrose RV (Pearson  $R^2 = 0,32$ ,  $p < 0,0001$ ) ou la section transversale des cardiomyocytes (Pearson  $R^2 = 0,28$ ,  $p < 0,0001$ ). (F et G) CO (F) et TAPSE (Tricuspid annular plane systolic excursion, G) ont été mesurés par échocardiographie chez des rats CTRL et PAB présentant cRV ou dRV. (H) Analyses par qRT-PCR de l'expression d'H19 dans les RV de rats contrôles et PAB avec cRV et rats PAB avec dRV. (I) qRT-PCR de miR-675-3p dans les RV de rats contrôles, PAB avec cRV et dRV. (J) Gauche, images représentatives de RV colorés au trichrome de Masson ou hématoxyline-éosine de rats contrôles ou PAB avec cRV ou dRV. Droite, corrélation entre les niveaux d'expression d'H19 et la fibrose (Pearson  $R^2 = 0,44$ ,  $p = 0,0003$ ) et la section transversale des cardiomyocytes (Pearson  $R^2 = 0,27$ ,  $p = 0,011$ ). Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM.  $n = 7-21$  rats / groupe. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

De façon similaire aux résultats obtenus chez l'homme, dans les deux modèles expérimentaux, nous avons observé le même profil d'expression d'EZH2, soit une diminution de l'expression d'EZH2 dans le VDd, là où H19 est surexprimé, comparativement au VDC (figure 5).

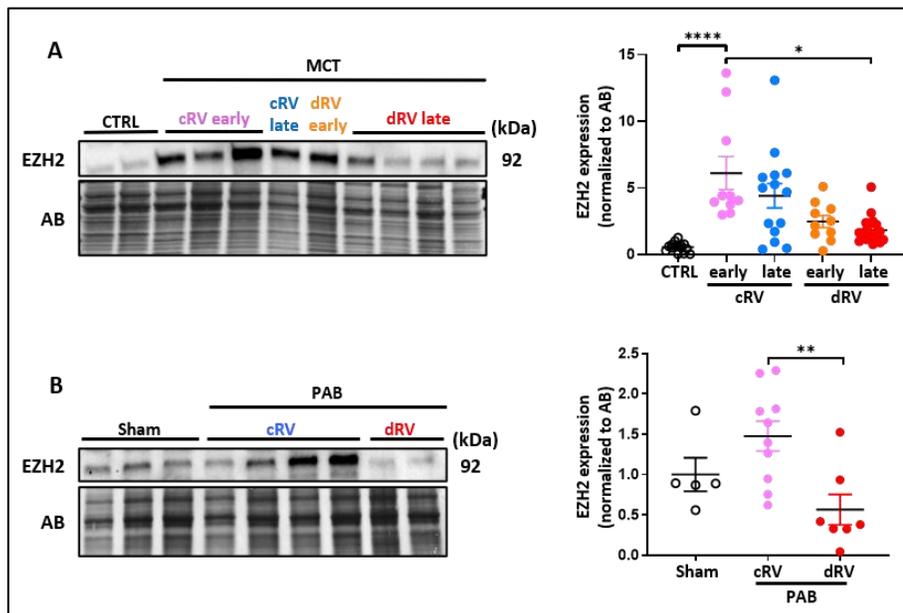


Figure 5. Expression d'EZH2 dans les ventricules droits des modèles expérimentaux.

(A et B) Gauche : expression d'EZH2 (western blot) dans les RV de rats MCT (A) et PAB (B) contrôles, cRV et dRV. Droite : quantification de l'expression d'EZH2 normalisée à l'amidoblack.

## L'inhibition d'H19 protège le cœur droit et en améliore les fonctions

Pour la suite de notre étude, nous avons décidé de tester le potentiel thérapeutique d'un GapmeR H19 dans nos deux modèles expérimentaux (figure 6).

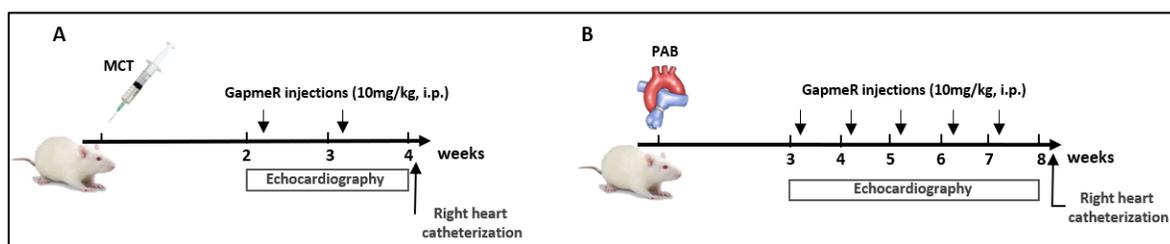


Figure 6. Protocole de traitements de rats MCT et PAB au GapmeR H19.

(A) protocole de traitement des rats MCT. Après induction de la pathologie par l'injection de monocrotaline les rats ont subi une injection de GapmeR H19 à raison d'une fois par semaine pendant 2 semaines avant euthanasie et mesures hémodynamiques par cathétérisme cardiaque droit. (B) protocole de traitement des rats PAB. Trois semaines après la chirurgie : les rats ont subi une injection de GapmeR H19 à raison d'une fois par semaine pendant cinq semaines avant l'euthanasie et la mesure des paramètres hémodynamiques.

Dans le modèle MCT, nous avons observé que l'administration du GapmeR H19 induit une réduction significative de l'expression d'H19 et miR-675-3p par rapport aux rats traités avec un GapmeR témoin (figure 7. A-B). De plus, la courbe de survie démontre un taux de survie plus élevé chez les rats ayant reçu le traitement comparativement aux rats témoins (figure 7. C).

Le cathétérisme cardiaque ainsi que des échographies ont démontré des effets bénéfiques sur les paramètres hémodynamiques, tels qu'une amélioration du débit cardiaque chez les rats ayant reçu le traitement au GapmeR H19 (figure 7. D-F). Nous avons observé des améliorations structurelles du ventricule droit notamment au niveau de la dilatation de celui-ci. Ces améliorations hémodynamiques et structurelles étaient associées à une diminution de l'expression des marqueurs de stress cardiaque Nppa, Nppb et du rapport Myh7 / Myh6 (données présentées en annexe I).

Nous avons ensuite évalué le pourcentage de fibrose dans le ventricule droit à l'aide d'une coloration au trichrome de Masson et nous avons observé une diminution significative de la surface occupée par le tissu fibrotique. Conformément à ce constat, l'expression des marqueurs de fibrose Col3 $\alpha$ 1 et Col1 $\alpha$ 1 ainsi que la surface des cardiomyocytes ont été considérablement réduites chez les rats traités avec le GapmeR H19 (figure 7. G-K).

Enfin, la densité capillaire au niveau du ventricule droit a été significativement augmentée chez les rats ayant reçu le GapmeR H19 (données présentées en annexe I). Collectivement, ces données démontrent que l'inhibition d'H19 retarde la progression vers la défaillance cardiaque droite dans le modèle MCT.

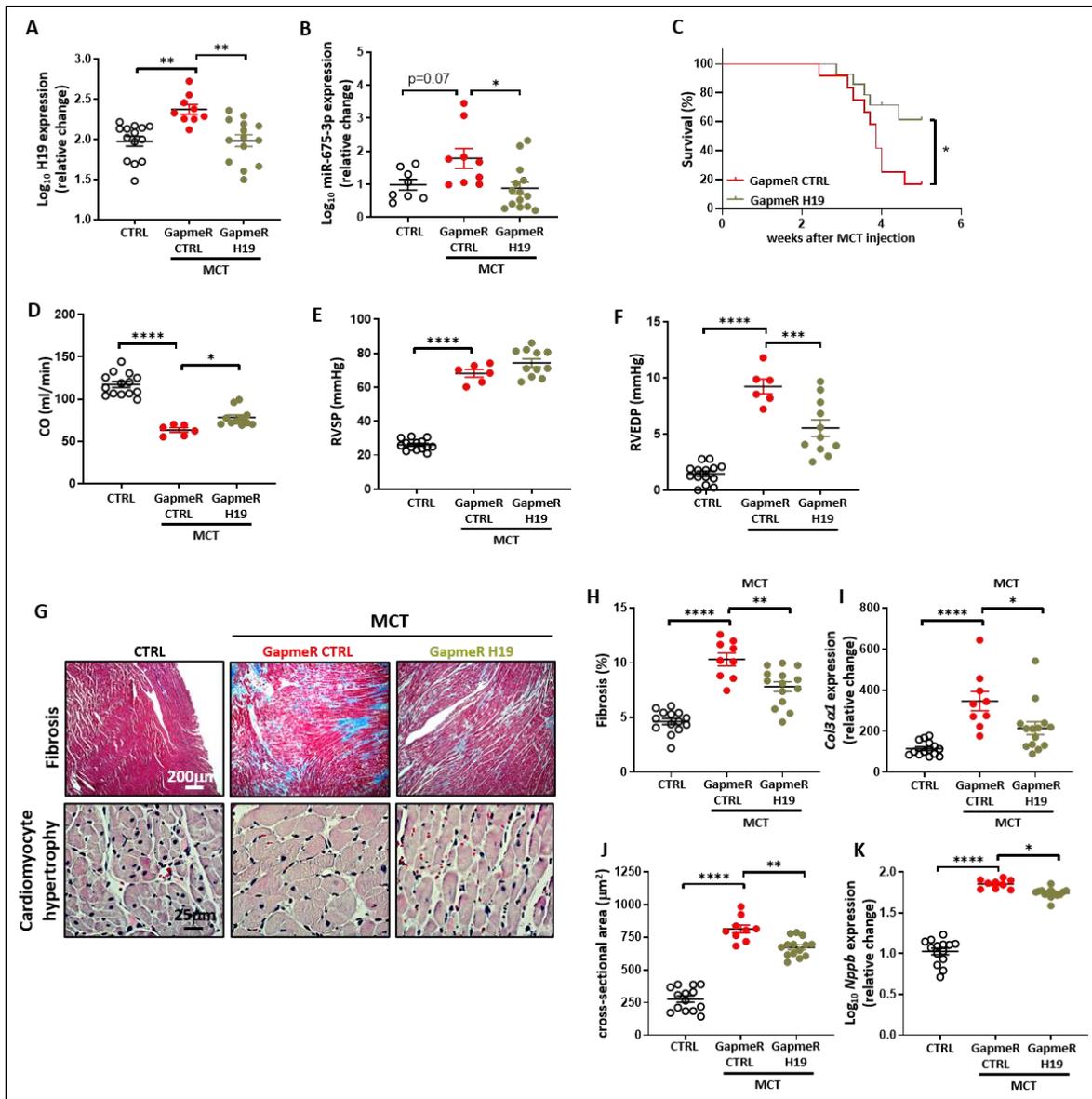


Figure 7. Le modèle MCT traité avec du GapmeR H19.

(A et B) Analyse quantitative par qRT-PCR d'H19 et miR-675 dans les RV de rats traités avec GapmeR CTRL ou GapmeR H19. (C) Courbe de Kaplan-Meier de rats MCT montrant un bénéfice de survie pour les rats traités avec le GapmeR H19 par rapport aux rats traités avec le GapmeR CTRL. (D à F) Le débit cardiaque (CO, D), la pression systolique (RVSP, E), et la pression dans le RV en fin de diastole (RVEDP, F) ont été mesurés par échocardiographie chez des rats traités avec le GapmeR control ou le GapmeR H19. (G) Quantification de la fibrose et de la section transversale des cardiomyocytes dans les RV de rats traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. (H et I) Quantification du pourcentage de fibrose (H) et analyse par qRT-PCR du collagène de type III  $\alpha 1$  (Col3a1, I) dans les RV de rats traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. (J et K) Quantification de la section transversale des cardiomyocytes (J) et analyse par qRT-PCR du peptide natriurétique de type B (Nppb, K) dans les RV de rats traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. Les

données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM. n = 6 à 14 rats / groupe. \* p <0,05, \*\* p <0,01, \*\*\* p <0,001 et \*\*\*\* p <0,0001.

Nous avons également retrouvé des résultats similaires dans le modèle de rats PAB après l'administration de GapmeR H19 (figure 8). Notamment une amélioration des paramètres hémodynamiques (figure 8. C-E) et structurels (figure 8. F-J) du ventricule droit des rats PAB traités avec du GapmeR H19.

L'inhibition d'H19 par le GapmeR affecte l'expression d'EZH2 dans le ventricule droit (figure 9). En effet, nous avons constaté que le niveau d'expression d'EZH2 est nettement augmenté chez les rats traités au GapmeR H19 dans les deux modèles, MCT et PAB (figure 9. A-B).

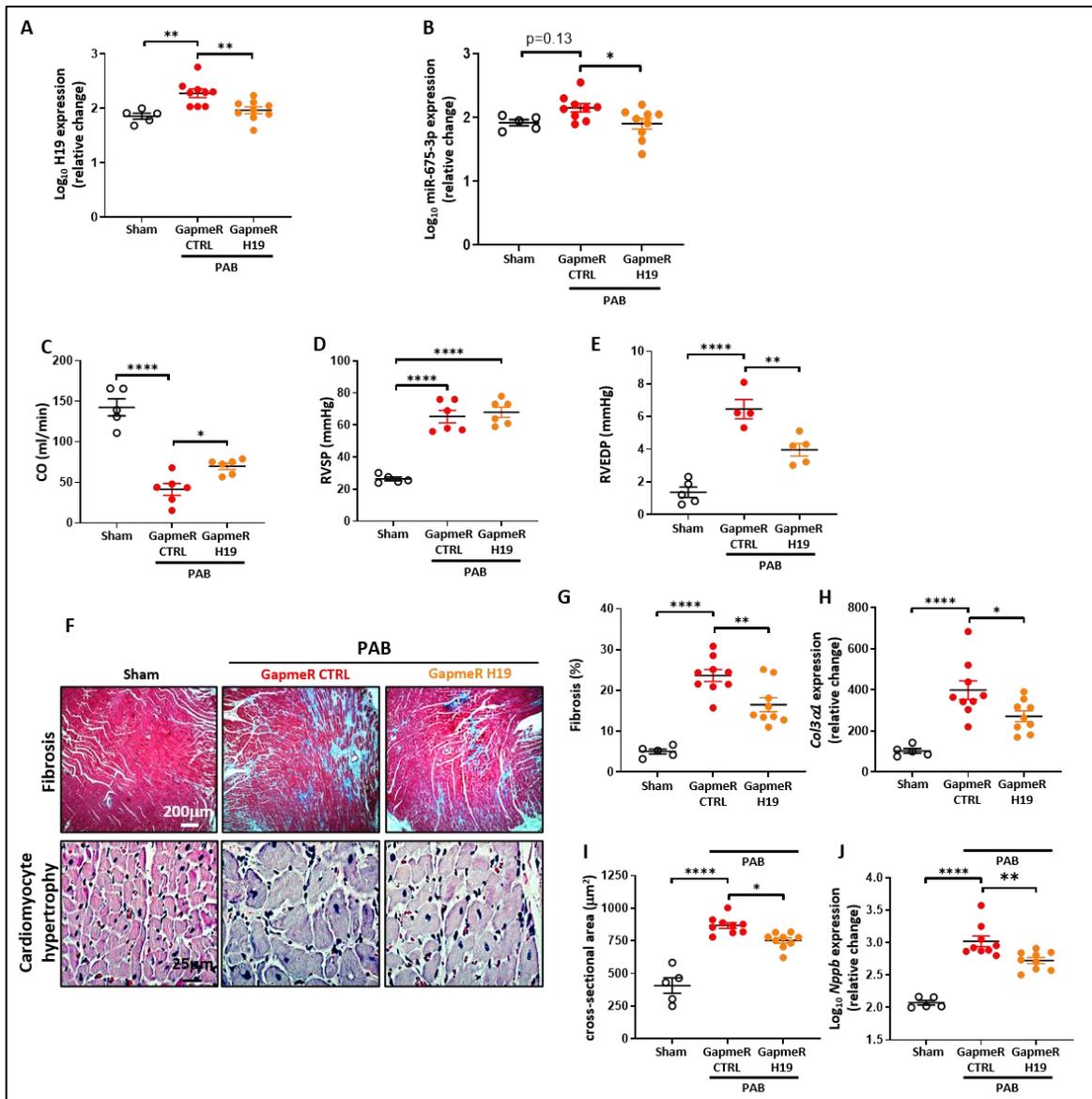


Figure 8. Le modèle PAB traité avec du GapmeR H19.

(A et B) Analyse quantitative par qRT-PCR d'H19 et miR-675 dans les RV de rats PAB traités avec GapmeR CTRL ou GapmeR H19. (C à E) Le débit cardiaque (CO, C), la pression systolique dans le ventricule droit (RVSP, D), et la pression dans le RV en fin de diastole (RVEDP, E) ont été mesurés par échocardiographie chez des rats PAB traités avec le GapmeR control ou le GapmeR H19. (F) Quantification de la fibrose et de la section transversale des cardiomyocytes dans les RV traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. (G et H) Quantification du pourcentage de fibrose (G) et analyse par qRT-PCR du collagène de type III  $\alpha 1$  (Col3 $\alpha 1$ , H) dans les RV de rats CTRL et PAB traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. (I et J) Quantification de la section transversale des cardiomyocytes (I) et analyse par qRT-PCR du peptide natriurétique de type B (Nppb, J) dans les RV de rats traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM. n = 6 à 14 rats / groupe. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\* p < 0,001 et \*\*\*\* p < 0,0001.

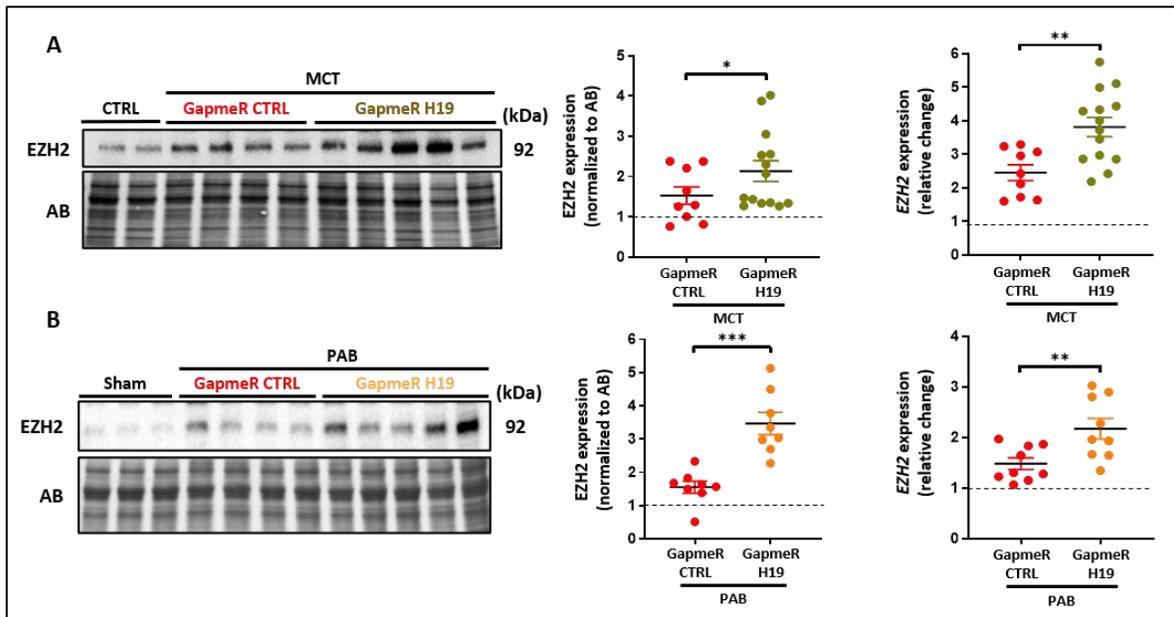


Figure 9. L'inhibition d'H19 induit la surexpression d'EZH2 dans les ventricules droits.

(A et B) Expression d'EZH2 (western blot) dans les ventricules droits de rats MCT (A) et PAB (B) traités avec le GapmeR CTRL ou le GapmeR H19. AB : Amidoblack.

### ***In vitro*, l'inhibition H19 empêche l'hypertrophie PE dépendante *via* la surexpression d'EZH2**

Pour consolider nos résultats, des cardiomyocytes néonataux isolés de ventricules droits de rats nouveau-nés (RV-NRCM) et des cellules cardiaques H9c2 ont d'abord été stimulés avec de la phényléphrine (PE, 50  $\mu$ M pendant 24 heures) avec ou sans ARN interférent contre H19 (siH19) (figure 10. A-B). L'hypertrophie des cardiomyocytes a été évaluée en mesurant la surface cellulaire ainsi que les niveaux d'ARNm de *Nppb*, un marqueur largement utilisé pour démontrer une hypertrophie<sup>19</sup>. Comme le montre la figure ci-dessous, la PE a augmenté la surface cellulaire (figure 10. A et C) et est accompagné d'une élévation concomitante de l'expression de *Nppa* et *Nppb* ainsi que du ratio *Myh7/Myh6* (figure 10. D-E). Cet effet a été complètement aboli par l'inhibition d'H19 après traitement avec le siH19. Des résultats similaires ont été observés dans les NV-NRCM.

En revanche, la surexpression d'H19 à l'aide d'un vecteur adénoviral induit l'hypertrophie, évaluée par la surface cellulaire et les mesures de *Nppb* (figure 10. G).

Afin de déterminer si ces effets exercés par H19 sont médiés, au moins en partie, par le miARN miR-675, les cellules ont été transfectées avec soit miR-675 mimic ou son contrôle correspondant (figure 10. H). Comme observé lors de la surexpression d'H19, la surexpression de miR-675 induit une hypertrophie cellulaire (figure 10. I-J).

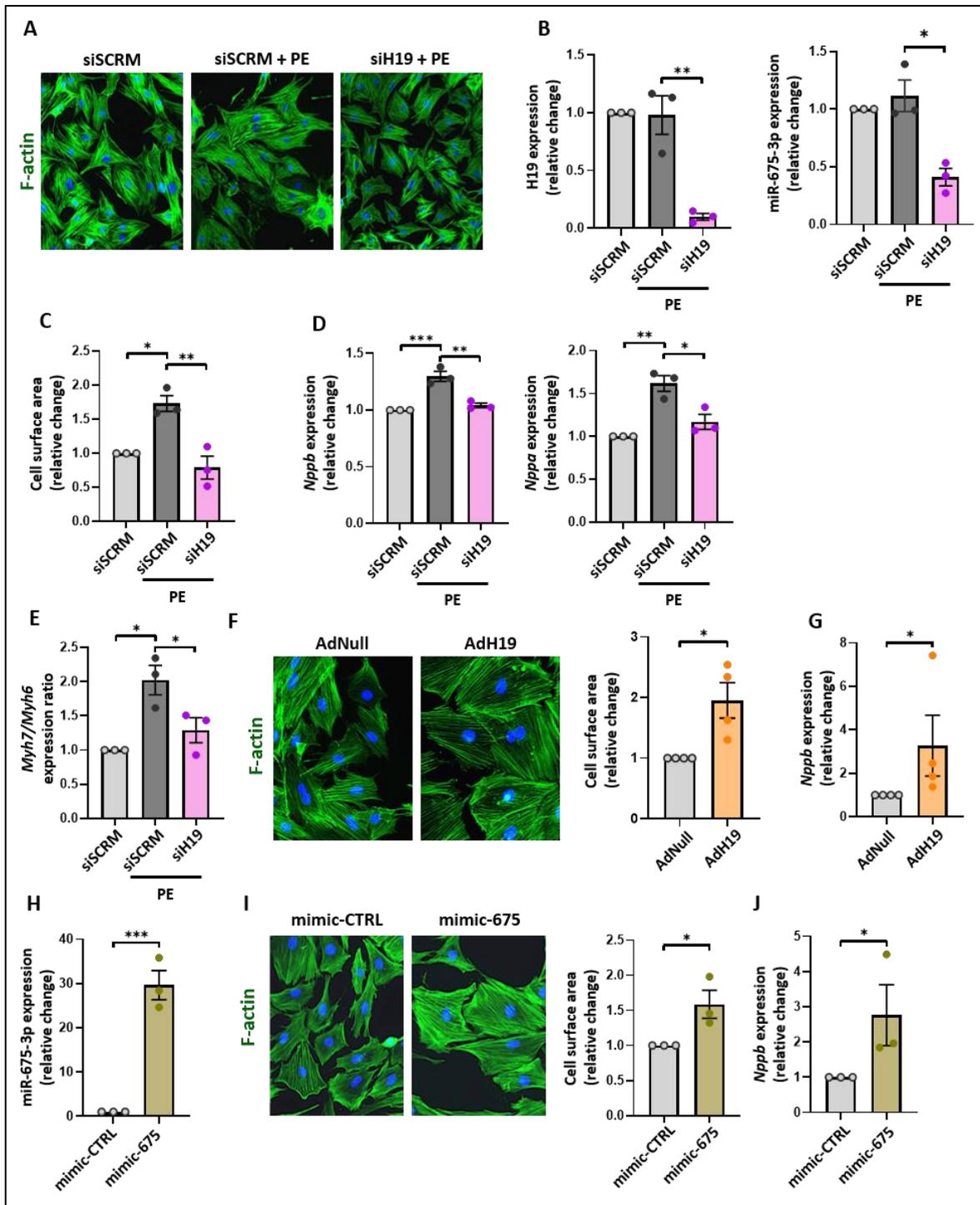


Figure 10. Effet de l'inhibition et de la surexpression d'H19 *in vitro*.

(A) Marquage de l'actine F à la phalloïdine sur des H9c2 traités avec du siSCRM +/- PE, ainsi qu'avec du siH19 + PE. (B) Analyse par qRT-PCR de l'expression d'H19 et miR-675 dans les cellules traitées avec le siSCRM et le siH19 +/- PE, (siH19, 50 nmol / L) pendant 24 heures suivie d'une stimulation de PE (50  $\mu$ mol / L) pendant 24 heures. (C) Quantification de la surface cellulaire dans les cellules traitées avec le siSCRM et le siH19 +/-

PE. (D et E) analyse par qRT-PCR du peptide natriurétique de type B (Nppb) et de type A (Nppa) et du ratio Myh7/Myh6 dans les cellules traitées avec le siSCRM et le siH19 +/- PE. (F) Images représentatives et quantification de la surface cellulaire après surexpression d'H19. (G) Analyse par qRT-PCR de Nppb dans les cellules traitées avec l'adénovirus H19. (H) Analyse par qRT-PCR de l'expression de miR-675 dans les cellules traitées avec un mimic control et un mimic miR-675. (I) Images représentatives et quantification de la surface cellulaire après surexpression de miR-675. (J) Analyse par qRT-PCR de Nppb dans les cellules traitées avec un mimic control et un mimic miR-675. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM. n = 3 / groupe. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\*\* p < 0,0001.

Basé sur nos données humaines et *in vivo* soutenant EZH2 comme un potentiel effecteur négatif en aval d'H19, l'expression d'EZH2 a été mesurée dans les cellules exposées à la PE et soumis à une inhibition d'H19 (figure 11. A). Nous avons constaté que l'inhibition d'H19 favorise la surexpression d'EZH2 dans les RV-NRCM ainsi que les H9c2; tandis qu'une surexpression de miR-675 diminue l'expression d'EZH2 (figure 11. B).

Nous avons ensuite évalué les effets de la surexpression d'EZH2, en utilisant un vecteur adénoviral, et nous avons observé que cette surexpression empêche l'hypertrophie induite par la PE (figure 11. C-E).

En revanche, l'inhibition d'EZH2 en utilisant un siRNA, induit hypertrophie des myocytes dans des conditions basales. Dans le même sens, nous avons constaté que l'inhibition d'EZH2 abolit les effets anti-hypertrophiques de l'inhibition d'H19 dans les RV-NRCM et les H9c2 stimulés par de la PE (Figure supplémentaire 15 en Annexe I).

Puisque EZH2 n'est pas une cible prévue de miR-675, nous avons ensuite étudié comment miR-675 peut indirectement réguler EZH2.

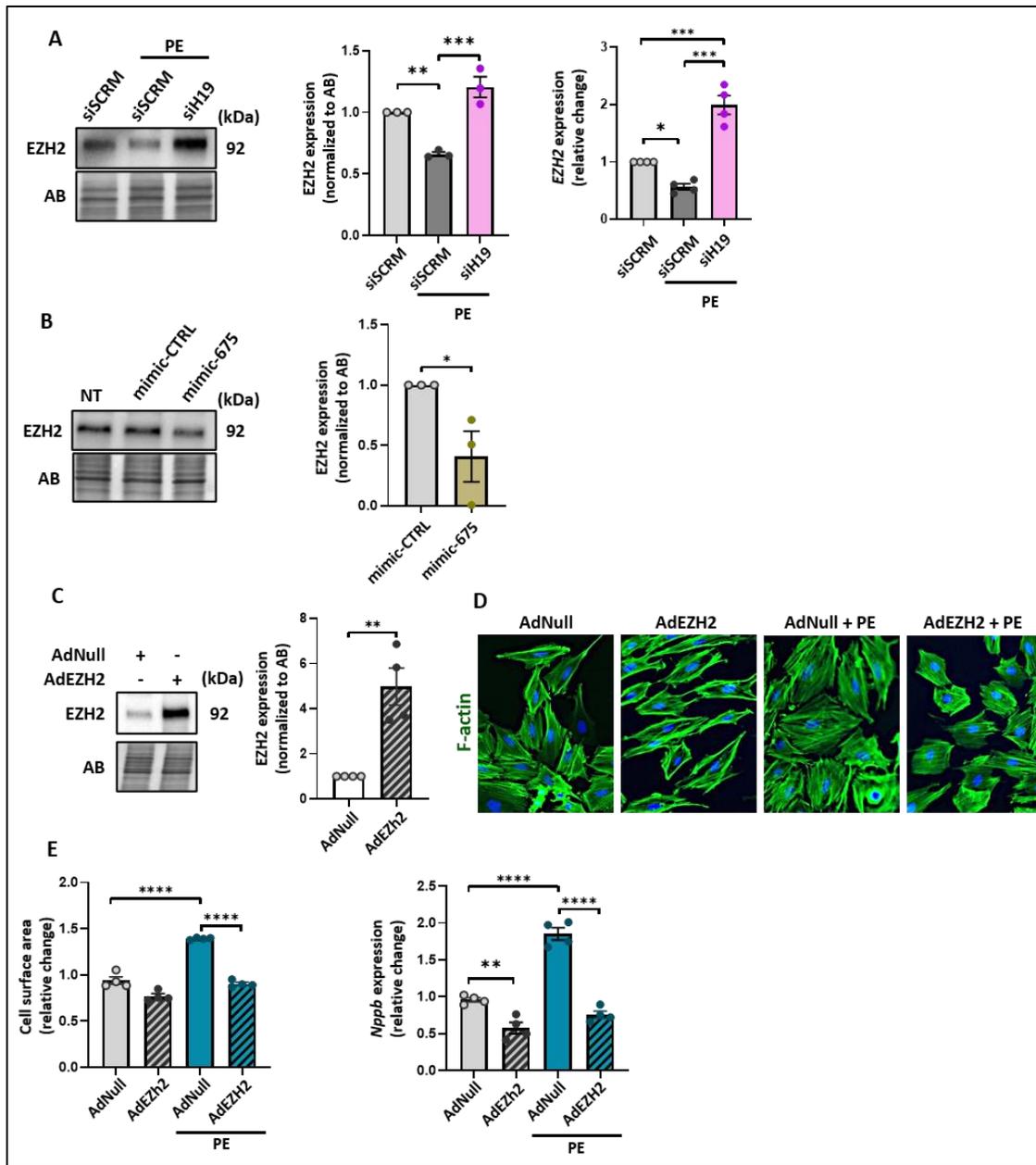


Figure 11. H19 régule l'expression d'EZH2 dans les cellules en culture.

(A) Expression d'EZH2 (western blot) dans les cellules traitées avec le siSCRMs et le siH19 +/- PE. (B) Expression d'EZH2 dans les cellules traitées avec le mimic control et le mimic miR-675. (C) Expression d'EZH2 dans les cellules traitées avec un adNull (adénovirus nul) et un adénovirus EZH2 (surexpression d'EZH2). (D) Images représentatives de la surface cellulaire des cellules traitées avec un adNull ou un adEZH2 +/- PE. (E) Quantification de la surface cellulaires des cellules traitées avec l'adNull et l'adEZH2 +/- PE ainsi que l'analyse qRT-PCR de Nppb dans les cellules traitées avec AdNull ou AdEZH2 (100 MOI) pendant 48 heures suivi d'une stimulation de PE (50  $\mu\text{mol} / \text{L}$ ) pendant 24 heures. L'expression des protéines a été normalisée en AB. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM.  $n = 3 / \text{groupe}$ . \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

### **H19 via miR675 régule EZH2 par l'intermédiaire d'E2F1**

En fusionnant les données des facteurs de transcription générées par le projet ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) et la littérature disponible montrant que E2F1 est une cible directe de miR-675<sup>20</sup> et un transactivateur clé de EZH2<sup>21</sup>, nous avons émis l'hypothèse que la régulation d'E2F1 médiée par H19 / miR-675 module l'expression d'EZH2.

Pour tester notre hypothèse, nous avons d'abord mesuré l'expression d'E2F1 dans les RV-NRCM exposés à la PE et traités ou non avec le siH19 (figure 12. A). Comme attendu, E2F1 est surexprimé après l'inhibition d'H19. De plus, E2F1 et EZH2 ont montré qu'ils partageaient le même profil d'expression dans les ventricules droits HTAP (figure 12. B). En effet nous retrouvons une surexpression d'E2F1 dans la phase de compensation ventriculaire et son expression chute en décompensation. Nous avons également retrouvé une surexpression d'E2F1 dans les ventricules droits des modèles MCT et PAB traités par du GapmeR H19 (figure 12. C-D).

Enfin, l'inhibition à la fois moléculaire et pharmacologique d'E2F1 induit une diminution le niveau d'expression d'EZH2 dans les myocytes cardiaques (figure 12. E-F).

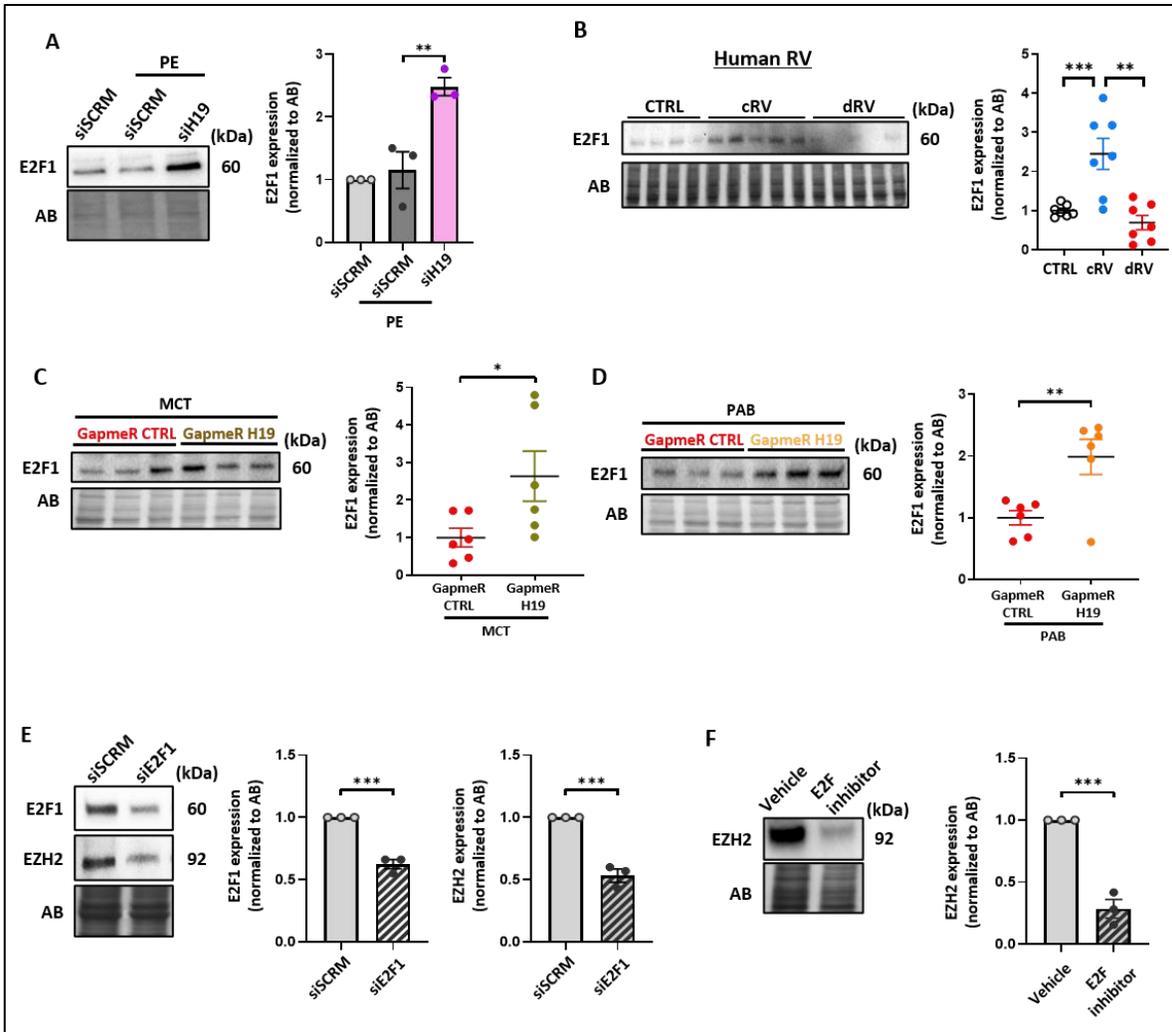


Figure 12. H19 régule l'expression d'EZH2 par l'intermédiaire d'E2F1.

(A) Expression d'E2F1 dans des cellules traitées avec le siSCRMs ou le siH19 (50 nmol / L) pendant 24 heures suivi d'une stimulation de PE (50  $\mu$ mol / L) pendant 24 heures. (B) Expression d'E2F1 dans les ventricules droits humains CTRL, compensés (cRV) et décompensés (dRV). (C et D) Quantification de l'expression d'E2F1 dans les ventricules droits des modèles MCT (C) et PAB (D). (E) Quantification de l'expression d'E2F1 et EZH2 dans des cellules traitées avec un siSCRMs ou un siE2F1. (F) Quantification de l'expression d'EZH2 dans des cellules traitées avec un inhibiteur d'E2F1. L'expression des protéines était normalisée à l'AB. Les données sont présentées sous forme de moyenne  $\pm$  ESM. n = 3 / groupe. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 et \*\*\* p < 0,001.

### **H19 favorise l'activation des fibroblastes cardiaques**

Avec les cardiomyocytes, les fibroblastes cardiaques (FC) sont reconnus comme des protagonistes clés de la défaillance cardiaque droite. Afin d'obtenir une image plus complète du rôle d'H19 dans cette défaillance cardiaque droite, des approches de gain et de perte de fonction ont été réalisées dans des fibroblastes isolés de patients avec un VD normal (figure 13. A).

Nous avons constaté que l'inhibition d'H19 empêche la différenciation spontanée des FC en myofibroblastes *in vitro*, comme illustré par l'expression réduite de  $\alpha$ SMA, Col1 $\alpha$ 1 et Col3 $\alpha$ 1 (figure 13. B-C) tandis que la surexpression d'H19 ou de miR-675 augmente significativement l'expression de ces gènes pro-fibrotiques (figure 13. E-K).

Contrairement à ce qui a été observé dans les cardiomyocytes, ces effets n'étaient pas associés à des changements dans l'expression d'E2F1 ou d'EZH2 soulignant une régulation spécifique au type cellulaire.

Collectivement, nos données soutiennent les études précédentes montrant que l'inhibition d'H19 / miR-675 antagonise la prolifération et l'activation des FC et indiquent que les effets cardioprotecteurs de la suppression d'H19 dans nos modèles animaux sont probablement le résultat de son action dans plusieurs types cellulaires.

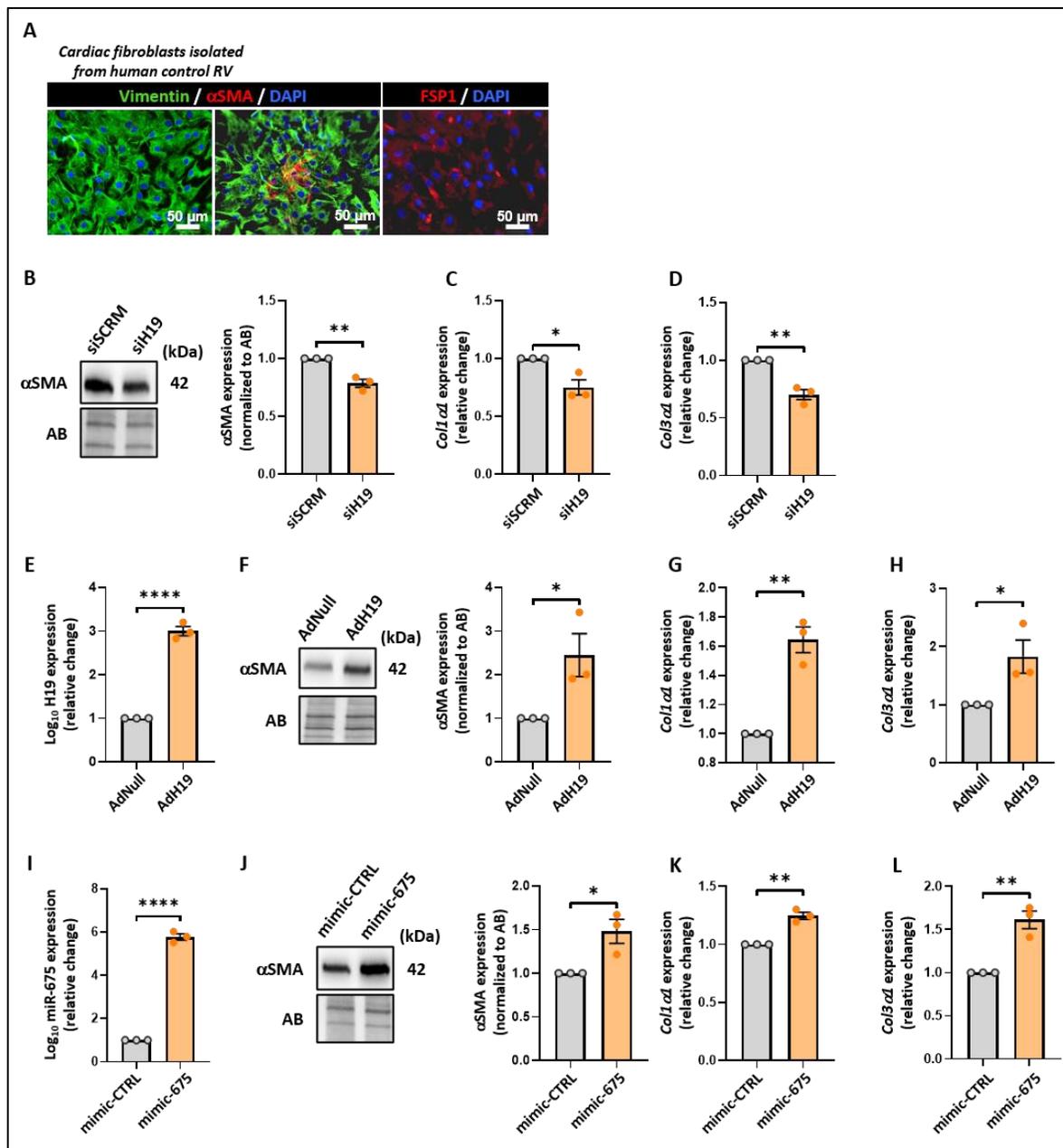


Figure 13. L'activation des fibroblastes cardiaque par H19.

(A) Images d'immunofluorescence représentatives de fibroblastes cardiaques isolés de RV humains marqués pour la vimentine,  $\alpha$ SMA et FSP1 afin de valider le phénotype fibroblastique. (B-D) Expression d' $\alpha$ SMA par western blot (B) ainsi que de collagène de type I  $\alpha 1$  (Col1 $\alpha 1$ , C) par qRT-PCR (C) et de collagène de type III  $\alpha 1$  (Col3 $\alpha 1$ , D) dans les fibroblastes traités avec siSCRM ou siH19 (50 nmol / L) pendant 24 heures. (E) Expression d'H19 par qRT-PCR dans les fibroblastes cardiaques infectés par un adénovirus codant pour H19 humain (AdH19, 100 MOI) ou un adénovirus de contrôle (AdNull) pendant 48 heures. (F-H) Expression d' $\alpha$ SMA (F) ainsi que de Col1 $\alpha 1$  (G) et Col3 $\alpha 1$  (H) dans les fibroblastes cardiaques traités avec un AdNull ou AdH19 (100 MOI) pour 48 heures. (I) Expression de miR-675 par qRT-PCR dans les fibroblastes cardiaques

traités avec un mimic contrôle (mimic-CTRL) ou mimic miR-675-3p (mimic-675, 5 nmol / L) pendant 24 heures. (J-L) Expression d' $\alpha$ SMA, par western blot (J) ainsi que de Col1 $\alpha$ 1 (K) et Col3 $\alpha$ 1 (L), par qRT\_PCR, dans des fibroblastes cardiaques traités avec un mimic-CTRL ou mimic-675 (5 nmol / L) pendant 24 heures. L'expression des protéines a été normalisée en AB. Les données sont présentées comme moyenne  $\pm$  ESM. n = 3 / groupe, \* p <0,05, \*\* p <0,01 et \*\*\*\* p <0,0001.

## Discussion et perspectives

Bien que l'HTAP soit une pathologie vasculaire pulmonaire avant tout, la survie des patients est étroitement liée à la fonction ventriculaire droite<sup>22-26</sup>. Malgré l'énorme attention accordée à la défaillance cardiaque gauche, la défaillance cardiaque droite reste peu étudiée au niveau préclinique et clinique et est maintenant considérée comme une priorité de recherche en HTAP<sup>27</sup>. Il est à noter que des différences critiques existent entre le ventricule gauche et le droit en termes d'origine embryologique, de métabolisme, de vascularisation et de réponse à la surcharge de pression<sup>28</sup>. Dans l'ensemble, le ventricule droit est moins apte à s'adapter à la surcharge de pression, mais a plus de « plasticité » dans sa capacité à adopter et changer de phénotype. L'adaptation du VD en HTAP est un processus complexe qui dépend non seulement de la gravité de l'HTAP, mais également de l'interaction entre la perfusion myocardique et le métabolisme, l'activation neuro-hormonale, la vitesse et le moment d'apparition de l'HTAP et, bien que mal définis, des facteurs génétiques et épigénétiques<sup>4</sup>. Ainsi, la défaillance cardiaque droite est vraisemblablement d'origine multifactorielle et les mécanismes moléculaires responsables de la transition du VD compensé au VD décompensé restent largement inconnus.

Au cours de la dernière décennie et grâce à la technologie de séquençage de l'ARN, le nombre d'ARNInc liés à l'insuffisance cardiaque a rapidement augmenté<sup>10,11,29-31</sup>. Malgré des preuves croissantes, les fonctions de la plupart de ces ARNInc sont encore inconnues en raison, au moins en partie, de leur conservation de séquence généralement faible entre les espèces limitant l'application des découvertes *in vitro* à des modèles animaux. En effet, seuls quelques ARNInc,<sup>10,11,29-31</sup> dont H19<sup>13-15</sup> ont été expérimentalement validés comme puissants régulateurs et cibles thérapeutiques dans l'insuffisance cardiaque, avec un accent presque exclusivement sur le remodelage du ventricule gauche; les connaissances acquises ne peuvent pas être systématiquement extrapolées à son homologue du côté droit. Dans la

présente étude, nous avons constaté que H19 est surexprimé spécifiquement dans le ventricule droit des patients HTAP<sup>32</sup>. Afin de mieux comprendre son rôle dans la progression de la défaillance cardiaque droite nous avons d'abord catégorisé pour la première fois la fonction ventriculaire droite en fonction des symptômes cliniques et de l'hémodynamique au stade terminal (CO et RVEDP) dans deux modèles de rats couramment utilisés pour imiter l'insuffisance cardiaque droite (PAB et MCT). Cette catégorisation reproduisait l'évolution clinique des patients atteints d'HTAP, car la réduction du CO et l'élévation de la RVEDP sont associées à une aggravation des symptômes cliniques et à une altération de la qualité de vie en plus du pronostic chez les patients HTAP. Le CO et la RVEDP sont régulés par une interaction complexe de la contractilité, de la précharge et de la postcharge. Cette catégorisation était en outre étayée par des paramètres indirects et non invasifs de la fonction ventriculaire droite mesurés par échocardiographie. Par conséquent, notre catégorisation pourrait décrire les voies pathologiques du VD décompensé dans des modèles animaux qui se comportent de façon similaire au VD des patients HTAP. En utilisant cette catégorisation, nous avons démontré que la surexpression d'H19 est observée spécifiquement dans le ventricule droit des patients ainsi que dans nos deux modèles animaux. Plus important encore, nous avons fourni des preuves que la suppression d'H19 *in vivo* améliore les caractéristiques du remodelage cardiaque (hypertrophie, fibrose et raréfaction capillaire), améliorant ainsi la fonction ventriculaire droite et la survie indépendamment de l'hémodynamique pulmonaire. Parmi les facteurs dont l'expression a changé après l'inhibition d'H19, l'histone méthyltransférase EZH2 s'est retrouvé surexprimée dans les deux modèles expérimentaux. À l'appui, l'inactivation ciblée d'EZH2 dans les myocytes cardiaques a été associée au développement de l'hypertrophie cardiaque et de la fibrose<sup>823</sup>. Nos données démontrent que l'inhibition d'H19 dans les NRCM et les H9C2 exposés à la PE empêche l'hypertrophie et entraîne une surexpression d'EZH2 médiée par E2F1. Le fait qu'EZH2 soit nettement diminué dans les VDD des modèles humains et animaux soutient l'hypothèse qu'H19 régule l'expression de celui-ci de façon négative.

De plus, nos résultats *in vitro* montrant que la surexpression d'EZH2 empêche l'hypertrophie induite par la PE suggère que cette surexpression dans les modèles traités avec le GapmeR H19 serait favorable à l'amélioration de l'hypertrophie observée dans nos coupes transversales.

La capacité d'adaptation du ventricule droit dépend probablement de l'interaction complexe entre l'hypertrophie, la contractilité des cardiomyocytes, la fibrose, la densité capillaire et l'apport en nutriments, le métabolisme et la réponse appropriée du réseau extracellulaire; cette capacité ne peut être pleinement expliquée par un seul type de réponse cellulaire. En ce sens, nous avons également démontré que l'effet thérapeutique de la suppression d'H19 dans des modèles animaux n'est probablement pas limité à son impact sur les CM, car son inhibition *in vitro* dans les FC isolés de VD humains empêche leur activation tandis que sa surexpression induit des effets opposés.

Ces résultats sont cohérents avec les données montrant que 1) H19 stimule la prolifération et la différenciation des CF en myofibroblastes des cellules *in vitro* et 2) l'expression d'H19 exacerbe la dilatation cardiaque et la fibrose dans les cœurs de souris après un infarctus du myocarde. En plus de réguler négativement l'expression d'E2F1 et EZH2 dans les cardiomyocytes, il est probable qu'H19 impacte l'expression de multiples gènes associés à la défaillance cardiaque droite, ce qui pourrait ainsi expliquer les effets indépendants d'E2F1 / EZH2 sur la fibrose observée dans les fibroblastes cardiaques. Par exemple, il a également été rapporté que l'axe H19 / miR-675 favorisait l'apoptose des cardiomyocytes dans la cardiomyopathie dilatée en ciblant VDAC1<sup>32</sup>. En outre, H19 peut inhiber la liaison de la protéine à YB1 entraînant une dérégulation de Coll $\alpha$ 1 tout comme de multiples micro-ARNs, tels que miR-29b46<sup>33</sup> et miR-45547<sup>34</sup> connus pour exercer des effets pro-survie et anti-fibrotiques dans le cœur et sont tous deux décrits en HTAP. Le mécanisme par lequel H19 régule la fibrose cardiaque dans les ventricules droits humains reste à établir et fera l'objet d'études futures.

Enfin, dans notre étude, nous avons démontré également qu'il est possible de mesurer le niveau d'expression d'H19 dans le plasma de patients (article complet en annexe I).

## Références :

1. Lau EMT, Giannoulitou E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2017; 14:603-614.
2. Humbert M, Sitbon O, Yaici A, Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, Parent F, Savale L, Natali D, Gunther S, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2010; 36:549-555.
3. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010; 122:156-163.
4. Vonk Noordegraaf A, Chin KM, Haddad F, Hassoun PM, Hemnes AR, Hopkins SR, Kawut SM, Langleben D, Lumens J, Naeije R. Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *Eur Respir J*. 2019;53. DOI: 10.1183/13993003.01900-2018
5. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008; 117:1717-1731.
6. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62: D22-33.
7. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2011; 43:904-914.
8. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*. 2007; 13:313-316.
9. Greco CM, Condorelli G. Epigenetic modifications and noncoding RNAs in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Rev Cardiol*. 2015; 12:488-497.
10. Micheletti R, Plaisance I, Abraham BJ, Sarre A, Ting CC, Alexanian M, Maric D, Maison D, Nemir M, Young RA, et al. The long noncoding RNA Wisper controls cardiac fibrosis and remodeling. *Sci Transl Med*. 2017;9. eaa9118. DOI: 10.1126/scitranslmed. aai9118
11. Wang Z, Zhang XJ, Ji YX, Zhang P, Deng KQ, Gong J, Ren S, Wang X, Chen I, Wang H, et al. The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2016; 22:1131-1139.
12. Martinet C, Monnier P, Louault Y, Benard M, Gabory A, Dandolo L. H19 controls reactivation of the imprinted gene network during muscle regeneration. *Development*. 2016; 143:962-971.
13. Lee JH, Gao C, Peng G, Greer C, Ren S, Wang Y, Xiao X. Analysis of transcriptome complexity through RNA sequencing in normal and failing murine hearts. *Circ Res*. 2011; 109:1332-1341.

14. Greco S, Zaccagnini G, Perfetti A, Fuschi P, Valaperta R, Voellenkle C, Castelvechio S, Gaetano C, Finato N, Beltrami AP, et al. Long noncoding RNA dysregulation in ischemic heart failure. *J Transl Med*. 2016; 14:183.
15. Liu L, An X, Li Z, Song Y, Li L, Zuo S, Liu N, Yang G, Wang H, Cheng X, et al. The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2016; 111:56-65.
16. Zhang Y, Zhang M, Xu W, Chen J, Zhou X. The long non-coding RNA H19 promotes cardiomyocyte apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Oncotarget*. 2017; 8:28588-28594.
17. Tao H, Cao W, Yang JJ, Shi KH, Zhou X, Liu LP, Li J. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis. *Cardiovasc Pathol*. 2016; 25:381-389.
18. Choong OK, Chen CY, Zhang J, Lin JH, Lin PJ, Ruan SC, Kamp TJ, Hsieh PCH. Hypoxia-induced H19/YB-1 cascade modulates cardiac remodeling after infarction. *Theranostics*. 2019; 9:6550-6567.
19. Kerkela R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc*. 2015;4: e002423.
20. Ma L, Tian X, Guo H, Zhang Z, Du C, Wang F, Xie X, Gao H, Zhuang Y, Kornmann M, et al. Long noncoding RNA H19 derived miR-675 regulates cell proliferation by downregulating E2F-1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Cancer*. 2018; 9:389-399.
21. Lee SR, Roh YG, Kim SK, Lee JS, Seol SY, Lee HH, Kim WT, Kim WJ, Heo J, Cha HJ, et al. Activation of EZH2 and SUZ12 Regulated by E2F1 Predicts the Disease Progression and Aggressive Characteristics of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015; 21:5391-5403.
22. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national perspective registry. *Ann Intern Med*. 1991; 115:343-349.
23. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemnes AR, Borlaug BA, Chamera E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006; 174:1034-1041.
24. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010; 122:164-172.
25. Mauritz GJ, Kind T, Marcus JT, Bogaard HJ, van de Veerdonk M, Postmus PE, Boonstra A, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. Progressive changes in right ventricular geometric shortening and long-term survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012; 141:935-943.
26. Courand PY, Pina Jomir G, Khouatra C, Scheiber C, Turquier S, Glerant JC, Mastroianni B, Gentil B, Blanchet-Legens AS, Dib A, et al. Prognostic value of right ventricular ejection fraction in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2015; 45:139-149.

27. Lahm T, Douglas IS, Archer SL, Bogaard HJ, Chesler NC, Haddad F, Hemnes AR, Kawut SM, Kline JA, Kolb TM, et al. Assessment of Right Ventricular Function in the Research Setting: Knowledge Gaps and Pathways Forward. An Official American Thoracic Society Research Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198: e15-e43.
28. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005; 6:826-835.
41. Di Salvo TG, Guo Y, Su YR, Clark T, Brittain E, Absi T, Maltais S, Hemnes A. Right ventricular long noncoding RNA expression in human heart failure. *Pulm Circ*. 2015; 5:135-161.
29. Viereck J, Kumarswamy R, Foinquinos A, Xiao K, Avramopoulos P, Kunz M, Dittrich M, Maetzig T, Zimmer K, Remke J, et al. Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med*. 2016;8:326ra322.
30. Yu J, Yang Y, Xu Z, Lan C, Chen C, Li C, Chen Z, Yu C, Xia X, Liao Q, et al. Long Noncoding RNA Ahit Protects Against Cardiac Hypertrophy Through SUZ12 (Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog)-Mediated Downregulation of MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A). *Circ Heart Fail*. 2020;13: e006525.
31. Kylhammar D, Kjellstrom B, Hjalmarsson C, Jansson K, Nisell M, Soderberg S, Wikstrom G, Radegran G. A comprehensive risk stratification at early follow-up determines prognosis in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018; 39:4175-4181.
32. Li X, Wang H, Yao B, Xu W, Chen J, Zhou X. lncRNA H19/miR-675 axis regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting VDAC1 in diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2016; 6:36340.
33. Tang Y, He R, A J, Deng P, Huang L, Yang W. The effect of H19-miR-29b interaction on bleomycin-induced mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016; 479:417-423.
34. Huang ZW, Tian LH, Yang B, Guo RM. Long Noncoding RNA H19 Acts as a Competing Endogenous RNA to Mediate CTGF Expression by Sponging miR-455 in Cardiac Fibrosis. *DNA Cell Biol*. 2017;36:759-766.

*Note : Des données supplémentaires sont annexées en Annexe I ci-après.*

# Conclusion

## Compréhension de la physiopathologie

L'hypertension artérielle pulmonaire est une pathologie progressive affectant les artères pulmonaires des patients et se répercutant sur la fonction cardiaque droite menant ultimement au décès prématuré des patients. Malgré les traitements actuellement utilisés ciblant le tissu pulmonaire, les patients continuent de mourir des suites d'une défaillance cardiaque<sup>48</sup>.

Au niveau pulmonaire, notre étude sur l'implication du facteur épigénétique EZH2 dans l'hypertension artérielle pulmonaire nous permet de démontrer que celui-ci favorise la prolifération et la survie des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires. Notre approche à la fois transcriptomique et protéomique nous a permis de mettre en lumière plusieurs cibles potentielles d'EZH2 dans l'hypertension artérielle pulmonaire. En effet, comme nous l'avons présenté, nombreuses sont celles impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire expliquant par la même les effets d'EZH2 sur la prolifération cellulaire au niveau des artères pulmonaires.

De plus, rappelons que les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires HTAP présentent une modification de leur bioénergétique en faveur de la voie glycolytique, l'effet Warburg, afin de maintenir un niveau énergétique nécessaire à leur croissance<sup>707</sup>. Nos résultats nous ont permis de démontrer qu'une inhibition d'EZH2 affecte l'expression de protéines mitochondriales et altère la production énergétique au sein de la mitochondrie ce qui pourrait expliquer les effets antiprolifératif et pro-apoptotique observés.

Nous avons également observé qu'une inhibition de son activité enzymatique par les inhibiteurs pharmacologiques diminuait drastiquement la prolifération et la résistance à l'apoptose des CMLAPs-HTAP.

Comme nous l'avons mentionné en introduction, EZH2 peut agir sur l'expression de protéines de plusieurs façons, comme par la méthylation directe de certaines cibles. Comme nous l'avons mentionné, celui-ci peut méthyler des facteurs de transcription et inhiber leur fonction, comme pour le facteur GATA4 ou bien l'activer comme c'est le cas du facteur STAT3.

STAT3 étant un puissant régulateur impliqué dans l'hypertension artérielle pulmonaire ainsi que GATA4 dans le remodelage cardiaque, en nous basant sur la littérature, nous pouvons imaginer qu'EZH2 pourrait également affecter leur fonction en les méthylant. Une étude des cibles méthylées par EZH2 dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires de patients HTAP permettrait de comprendre toutes les facettes de sa fonction.

Ultimement, des études *in vivo* permettraient d'évaluer avec plus de précision la fonction d'EZH2 au niveau pulmonaire par l'administration d'inhibiteurs par nébulisation afin de cibler préférentiellement le tissu pulmonaire.

Lorsque l'on s'attarde sur la fonction d'EZH2 dans le ventricule droit en HTAP, nous avons pu mettre en évidence un rôle protecteur de celui-ci face à l'hypertrophie pathologique. Cela fait écho aux résultats précédemment publiés démontrant un rôle anti-hypertrophique d'EZH2 dans le tissu cardiaque<sup>817</sup>. Nous avons mis en évidence la régulation d'EZH2 par l'ARN long non codant H19, qui en phase de décompensation voit sa concentration augmentée expliquant la régulation négative de l'expression d'EZH2 en aval. La diminution de l'expression d'EZH2 durant la phase de décompensation favoriserait l'hypertrophie pathologie qui précipiterait la défaillance cardiaque droite. En ce sens, maintenir le niveau d'expression d'EZH2 durant la progression de la pathologie serait bénéfique pour la survie des patients HTAP présentant un remodelage ventriculaire. Nous avons démontré dans deux modèles expérimentaux que l'inhibition d'H19 et de ce fait, l'augmentation d'EZH2 améliore le pronostic vital. En effet, les rats traités avec le GapmeR H19 démontrent un taux de survie plus élevé que ceux ayant reçu un GapmeR contrôle. Également, nous avons démontré une amélioration des paramètres hémodynamiques ainsi qu'histologiques démontrant un effet très bénéfique à l'inhibition d'H19 et donc la surexpression d'EZH2 dans le ventricule droit en HTAP.

De plus, de façon importante, nous avons pu démontrer que l'expression de cet ARNlnc pouvait être corrélée à l'avancement du remodelage cardiaque chez les patients HTAP. Cette donnée permettrait de mieux anticiper la défaillance ventriculaire et le décès des patients. La mesure plasmatique du niveau d'H19 pourrait être réalisée par une analyse non invasive chez les patients ce qui pourrait contribuer à anticiper la prise en charge de ces patients. Nos

données mettent en évidence qu'H19 peut être utilisé en tant que biomarqueur facilement mesurable afin de juger de la sévérité du remodelage ventriculaire des patients et ainsi éclairer le pronostic.

Nos deux volets d'étude ont démontré une certaine dualité dans la fonction d'EZH2, celui-ci semble être délétère pour le tissu pulmonaire et notamment au niveau CMLAPs. Une inhibition de celui-ci dans les CMLAPs diminue drastiquement la prolifération et la survie de ces cellules et semble donc bénéfique.

En revanche, au niveau du ventricule droit, celui-ci est surexprimé et semble protéger le tissu d'une hypertrophie pathologique et est également associé à une meilleure survie des modèles animaux. Nous avons également démontré que son inhibition favorise l'hypertrophie cellulaire *in vitro*.

Cette dualité est importante à prendre en compte lors que l'on souhaite élaborer une stratégie thérapeutique afin de ne pas cibler EZH2 dans le tissu cardiaque.

### **Avenue thérapeutique potentielle**

L'hypertension artérielle pulmonaire étant une pathologie qui affecte le tissu pulmonaire en premier lieu, une stratégie thérapeutique visant à diminuer le remodelage vasculaire serait à privilégier. Lorsque l'on s'attarde sur le potentiel thérapeutique d'une inhibition d'EZH2, il faut prendre en compte la dualité observée dans les CMLAPs-HTAP et dans le ventricule droit. En effet, une inhibition d'EZH2 par voie systémique serait délétère sur la fonction cardiaque droite puisque celle-ci favoriserait l'apparition d'une hypertrophie pathologique pouvant mener au décès du patient.

C'est la raison pour laquelle il faudrait cibler de façon spécifique le tissu pulmonaire par une administration par inhalation. En effet, les résultats obtenus *in vitro* semblent être très prometteurs néanmoins nos outils ne nous ont pas permis de tester notre hypothèse sur un modèle expérimental. Cependant, l'administration par nébulisation d'un siRNA spécifique d'EZH2 pourrait permettre de cibler le tissu pulmonaire préférentiellement.

Ces dernières années de nombreuses études s'intéressent à l'administration sécuritaire de petits ARNs interférents (siRNA) afin de cibler préférentiellement le tissu pulmonaire<sup>824-828</sup>. Il serait possible de formuler des traitements ciblant spécifiquement l'expression d'EZH2 dans le tissu pulmonaire avec un siEZH2 administré par inhalation. Cependant, des études complémentaires restent nécessaire afin de pouvoir déterminer avec exactitude les effets d'une inhibition d'EZH2 dans le tissu pulmonaire *in vivo*.

L'exploration de possibles régulateurs d'EZH2 dans les CMLAPs HTAP pourrait permettre de contourner la dualité fonctionnelle de celui-ci. En effet, cibler le régulateur d'EZH2 dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires malades permettrait de diminuer l'expression de celui-ci sans risquer d'affecter son expression dans le ventricule et ce fait rendre la thérapie plus facile.

Bien que le tissu pulmonaire soit le siège initial de la pathologie, les patients décèdent d'une défaillance cardiaque droite. Notre étude a démontré qu'une inhibition d'H19 semble prometteuse à la vue des résultats obtenus dans nos modèles expérimentaux. En effet, l'administration d'un GapmeR H19 a permis d'améliorer la survie des rats ainsi que leur paramètres hémodynamiques et histologiques via une surexpression d'EZH2.

La concordance entre les données obtenues chez les patients et également dans les modèles expérimentaux nous ont permis de démontrer un effet bénéfique de l'inhibition d'H19 et cela sans affecter les artères pulmonaires. De plus, la mesure plasmatique de l'expression d'H19 permettrait de cibler les patients pour lesquels l'administration d'un siRNA serait bénéfique. Il est à noter qu'à l'heure actuelle, les thérapies permettent uniquement de soulager les symptômes mais ne freinent pas la progression de la pathologie, ni ne préviennent la défaillance cardiaque. Les résultats obtenus permettent d'ouvrir une opportunité de développer des thérapies pouvant prévenir la défaillance cardiaque, et en ce sens le décès des patients.

Finalement, les travaux réalisés au cours de mon doctorat nous ont permis de mettre en évidence deux nouveaux acteurs importants dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle pulmonaire : le facteur épigénétique EZH2 ainsi que l'ARN long non codant H19.

Les données obtenues améliorent la compréhension des mécanismes responsables de la défaillance cardiaque droite.

## Références :

1. Haddad, M. & Sharma, S. *Physiology, Lung. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
2. Chaudhry, R. & Bordoni, B. *Anatomy, Thorax, Lungs. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
3. Haddad, M. & Sharma, S. *Physiology, Lung. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
4. Patwa, A. & Shah, A. Anatomy and physiology of respiratory system relevant to anaesthesia. *Indian Journal of Anaesthesia* vol. 59 533–541 (2015).
5. Knudsen, L. & Ochs, M. The micromechanics of lung alveoli: structure and function of surfactant and tissue components. *Histochemistry and Cell Biology* vol. 150 661–676 (2018).
6. Prange, H. D. Laplace's law and the alveolus: A misconception of anatomy and a misapplication of physics. *American Journal of Physiology - Advances in Physiology Education* vol. 27 34–40 (2003).
7. Boyette, L. C. & Bhimji, S. S. *Physiology, Pulmonary Circulation. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
8. Akmal, M., Zulkifle, M. & Ansari, A. Ibn nafis - a forgotten genius in the discovery of pulmonary blood circulation. *Heart Views* **11**, 26–30 (2010).
9. West, J. B. Ibn al-Nafis, the pulmonary circulation, and the Islamic Golden Age. *Journal of Applied Physiology* vol. 105 1877–1880 (2008).
10. Brinkman, J. E. & Sharma, S. *Physiology, Respiratory Drive. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
11. Braun, S. R. *Respiratory Rate and Pattern. Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations* (Butterworths, 1990).
12. Biscoe, T. J., Purves, M. J. & Sampson, S. R. The frequency of nerve impulses in single carotid body chemoreceptor afferent fibres recorded in vivo with intact circulation. *J. Physiol.* **208**, 121–131 (1970).
13. Powers, K. A. & Dhamoon, A. S. *Physiology, Pulmonary, Ventilation and Perfusion. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
14. Petersson, J. & Glenny, R. W. Gas exchange and ventilation-perfusion relationships in the lung. *European Respiratory Journal* vol. 44 1023–1041 (2014).
15. Rehman, I. & Rehman, A. *Anatomy, Thorax, Heart. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
16. Akhter, S. A. The Heart and Pericardium. *Thoracic Surgery Clinics* vol. 21 205–217 (2011).
17. Laleg-Kirati, T.-M., Crepeau, E. & Sorine, M. Identification d'un compartiment vasculaire et des caractéristiques de la pression et du débit aortiques. (2005).
18. Saxton, A. & Bordoni, B. *Anatomy, Thorax, Cardiac Muscle. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
19. Tran, D. B. & Mahabadi, N. *Anatomy, Thorax, Heart Muscles. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).

20. Arackal, A. & Alsayouri, K. *Histology, Heart. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
21. Fornasier-Santos, C. Entraînement, Préparation physique & Physiologie cardiovasculaire appliqués au rugby à XV. (2018). doi:10.13140/RG.2.2.17357.18400.
22. 2006-.Cologne, G. I. for Q. and E. in H. C. (IQWiG); How does the blood circulatory system work? (2019).
23. Fukuta, H. & Little, W. C. The Cardiac Cycle and the Physiologic Basis of Left Ventricular Contraction, Ejection, Relaxation, and Filling. *Heart Failure Clinics* vol. 4 1–11 (2008).
24. Pollock, J. D. & Makaryus, A. N. *Physiology, Cardiac Cycle. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
25. Bruss, Z. S. & Raja, A. *Physiology, Stroke Volume. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
26. King, J. & Lowery, D. R. *Physiology, Cardiac Output. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2019).
27. Vincent, J. L. Understanding cardiac output. *Crit. Care* **12**, 174 (2008).
28. Carabasi, R. A. & Svirgals, P. The vascular system. *Clin. Atlas Off. Proced.* **4**, 259–277 (2001).
29. Taylor, A. M. & Bordoni, B. *Histology, Blood Vascular System. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
30. Tucker, W. D. & Mahajan, K. *Anatomy, Blood Vessels. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
31. Mercadante, A. A. & Raja, A. *Anatomy, Arteries. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
32. Godwin, L. & Crane, J. S. *Histology, Capillary. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2020).
33. Ragot, H. Rôle de la voie de signalisation de Notch3 dans le myocarde adulte. (2016).
34. Hatano, S., Strasser, T. & Organization, W. H. *PRIMARY PULMONARY HYPERTENSION Report on a WHO meeting.* [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39094/9241560444\\_eng.pdf](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39094/9241560444_eng.pdf) (1975).
35. Simonneau, G. *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. in *Journal of the American College of Cardiology* vol. 62 (J Am Coll Cardiol, 2013).
36. Rose-Jones, L. & McLaughlin, V. Pulmonary Hypertension: Types and Treatments. *Curr. Cardiol. Rev.* **11**, 73–79 (2014).
37. Memon, H. A. & Park, M. H. Pulmonary Arterial Hypertension in Women. *Methodist DeBakey cardiovascular journal* vol. 13 224–237 (2017).
38. Galiè, N., McLaughlin, V. V., Rubin, L. J. & Simonneau, G. An overview of the 6th World Symposium on Pulmonary Hypertension. *The European respiratory journal* vol. 53 (2019).
39. Boucherat, O., Vitry, G., Paulin, R., Provencher, S. & Bonnet, S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* (**in press**), (2017).
40. Pahal, P. & Sharma, S. *Pulmonary Hypertension, Primary. StatPearls* (StatPearls Publishing, 2018).
41. Machado, R. D. *et al.* Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 54 S32 (2009).
42. Hadinnapola, C., Morrell, N., Hadinnapola, C. & Morrell, N. Heritable pulmonary

- arterial hypertension. in *ESC CardioMed* 2527–2528 (Oxford University Press, 2018). doi:10.1093/med/9780198784906.003.0590.
43. Han, B. *et al.* Characterization of a caveolin-1 mutation associated with both pulmonary arterial hypertension and congenital generalized lipodystrophy. *Traffic* **17**, 1297–1312 (2016).
  44. Huang, J. & Mathew, R. Loss of cavin1 and expression of p-caveolin-1 in pulmonary hypertension: Possible role in neointima formation. *World J. Hypertens.* **9**, 17–29 (2019).
  45. Ma, L. *et al.* A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 351–361 (2013).
  46. Ramirez, R. L., De Jesus Perez, V. & Zamanian, R. T. Stimulants and Pulmonary Arterial Hypertension: An Update. *Adv. Pulm. Hypertens.* **17**, 49–54 (2018).
  47. Orcholski, M. E. *et al.* Drug-induced pulmonary arterial hypertension: A primer for clinicians and scientists. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 314 L967–L983 (2018).
  48. Galiè, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. in *European Respiratory Journal* vol. 46 903–975 (European Respiratory Society, 2015).
  49. Savale, L. *et al.* Pulmonary hypertension associated with benfluorex exposure. *Eur. Respir. J.* **40**, 1164–1172 (2012).
  50. Roche, A. *et al.* Illicit drug use and pulmonary arterial hypertension: Not so frequent. in *European Respiratory Journal* vol. 48 OA259 (European Respiratory Society (ERS), 2016).
  51. Condliffe, R. & Howard, L. S. Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension. *F1000Prime Rep.* **7**, (2015).
  52. Mathai, S. C. & Hassoun, P. M. Pulmonary Arterial Hypertension in Connective Tissue Diseases. *Heart Failure Clinics* vol. 8 413–425 (2012).
  53. Almodovar, S., Hsue, P. Y., Morelli, J., Huang, L. & Flores, S. C. Pathogenesis of hiv-associated pulmonary hypertension: Potential role of HIV-1 nef. in *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 8 308–312 (American Thoracic Society, 2011).
  54. Almodovar, S., Cicalini, S., Petrosillo, N. & Flores, S. C. Pulmonary hypertension associated with HIV infection - Pulmonary vascular disease: The global perspective. *Chest* vol. 137 6S-12S (2010).
  55. Saleemi, S. Portopulmonary hypertension. *Annals of Thoracic Medicine* vol. 5 5–9 (2010).
  56. Porres-Aguilar, M., Altamirano, J. T., Torre-Delgadillo, A., Charlton, M. R. & Duarte-Rojo, A. Portopulmonary hypertension and hepatopulmonary syndrome: A clinician-oriented overview. *European Respiratory Review* vol. 21 223–233 (2012).
  57. Chen, I. C. & Dai, Z. K. Insight into Pulmonary Arterial Hypertension Associated with Congenital Heart Disease (PAH-CHD): Classification and pharmacological management from a pediatric cardiological point of view. *Acta Cardiol. Sin.* **31**, 507–515 (2015).
  58. D’Alto, M. & Mahadevan, V. S. Pulmonary arterial hypertension associated with congenital heart disease. *Eur. Respir. Rev.* **21**, 328–337 (2012).
  59. Ross, A. G. P. *et al.* Schistosomiasis. *New England Journal of Medicine* vol. 346 1212–1220 (2002).
  60. Gavilanes, F., Fernandes, C. J. C. & Souza, R. Pulmonary arterial hypertension in

- schistosomiasis. *Curr. Opin. Pulm. Med.* **22**, 408–414 (2016).
61. Knafl, D., Gerges, C., King, C. H., Humbert, M. & Bustinduy, A. L. Schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension: A systematic review. *European Respiratory Review* vol. 29 (2020).
  62. Manjubashini, D., Nagarajan, K. & Rajesh Kumar, B. Pulmonary capillary hemangiomas: An unusual cause of primary pulmonary hypertension in a child with characteristic computed tomography imaging features. *Lung India* **36**, 157 (2019).
  63. Steinhorn, R. H. Neonatal pulmonary hypertension. in *Pediatric Critical Care Medicine* vol. 11 S79 (Lippincott Williams and Wilkins, 2010).
  64. Mehra, P. *et al.* Pulmonary hypertension in left heart disease. *Archives of Medical Science* vol. 15 262–273 (2019).
  65. Al-Omary, M. S., Sugito, S., Boyle, A. J., Sverdlov, A. L. & Collins, N. J. Pulmonary Hypertension Due to Left Heart Disease: Diagnosis, Pathophysiology, and Therapy. *Hypertension* 1397–1408 (2020) doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.14330.
  66. Charalampopoulos, A. *et al.* Pathophysiology and diagnosis of pulmonary hypertension due to left heart disease. *Frontiers in Medicine* vol. 5 174 (2018).
  67. Desai, A. & Desouza, S. A. Treatment of pulmonary hypertension with left heart disease: A concise review. *Vascular Health and Risk Management* vol. 13 415–420 (2017).
  68. Chebib, N. *et al.* Pulmonary hypertension in chronic lung diseases: comparison to other pulmonary hypertension groups. *Pulm. Circ.* **8**, (2018).
  69. Opitz, I. & Ulrich, S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease and emphysema patients: Prevalence, therapeutic options and pulmonary circulatory effects of lung volume reduction surgery. *Journal of Thoracic Disease* vol. 10 S2763–S2774 (2018).
  70. Cahill, E. *et al.* The pathophysiological basis of chronic hypoxic pulmonary hypertension in the mouse: Vasoconstrictor and structural mechanisms contribute equally. *Exp. Physiol.* **97**, 796–806 (2012).
  71. Peacock, A. Pulmonary hypertension due to chronic hypoxia. *BMJ* **300**, 763–763 (1990).
  72. Klinger, J. R. Group III Pulmonary Hypertension: Pulmonary Hypertension Associated with Lung Disease: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatments. *Cardiology Clinics* vol. 34 413–433 (2016).
  73. Pengo, V. *et al.* Incidence of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension after Pulmonary Embolism. *N. Engl. J. Med.* **350**, 2257–2264 (2004).
  74. Tapson, V. F. & Humbert, M. Incidence and prevalence of chronic thromboembolic pulmonary hypertension: From acute to chronic pulmonary embolism. in *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 3 564–567 (2006).
  75. Madani, M. M. Surgical Treatment of Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Pulmonary Thromboendarterectomy. *Methodist DeBakey cardiovascular journal* vol. 12 213–218 (2016).
  76. Kim, N. H. Group 4 Pulmonary Hypertension: Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension: Epidemiology, Pathophysiology, and Treatment. *Cardiology Clinics* vol. 34 435–441 (2016).
  77. Simonneau, G. *et al.* Updated Clinical Classification of Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 54 S43–S54 (2009).

78. Hayes, M. M. *et al.* Pulmonary hypertension in sickle cell disease. *Annals of the American Thoracic Society* vol. 11 1488–1489 (2014).
79. Rich, S. *et al.* Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann. Intern. Med.* **107**, 216–223 (1987).
80. Frost, A. E. *et al.* The changing picture of patients with pulmonary arterial hypertension in the United States: How REVEAL differs from historic and non-US contemporary registries. *Chest* **139**, 128–137 (2011).
81. McGoon, M. D. *et al.* Pulmonary arterial hypertension: Epidemiology and registries. in *Journal of the American College of Cardiology* vol. 62 (2013).
82. D’Alonzo, G. E. *et al.* Survival in patients with primary pulmonary hypertension: Results from a national prospective registry. *Ann. Intern. Med.* **115**, 343–349 (1991).
83. Benza, R. L. *et al.* An evaluation of long-term survival from time of diagnosis in pulmonary arterial hypertension from the reveal registry. *Chest* **142**, 448–456 (2012).
84. Lau, E. M. T., Giannoulatou, E., Celermajer, D. S. & Humbert, M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nature Reviews Cardiology* vol. 14 603–614 (2017).
85. Hoeper, M. M. *et al.* Elderly patients diagnosed with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Results from the COMPERA registry. *Int. J. Cardiol.* **168**, 871–880 (2013).
86. Bazan, I. S. & Fares, W. H. Pulmonary hypertension: Diagnostic and therapeutic challenges. *Therapeutics and Clinical Risk Management* vol. 11 1221–1233 (2015).
87. 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).
88. Frost, A. *et al.* Diagnosis of pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **53**, (2019).
89. Galiè, N. *et al.* 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. in *European Respiratory Journal* vol. 46 903–975 (European Respiratory Society, 2015).
90. Sun, X. G., Hansen, J. E., Oudiz, R. J. & Wasserman, K. Pulmonary function in primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **41**, 1028–1035 (2003).
91. Trip, P. *et al.* Severely reduced diffusion capacity in idiopathic pulmonary arterial hypertension: Patient characteristics and treatment responses. *Eur. Respir. J.* **42**, 1575–1585 (2013).
92. Pellegrino, R. *et al.* Interpretative strategies for lung function tests. *Eur. Respir. J.* **26**, 948–968 (2005).
93. Van De Veerdonk, M. C. *et al.* Progressive right ventricular dysfunction in patients with pulmonary arterial hypertension responding to therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **58**, 2511–2519 (2011).
94. Peacock, A. J. *et al.* Changes in right ventricular function measured by cardiac magnetic resonance imaging in patients receiving pulmonary arterial hypertension-targeted therapy the EURO-MR study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **7**, 107–114 (2014).
95. van Wolferen, S. A. *et al.* Prognostic value of right ventricular mass, volume, and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* **28**, 1250–7 (2007).
96. Albrecht, T., Blomley, M., Lancet, D. C.-T. & 1999, undefined. Non-invasive diagnosis of hepatic cirrhosis by transit-time analysis of an ultrasound contrast agent. *Elsevier*.
97. Hoeper, M., Lee, S., ... R. V.-J. of the & 2006, undefined. Complications of right

- heart catheterization procedures in patients with pulmonary hypertension in experienced centers. *onlinejacc.org*.
98. Shimoda, L. & Laurie, S. Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. *J. Mol. Med.* **91**, 297–309 (2013).
  99. Ryan, J. J. & Archer, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: Disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ. Res.* **115**, 176–188 (2014).
  100. Vonk-Noordegraaf, A. *et al.* Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 22–33 (2013).
  101. Gómez, A. *et al.* Right ventricular ischemia in patients with primary pulmonary hypertension. *J. Am. Coll. Cardiol.* **38**, 1137–1142 (2001).
  102. McLaughlin, V. V. *et al.* ACCF/AHA 2009 Expert Consensus Document on Pulmonary Hypertension. A Report of the American College of Cardiology Foundation Task Force on Expert Consensus Documents and the American Heart Association Developed in Collaboration With the American College of Chest Physicians; American Thoracic Society, Inc.; and the Pulmonary Hypertension Association. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 53 1573–1619 (2009).
  103. Risau, W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* vol. 386 671–674 (1997).
  104. Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro-Oncology* vol. 50 1–15 (2000).
  105. Rubin, L. J. Pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 3 111–115 (2006).
  106. Ranchoux, B. *et al.* Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension: An evolving landscape (2017 Grover Conference Series). *Pulmonary Circulation* vol. 8 1–17 (2018).
  107. Tuder, R. M., Marecki, J. C., Richter, A., Fijalkowska, I. & Flores, S. Pathology of Pulmonary Hypertension. *Clinics in Chest Medicine* vol. 28 23–42 (2007).
  108. HEATH, D. & EDWARDS, J. E. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* **18**, 533–547 (1958).
  109. Masri, F. A. *et al.* Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **293**, (2007).
  110. Xu, W. & Erzurum, S. C. Endothelial Cell Energy Metabolism, Proliferation, and Apoptosis in Pulmonary Hypertension. in *Comprehensive Physiology* vol. 1 357 (John Wiley & Sons, Inc., 2010).
  111. Gao, Y., Chen, T. & Raj, J. U. Endothelial and smooth muscle cell interactions in the pathobiology of pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* vol. 54 451–460 (2016).
  112. Sylvester, J. T., Shimoda, L. A., Aaronson, P. I. & Ward, J. P. T. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol. Rev.* **92**, 367–520 (2012).
  113. 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).
  114. 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).
  115. Lo, C. C. W., Moosavi, S. M. & Bubb, K. J. The regulation of pulmonary vascular

- tone by neuropeptides and the implications for pulmonary hypertension. *Frontiers in Physiology* vol. 9 (2018).
116. A, G. *et al.* Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* **341**, 1550–1554 (1993).
  117. Tuder, R. M. Pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Cell and Tissue Research* vol. 367 643–649 (2017).
  118. Wideman, R. F. *et al.* Plexiform lesions in the lungs of domestic fowl selected for susceptibility to pulmonary arterial hypertension: incidence and histology. *Anat. Rec. (Hoboken)*. **294**, 739–55 (2011).
  119. Stacher, E. *et al.* Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 261–272 (2012).
  120. Altieri, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nature Reviews Cancer* vol. 3 46–54 (2003).
  121. Dohi, T., Beltrami, E., Wall, N. R., Plescia, J. & Altieri, D. C. Mitochondrial survivin inhibits apoptosis and promotes tumorigenesis. *J. Clin. Invest.* **114**, 1117–1127 (2004).
  122. Ferreira-Pinto, M. J. *et al.* Survivin role in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Heart J.* **34**, P302–P302 (2013).
  123. Seo, B., Oemar, B. S., Siebenmann, R., Von Segesser, L. & Luscher, T. F. Both ET(A) and ET(B) receptors mediate contraction to endothelin-1 in human blood vessels. *Circulation* **89**, 1203–1208 (1994).
  124. Miyauchi, T. *et al.* Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **73**, 887–897 (1993).
  125. Giaid, A. *et al.* Expression of Endothelin-1 in the Lungs of Patients with Pulmonary Hypertension. *N. Engl. J. Med.* **328**, 1732–1739 (1993).
  126. Tykocki, N. R. & Watts, S. W. The interdependence of endothelin-1 and calcium: A review. *Clinical Science* vol. 119 361–372 (2010).
  127. Zeng, Q. H., Li, X. T., Zhong, G. G., Zhang, W. J. & Sun, C. W. Endothelin-1 induces intracellular [Ca<sup>2+</sup>] increase via Ca<sup>2+</sup> influx through the L-type Ca<sup>2+</sup> channel, Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release and a pathway involving ETA receptors, PKC, PKA and AT1 receptors in cardiomyocytes. *Sci. China, Ser. C Life Sci.* **52**, 360–370 (2009).
  128. Prior, D. L., Adams, H. & Williams, T. J. Update on pharmacotherapy for pulmonary hypertension. *Med. J. Aust.* **205**, 271–276 (2016).
  129. Bubb, K. J., Hobbs, A. J. & Klinger, J. R. Modulation of cGMP Synthesis and Metabolism. in 355–375 (Humana Press, New York, NY, 2015). doi:10.1007/978-1-4939-2636-7\_15.
  130. Austin, E. D. & Loyd, J. E. Toward precision medicine in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **192**, 1272–1274 (2015).
  131. Fuster, V. *et al.* Primary pulmonary hypertension: Natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* **70**, 580–587 (1984).
  132. WAGENVOORT, N. Primary Pulmonary Hypertension: A Pathologic Study of the Lung Vessels in 156 Clinically Diagnosed Cases. *Circulation* **42**, 1163–1184 (1970).
  133. Pietra, G. G. *et al.* Histopathology of primary pulmonary hypertension. A qualitative and quantitative study of pulmonary blood vessels from 58 patients in the National Heart, Lung, and Blood Institute, Primary Pulmonary Hypertension Registry. *Circulation* **80**, 1198–1206 (1989).
  134. Wagenvoort, C. A. Lung biopsy specimens in the evaluation of pulmonary vascular

- disease. *Chest* **77**, 614–625 (1980).
135. BJORNSSON, J. Primary Pulmonary Hypertension: A Histopathologic Study of 80 Cases. *Mayo Clin. Proc.* **60**, 16–25 (1985).
  136. Johnson, S. R., Granton, J. T. & Mehta, S. Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* vol. 130 545–552 (2006).
  137. HEATH, D. & EDWARDS, J. E. The pathology of hypertensive pulmonary vascular disease; a description of six grades of structural changes in the pulmonary arteries with special reference to congenital cardiac septal defects. *Circulation* **18**, 533–547 (1958).
  138. Tudor, R. M. & Voelkel, N. F. Plexiform lesion in severe pulmonary hypertension: association with glomeruloid lesion. *Am. J. Pathol.* **159**, 382–3 (2001).
  139. El Chami, H. & Hassoun, P. M. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **55**, 218–228 (2012).
  140. McLaughlin, V. V., Shah, S. J., Souza, R. & Humbert, M. Management of pulmonary arterial hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 65 1976–1997 (2015).
  141. Bourgeois, A., Omura, J., Habbout, K., Bonnet, S. & Boucherat, O. Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* vol. 104 9–13 (2018).
  142. Haddad, F., Doyle, R., Murphy, D. J. & Hunt, S. A. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: Pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation* vol. 117 1717–1731 (2008).
  143. Friedberg, M. K. & Redington, A. N. Right versus left ventricular failure: Differences, similarities, and interactions. *Circulation* **129**, 1033–1044 (2014).
  144. Vonk Noordegraaf, A., Westerhof, B. E. & Westerhof, N. The Relationship Between the Right Ventricle and its Load in Pulmonary Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 69 236–243 (2017).
  145. Vonk-Noordegraaf, A. *et al.* Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: Physiology and pathobiology. in *Journal of the American College of Cardiology* vol. 62 (J Am Coll Cardiol, 2013).
  146. Watkins, S. C., Samuel, J. L., Marotte, F., Bertier-Savalle, B. & Rappaport, L. Microtubules and desmin filaments during onset of heart hypertrophy in rat: A double immunoelectron microscope study. *Circ. Res.* **60**, 327–336 (1987).
  147. Samuel, J. L. *et al.* Different distributions of microtubules, desmin filaments and isomyosins during the onset of cardiac hypertrophy in the rat. *Eur. J. Cell Biol.* **34**, 300–306 (1984).
  148. Poels, E. M., da Costa Martins, P. A. & van Empel, V. P. M. Adaptive capacity of the right ventricle: why does it fail? *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* **308**, H803–H813 (2015).
  149. Heineke, J. & Molkentin, J. D. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**, 589–600 (2006).
  150. Umar, S. *et al.* Activation of signaling molecules and matrix metalloproteinases in right ventricular myocardium of rats with pulmonary hypertension. *Pathol. Res. Pract.* **203**, 863–872 (2007).
  151. Anderson, L. R., Owens, T. W. & Naylor, M. J. Structural and mechanical functions of integrins. *Biophysical Reviews* vol. 6 203–213 (2014).
  152. Laviades, C. *et al.* Abnormalities of the extracellular degradation of collagen type I in essential hypertension. *Circulation* **98**, 535–540 (1998).

153. Roldán, V. *et al.* Matrix metalloproteinases and tissue remodeling in hypertrophic cardiomyopathy. *Am. Heart J.* **156**, 85–91 (2008).
154. Umar, S. *et al.* Activation of signaling molecules and matrix metalloproteinases in right ventricular myocardium of rats with pulmonary hypertension. *Pathol. Res. Pract.* **203**, 863–872 (2007).
155. Hu, H. & Sachs, F. Stretch-activated ion channels in the heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* vol. 29 1511–1523 (1997).
156. Sadoshima, J. I., Takahashi, T., Jahn, L. & Izumo, S. Roles of mechano-sensitive ion channels, cytoskeleton, and contractile activity in stretch-induced immediate-early gene expression and hypertrophy of cardiac myocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 9905–9909 (1992).
157. Ruwhof, C. & Van Der Laarse, A. Mechanical stress-induced cardiac hypertrophy: Mechanisms and signal transduction pathways. *Cardiovascular Research* vol. 47 23–37 (2000).
158. Park, H. K. *et al.* Enhanced gene expression of renin-angiotensin system, TGF- $\beta$ 1, endothelin-1 and nitric oxide synthase in right-ventricular hypertrophy. *Pharmacol. Res.* **43**, 265–273 (2001).
159. Clerk, A. & Sugden, P. H. Activation of protein kinase cascades in the heart by hypertrophic G protein-coupled receptor agonists. in *American Journal of Cardiology* vol. 83 64–69 (Elsevier Inc., 1999).
160. Dias, C. A. *et al.* Reversible pulmonary trunk banding. II. An experimental model for rapid pulmonary ventricular hypertrophy. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* **124**, 999–1006 (2002).
161. Guarracino, F. *et al.* Right ventricular failure: physiology and assessment. *Minerva Anesthesiol.* **71**, 307–312 (2005).
162. Vonk Noordegraaf, A. & Galiè, N. The role of the right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Review* vol. 20 243–253 (2011).
163. Kumar, A. & Neema, P. K. Severe pulmonary hypertension and right ventricular failure. *Indian Journal of Anaesthesia* vol. 61 753–759 (2017).
164. Ryan, J. J. & Archer, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: Disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ. Res.* **115**, 176–188 (2014).
165. Trip, P. *et al.* Clinical relevance of right ventricular diastolic stiffness in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **45**, 1603–1612 (2015).
166. Rich, S. *et al.* Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest* **138**, 1234–1239 (2010).
167. Campian, M. E. *et al.* Early inflammatory response during the development of right ventricular heart failure in a rat model. *Eur. J. Heart Fail.* **12**, 653–658 (2010).
168. Watts, J. A., Zagorski, J., Gellar, M. A., Stevinson, B. G. & Kline, J. A. Cardiac inflammation contributes to right ventricular dysfunction following experimental pulmonary embolism in rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **41**, 296–307 (2006).
169. Iwadate, K. *et al.* Right ventricular damage due to pulmonary embolism: Examination of the number of infiltrating macrophages. *Forensic Sci. Int.* **134**, 147–153 (2003).
170. Voelkel, N. F., Gomez-Arroyo, J., Abbate, A. & Bogaard, H. J. Mechanisms of right heart failure—A work in progress and a plea for failure prevention. *Pulm. Circ.* **3**, 137–143 (2013).
171. Mann, D. L. Innate immunity and the failing heart: The cytokine hypothesis revisited.

- Circulation Research* vol. 116 1254–1268 (2015).
172. Feldman, A. M. *et al.* The role of tumor necrosis factor in the pathophysiology of heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* **35**, 537–544 (2000).
  173. Odeh, M., Sabo, E. & Oliven, A. Circulating levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  correlate positively with severity of peripheral oedema in patients with right heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **8**, 141–146 (2006).
  174. Luitel, H. *et al.* Pressure overload leads to an increased accumulation and activity of mast cells in the right ventricle. *Physiol. Rep.* **5**, (2017).
  175. Ahmed, L. A., Obaid, A. A. Z., Zaki, H. F. & Agha, A. M. Role of oxidative stress, inflammation, nitric oxide and transforming growth factor-beta in the protective effect of diosgenin in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **740**, 379–387 (2014).
  176. Gabriele, P. *et al.* Activation of the cardiac interleukin-6 system in advanced heart failure. *Eur. J. Heart Fail.* **3**, 415–421 (2001).
  177. Wang, J. J. *et al.* Evaluation and Treatment of Endoplasmic Reticulum (ER) Stress in Right Ventricular Dysfunction during Monocrotaline-Induced Rat Pulmonary Arterial Hypertension. *Cardiovasc. Drugs Ther.* **30**, 587–598 (2016).
  178. Vistnes, M. *et al.* Circulating cytokine levels in mice with heart failure are etiology dependent. *J. Appl. Physiol.* **108**, 1357–1364 (2010).
  179. Prins, K. W. *et al.* Interleukin-6 is independently associated with right ventricular function in pulmonary arterial hypertension. *J. Hear. Lung Transplant.* **37**, 376–384 (2018).
  180. Vazirinejad, R., Ahmadi, Z., Kazemi Arababadi, M., Hassanshahi, G. & Kennedy, D. The Biological Functions, Structure and Sources of CXCL10 and Its Outstanding Part in the Pathophysiology of Multiple Sclerosis. *Neuroimmunomodulation* **21**, 322–330 (2014).
  181. Yang, T. *et al.* Increased levels of plasma CXC-Chemokine Ligand 10, 12 and 16 are associated with right ventricular function in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Hear. Lung J. Acute Crit. Care* **43**, 322–327 (2014).
  182. Hein, S. *et al.* Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure-overloaded human: Heart structural deterioration and compensatory mechanisms. *Circulation* **107**, 984–991 (2003).
  183. Drake, J. I. *et al.* Molecular signature of a right heart failure program in chronic severe pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **45**, 1239–1247 (2011).
  184. Bogaard, H. J., Abe, K., Vonk Noordegraaf, A. & Voelkel, N. F. The right ventricle under pressure: cellular and molecular mechanisms of right-heart failure in pulmonary hypertension. *Chest* **135**, 794–804 (2009).
  185. Ikeda, S., Hamada, M. & Hiwada, K. Cardiomyocyte apoptosis with enhanced expression of P53 and Bax in right ventricle after pulmonary arterial banding. *Life Sci.* **65**, 925–933 (1999).
  186. Braun, M. U., Szalai, P., Strasser, R. H. & Borst, M. M. Right ventricular hypertrophy and apoptosis after pulmonary artery banding: Regulation of PKC isozymes. *Cardiovasc. Res.* **59**, 658–667 (2003).
  187. Minegishi, S., Kitahori, K., Murakami, A. & Ono, M. Mechanism of pressure-overload right ventricular hypertrophy in infant rabbits. *Int. Heart J.* **52**, 56–60 (2011).
  188. Zungu-Edmondson, M., Shults, N. V., Wong, C. M. & Suzuki, Y. J. Modulators of right ventricular apoptosis and contractility in a rat model of pulmonary hypertension.

- Cardiovasc. Res.* **110**, 30–39 (2016).
189. Bogaard, H. J. *et al.* Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* **120**, 1951–1960 (2009).
  190. Rain, S. *et al.* Right ventricular diastolic impairment in patients with pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **128**, 2016–2025 (2013).
  191. Kurzyna, M. *et al.* Characteristics and prognosis of patients with decompensated right ventricular failure during the course of pulmonary hypertension. *Kardiol. Pol.* **66**, 1031–1033 (2008).
  192. Heresi, G. A. *et al.* Sensitive cardiac troponin I predicts poor outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **39**, 939–944 (2012).
  193. Moon, M. R. *et al.* Differential calcium handling in two canine models of right ventricular pressure overload. *J. Surg. Res.* **178**, 554–562 (2012).
  194. Hadri, L. *et al.* Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **128**, 512–523 (2013).
  195. Niwano, K. *et al.* Lentiviral vector-mediated SERCA2 gene transfer protects against heart failure and left ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Mol. Ther.* **16**, 1026–1032 (2008).
  196. Lyon, A. R. *et al.* Investigation of the safety and feasibility of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with chronic heart failure supported with a left ventricular assist device – the SERCA-LVAD TRIAL. *Gene Ther.* **27**, 579–590 (2020).
  197. Wang, X., Shults, N. V. & Suzuki, Y. J. Oxidative pro-ling of the failing right heart in rats with pulmonary hypertension. *PLoS One* **12**, (2017).
  198. Reddy, S. & Bernstein, D. Molecular mechanisms of right ventricular failure. *Circulation* **132**, 1734–1742 (2015).
  199. Shults, N. V., Melnyk, O., Suzuki, D. I. & Suzuki, Y. J. Redox biology of right-sided heart failure. *Antioxidants* vol. 7 (2018).
  200. Ikeda, S. *et al.* Crucial role of rho-kinase in pressure overload-induced right ventricular hypertrophy and dysfunction in mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **34**, 1260–1271 (2014).
  201. Tarafdar, A. & Pula, G. The Role of NADPH Oxidases and Oxidative Stress in Neurodegenerative Disorders. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3824 (2018).
  202. DeMarco, V. G. Contribution of oxidative stress to pulmonary arterial hypertension. *World J. Cardiol.* **2**, 316 (2010).
  203. Woo, E. *et al.* Capillary Degeneration and Right Ventricular Remodeling Due to Hypoxic Stress with Sugeng5416. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **15**, (2017).
  204. Murphy, M. P. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**, 1–13 (2009).
  205. Wenz, T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 $\alpha$  under cellular stress. *Mitochondrion* vol. 13 134–142 (2013).
  206. Neely, J. R. & Morgan, H. E. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. *Annual review of physiology* vol. 36 413–459 (1974).
  207. Ryan, J. J. & Archer, S. L. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: Disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circ. Res.* **115**, 176–188 (2014).
  208. Oikawa, M. *et al.* Increased [18F]fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of

- epoprostenol. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1849–1855 (2005).
209. Oikawa, M. *et al.* Increased [18F]fluorodeoxyglucose accumulation in right ventricular free wall in patients with pulmonary hypertension and the effect of epoprostenol. *J. Am. Coll. Cardiol.* **45**, 1849–1855 (2005).
210. Piao, L. *et al.* Cardiac glutaminolysis: A maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *J. Mol. Med.* **91**, 1185–1197 (2013).
211. Sutendra, G. *et al.* A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J. Mol. Med.* **91**, 1315–1327 (2013).
212. Sugden, M. C., Langdown, M. L., Harris, R. A. & Holness, M. J. Expression and regulation of pyruvate dehydrogenase kinase isoforms in the developing rat heart and in adulthood: Role of thyroid hormone status and lipid supply. *Biochem. J.* **352**, 731–738 (2000).
213. Piao, L. *et al.* The inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves impaired cardiac function and electrical remodeling in two models of right ventricular hypertrophy: Resuscitating the hibernating right ventricle. *J. Mol. Med.* **88**, 47–60 (2010).
214. Rich, S. *et al.* Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest* **138**, 1234–1239 (2010).
215. Bertero, T. *et al.* Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **126**, 3313–3335 (2016).
216. Heresi, G. A. *et al.* Sensitive cardiac troponin I predicts poor outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **39**, 939–944 (2012).
217. Bogaard, H. J. *et al.* Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* **120**, 1951–1960 (2009).
218. Van Wolferen, S. A. *et al.* Right coronary artery flow impairment in patients with pulmonary hypertension. *Eur. Heart J.* **29**, 120–127 (2008).
219. Vogel-Claussen, J. *et al.* Right and left ventricular myocardial perfusion reserves correlate with right ventricular function and pulmonary hemodynamics in patients with pulmonary arterial hypertension. *Radiology* **258**, 119–127 (2011).
220. Voelkel, N. F., Gomez-Arroyo, J., Abbate, A., Bogaard, H. J. & Nicolls, M. R. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *European Respiratory Journal* vol. 40 1555–1565 (2012).
221. Schermuly, R. T., Ghofrani, H. A., Wilkins, M. R. & Grimminger, F. Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* **8**, 443–455 (2011).
222. Jonigk, D. *et al.* Plexiform lesions in pulmonary arterial hypertension: Composition, architecture, and microenvironment. *Am. J. Pathol.* **179**, 167–179 (2011).
223. Tudor, R. M. & Voelkel, N. F. Plexiform lesion in severe pulmonary hypertension: association with glomeruloid lesion. *The American journal of pathology* vol. 159 382–383 (2001).
224. Geiger, R. *et al.* Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in pulmonary plexogenic arteriopathy due to congenital heart disease. *J. Pathol.* **191**, 202–207 (2000).
225. Tudor, R. M. *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J. Pathol.* **195**, 367–374 (2001).

226. Voelkel, N. F. & Gomez-Arroyo, J. The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Pulmonary Arterial Hypertension The Angiogenesis Paradox. (2014) doi:10.1165/rcmb.2014-0045TR.
227. Sakao, S. & Tatsumi, K. The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Respiration* vol. 81 253–261 (2011).
228. Mizuno, S. *et al.* Severe pulmonary arterial hypertension induced by SU5416 and ovalbumin immunization. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **47**, 679–687 (2012).
229. Voelkel, N. F., Vandivier, R. W. & Tuder, R. M. Vascular endothelial growth factor in the lung. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 290 (2006).
230. Sakao, S. *et al.* Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells. *FASEB J.* **19**, 1178–1180 (2005).
231. Partovian, C. *et al.* Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **275**, (1998).
232. Schermuly, R. T. *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* **115**, 2811–2821 (2005).
233. Perros, F. *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **178**, 81–88 (2008).
234. Humbert, M. *et al.* Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients. *Eur. Respir. J.* **11**, 554–559 (1998).
235. Andrae, J., Gallini, R. & Betsholtz, C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes and Development* vol. 22 1276–1312 (2008).
236. Yu, Y. *et al.* PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **284**, (2003).
237. Ross, R., Glomset, J., Kariya, B. & Harker, L. A platelet dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 1207–1210 (1974).
238. Klein, M. *et al.* Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* **118**, 2081–2090 (2008).
239. Grimminger, F. & Schermuly, R. T. PDGF receptor and its antagonists: Role in treatment of PAH. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 661 435–446 (Adv Exp Med Biol, 2010).
240. Schermuly, R. T. *et al.* Riociguat for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opinion on Investigational Drugs* vol. 20 567–576 (2011).
241. Merklinger, S. L., Jones, P. L., Martinez, E. C. & Rabinovitch, M. Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension. *Circulation* **112**, 423–431 (2005).
242. Dahal, B. K. *et al.* Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 158–167 (2010).
243. Zheng, Y. *et al.* Inhibition of FGFR signaling with PD173074 ameliorates monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension and rescues BMPR-II expression. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **66**, 504–514 (2015).
244. Zuckerbraun, B. S. *et al.* Nitric oxide-induced inhibition of smooth muscle cell proliferation involves S-nitrosation and inactivation of RhoA. *Am. J. Physiol. - Cell*

- Physiol.* **292**, (2007).
245. 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).
  246. Jeffery, T. K. & Morrell, N. W. Molecular and cellular basis of pulmonary vascular remodeling in pulmonary hypertension. *Progress in Cardiovascular Diseases* vol. 45 173–202 (2002).
  247. Bouallegue, A., Bou Daou, G. & Srivastava, A. Endothelin-1-Induced Signaling Pathways in Vascular Smooth Muscle Cells. *Curr. Vasc. Pharmacol.* **5**, 45–52 (2006).
  248. Roberts, A. Genetics potassium channelopathy implicated in the pathogenesis of familial PAH. *Nature Reviews Cardiology* vol. 10 550 (2013).
  249. Ma, L. *et al.* A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 351–361 (2013).
  250. Best, D. H. *et al.* EIF2AK4 Mutations in Patients Diagnosed With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* **151**, 821–828 (2017).
  251. Navas Tejedor, P. *et al.* An homozygous mutation in KCNK3 is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. *Clin. Genet.* **91**, 453–457 (2017).
  252. Makino, A., Firth, A. L. & Yuan, J. X. J. Endothelial and smooth muscle cell ion channels in pulmonary vasoconstriction and vascular remodeling. *Compr. Physiol.* **1**, 1555–1602 (2011).
  253. Brayden, J. E. & Nelson, M. T. Regulation of arterial tone by activation of calcium-dependent potassium channels. *Science (80-. )*. **256**, 532–535 (1992).
  254. Olschewski, A. *et al.* Impact of TASK-1 in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circ. Res.* **98**, 1072–1080 (2006).
  255. Remillard, C. V. *et al.* Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **292**, (2007).
  256. Yuan, X. J., Wang, J., Juhaszova, M., Gaine, S. P. & Rubin, L. J. Attenuated K<sup>+</sup> channel gene transcription in primary pulmonary hypertension. *Lancet* **351**, 726–727 (1998).
  257. Antigny, F. *et al.* Potassium channel subfamily K member 3 (KCNK3) contributes to the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **133**, 1371–1385 (2016).
  258. Boucherat, O. *et al.* Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. in *European Respiratory Journal* vol. 46 1167–1177 (European Respiratory Society, 2015).
  259. Lambert, M. *et al.* Ion channels in pulmonary hypertension: A therapeutic interest? *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
  260. De Man, F. S. *et al.* Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 780–789 (2012).
  261. Ferron, L. *et al.* Angiotensin II Signaling Pathways Mediate Expression of Cardiac T-Type Calcium Channels. *Circ. Res.* **93**, 1241–1248 (2003).
  262. Gómez-Viquez, L., Guerrero-Serna, G., García, U. & Guerrero-Hernández, A. SERCA pump optimizes Ca<sup>2+</sup> release by a mechanism independent of store filling in smooth muscle cells. *Biophys. J.* **85**, 370–380 (2003).
  263. Lu, X. F. *et al.* FoxM1 is a promising candidate target in the treatment of breast cancer.

- Oncotarget* **9**, 842–852 (2018).
264. Levy, D. E. & Lee, C. What does Stat3 do? *J. Clin. Invest.* **109**, 1143–1148 (2002).
  265. Ma, J. H., Qin, L. & Li, X. Role of STAT3 signaling pathway in breast cancer. *Cell Communication and Signaling* vol. 18 (2020).
  266. Kamran, M. Z., Patil, P. & Gude, R. P. Role of STAT3 in cancer metastasis and translational advances. *BioMed Research International* vol. 2013 (2013).
  267. Johnston, P. A. & Grandis, J. R. STAT3 signaling: Anticancer strategies and challenges. *Molecular Interventions* vol. 11 18–26 (2011).
  268. Aittomäki, S. & Pesu, M. Therapeutic targeting of the JAK/STAT pathway. *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology* vol. 114 18–23 (2014).
  269. Lee, H., Jeong, A. J. & Ye, S. K. Highlighted STAT3 as a potential drug target for cancer therapy. *BMB Reports* vol. 52 415–423 (2019).
  270. Hillmer, E. J., Zhang, H., Li, H. S. & Watowich, S. S. STAT3 signaling in immunity. *Cytokine and Growth Factor Reviews* vol. 31 1–15 (2016).
  271. Forbes, L. R., Milner, J. & Haddad, E. Signal transducer and activator of transcription 3: A year in review. *Current Opinion in Hematology* vol. 23 23–27 (2016).
  272. Brock, M. *et al.* Interleukin-6 modulates the expression of the bone morphogenic protein receptor type ii through a novel STAT3-microRNA cluster 17/92 pathway. *Circ. Res.* **104**, 1184–1191 (2009).
  273. Yang, X. R., Lin, M. J. & Sham, J. S. K. Physiological functions of transient receptor potential channels in pulmonary arterial smooth muscle cells. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 661 109–122 (Adv Exp Med Biol, 2010).
  274. Darnell, J. E. STATs and gene regulation. *Science (80-. )*. **277**, 1630–1635 (1997).
  275. Johnson, D. E., O’Keefe, R. A. & Grandis, J. R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology* vol. 15 234–248 (2018).
  276. Kitamura, H. *et al.* Interleukin-6/STAT3 signaling as a promising target to improve the efficacy of cancer immunotherapy. *Cancer Science* vol. 108 1947–1952 (2017).
  277. Sud, N. & Black, S. M. Endothelin-1 impairs nitric oxide signaling in endothelial cells through a protein kinase cδ-dependent activation of STAT3 and decreased endothelial nitric oxide synthase expression. *DNA Cell Biol.* **28**, 543–553 (2009).
  278. Tursynbay, Y. *et al.* Pim-1 kinase as cancer drug target: An update (Review). *Biomedical Reports* vol. 4 140–146 (2016).
  279. Weirauch, U. *et al.* Functional role and therapeutic potential of the Pim-1 kinase in colon carcinoma. *Neoplasia (United States)* **15**, 783–794 (2013).
  280. Magnuson, N. S., Wang, Z., Ding, G. & Reeves, R. Why target PIM1 for cancer diagnosis and treatment? *Future Oncology* vol. 6 1461–1478 (2010).
  281. Lampron, M.-C. *et al.* PIM1 (Moloney Murine Leukemia Provirus Integration Site) Inhibition Decreases the Nonhomologous End-Joining DNA Damage Repair Signaling Pathway in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **40**, 783–801 (2020).
  282. Renard, S. *et al.* Pim-1: A new biomarker in pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* **3**, 74–81 (2013).
  283. 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).
  284. Paulin, R., Meloche, J. & Bonnet, S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *JAK-STAT* **1**, 223–233 (2012).

285. 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).
286. Bonnet, S. *et al.* A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* **11**, 37–51 (2007).
287. Kawamura, T. *et al.* Endothelin-1-dependent nuclear factor of activated T lymphocyte signaling associates with transcriptional coactivator p300 in the activation of the B cell leukemia-2 promoter in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **94**, 1492–1499 (2004).
288. Li, G. *et al.* The expression of survivin in irreversible pulmonary arterial hypertension rats and its value in evaluating the reversibility of pulmonary arterial hypertension secondary to congenital heart disease. *Pulm. Circ.* **9**, (2019).
289. McMurtry, M. S. *et al.* Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* **115**, 1479–1491 (2005).
290. Courboulin, A. *et al.* Krüppel-like Factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* **12**, 128 (2011).
291. Paulin, R. *et al.* Dehydroepiandrosterone inhibits the Src/STAT3 constitutive activation in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **301**, (2011).
292. Paulin, R., Meloche, J. & Bonnet, S. STAT3 signaling in pulmonary arterial hypertension. *Jak-Stat* **1**, 223–233 (2012).
293. Zona, S., Bella, L., Burton, M. J., Nestal de Moraes, G. & Lam, E. W. F. FOXM1: An emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* vol. 1839 1316–1322 (2014).
294. Alvarez-Fernández, M. & Medema, R. H. Novel functions of FoxM1: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Frontiers in Oncology* vol. 3 MAR (2013).
295. Liao, G. Bin *et al.* Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. *Cell Communication and Signaling* vol. 16 (2018).
296. Raychaudhuri, P. & Park, H. J. FoxM1: A master regulator of tumor metastasis. *Cancer Research* vol. 71 4329–4333 (2011).
297. Courboulin, A. *et al.* Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* **208**, 535–548 (2011).
298. Bourgeois, A. *et al.* FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Med.* **96**, 223–235 (2018).
299. Dai, Z. *et al.* Endothelial and smooth muscle cell interaction via FoxM1 signaling mediates vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 788–802 (2018).
300. Dai, J. *et al.* Smooth muscle cell-specific FoxM1 controls hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cell. Signal.* **51**, 119–129 (2018).
301. Maxwell, P. H. & Ratcliffe, P. J. Oxygen sensors and angiogenesis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **13**, 29–37 (2002).
302. Giatromanolaki, A. *et al.* Relation of hypoxia inducible factor 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. *Br. J. Cancer* **85**, 881–890 (2001).

303. Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. & Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 5510–5514 (1995).
304. Yu, A. Y. *et al.* Impaired physiological responses to chronic hypoxia in mice partially deficient for hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ . *J. Clin. Invest.* **103**, 691–696 (1999).
305. Forsythe, J. A. *et al.* Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 4604–4613 (1996).
306. Gerber, H. P., Condorelli, F., Park, J. & Ferrara, N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **272**, 23659–23667 (1997).
307. Hu, J., Discher, D. J., Bishopric, N. H. & Webster, K. A. Hypoxia regulates expression of the endothelin-1 gene through a proximal hypoxia-inducible factor-1 binding site on the antisense strand. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 894–899 (1998).
308. Quintero, M., Mackenzie, N. & Brennan, P. A. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) in cancer. *European Journal of Surgical Oncology* vol. 30 465–468 (2004).
309. Semenza, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 3 721–732 (2003).
310. Niu, G. *et al.* Signal transducer and activator of transcription 3 is required for hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  RNA expression in both tumor cells and tumor-associated myeloid cells. *Mol. Cancer Res.* **6**, 1099–1105 (2008).
311. Fu, X. & Zhang, F. Role of the hif-1 signaling pathway in chronic obstructive pulmonary disease. *Exp. Ther. Med.* **16**, 4553–4561 (2018).
312. Waypa, G. B. & Schumacker, P. T. Roles of HIF1 and HIF2 in pulmonary hypertension: It all depends on the context. *European Respiratory Journal* vol. 54 (2019).
313. Lei, W. *et al.* Expression and analyses of the HIF-1 pathway in the lungs of humans with pulmonary arterial hypertension. *Mol. Med. Rep.* **14**, 4383–4390 (2016).
314. Pullamsetti, S. S., Seeger, W. & Savai, R. Hypoxia-inducible factor signaling in pulmonary hypertension. doi:10.1172/JCI137558.
315. Ball, M. K. *et al.* Regulation of hypoxia-induced pulmonary hypertension by vascular smooth muscle hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ . *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **189**, 314–324 (2014).
316. Bonnet, S. *et al.* An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630–2641 (2006).
317. Courboulin, A. *et al.* Krüppel-like Factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* **12**, 128 (2011).
318. Strauss, B. *et al.* Cyclin B1 is essential for mitosis in mouse embryos, and its nuclear export sets the time for mitosis. *J. Cell Biol.* **217**, 179–193 (2018).
319. Nakayama, Y. & Yamaguchi, N. Role of Cyclin B1 Levels in DNA Damage and DNA Damage-Induced Senescence. in *International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 305 303–337 (Elsevier Inc., 2013).
320. Androic, I. *et al.* Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol. *BMC Cancer* **8**, 391 (2008).
321. Yuan, J. *et al.* Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in

- human tumor cells. *Oncogene* **23**, 5843–5852 (2004).
322. Li, X. *et al.* KLF5 mediates vascular remodeling via HIF-1 $\alpha$  in hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol.* **310**, L299–L310 (2016).
323. Lane, K. B. *et al.* Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- $\beta$  receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat. Genet.* **26**, 81–84 (2000).
324. Machado, R. D. *et al.* Mutations of the TGF- $\beta$  type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Human Mutation* vol. 27 121–132 (2006).
325. Morrell, N. W. Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: A new paradigm for tissue remodeling? in *Proceedings of the American Thoracic Society* vol. 3 680–686 (2006).
326. Deng, Z. *et al.* Familial primary pulmonary hypertension (Gene PPH1) is caused by mutations in the bone morphogenetic protein receptor-II gene. *Am. J. Hum. Genet.* **67**, 737–744 (2000).
327. Crosswhite, P. & Sun, Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodeling. *Mol. Med.* **20**, 191–201 (2014).
328. Yu, P. B. *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor is required for BMP-mediated growth arrest and differentiation in pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 3877–3888 (2008).
329. Jurasz, P., Courtman, D., Babaie, S. & Stewart, D. J. Role of apoptosis in pulmonary hypertension: From experimental models to clinical trials. *Pharmacology and Therapeutics* vol. 126 1–8 (2010).
330. Rowlands, D. S. *et al.* Transcriptome and translational signaling following endurance exercise in trained skeletal muscle: Impact of dietary protein. *Physiol. Genomics* **43**, 1004–1020 (2011).
331. Frank, D. B. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 promotes pulmonary vascular remodeling in hypoxic pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **97**, 496–504 (2005).
332. Huang, Z., Wang, D., Ihida-Stansbury, K., Jones, P. L. & Martin, J. F. Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum. Mol. Genet.* **18**, 2791–2801 (2009).
333. Fantozzi, I. *et al.* Bone morphogenetic protein-2 upregulates expression and function of voltage-gated K<sup>+</sup> channels in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **291**, (2006).
334. Young, K. A., Ivester, C., West, J., Carr, M. & Rodman, D. M. BMP signaling controls PASMOC KV channel expression in vitro and in vivo. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **290**, (2006).
335. Ekhterae, D. *et al.* Bcl-2 decreases voltage-gated K<sup>+</sup> channel activity and enhances survival in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* **281**, (2001).
336. Harper, R. L., Reynolds, A. M., Bonder, C. S. & Reynolds, P. N. BMPR2 gene therapy for PAH acts via Smad and non-Smad signalling. *Respirology* **21**, 727–733 (2016).
337. Ten Dijke, P. & Arthur, H. M. Extracellular control of TGF $\beta$  signalling in vascular development and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 8 857–869 (2007).
338. Goumans, M. J. & ten Dijke, P. TGF- $\beta$  signaling in control of cardiovascular function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).
339. Goumans, M. J., Zwijsen, A., ten Dijke, P. & Bailly, S. Bone morphogenetic proteins in vascular homeostasis and disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **10**, (2018).

340. Morrell, N. W. *et al.* Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- $\beta$ 1 and bone morphogenetic proteins. *Circulation* **104**, 790–795 (2001).
341. Zaiman, A. L. *et al.* Role of the TGF- $\beta$ /Alk5 signaling pathway in monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 896–905 (2008).
342. Davies, R. J. *et al.* BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF- $\beta$  in pulmonary artery smooth muscle cells: Role of proinflammatory cytokines. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, (2012).
343. Ríos-Vázquez, R., Marzoa-Rivas, R., Gil-Ortega, I. & Kaski, J. C. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  agonists for management and prevention of vascular disease in patients with and without diabetes mellitus. *American Journal of Cardiovascular Drugs* vol. 6 231–242 (2006).
344. Issemann, I. & Green, S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature* **347**, 645–650 (1990).
345. Zhao, Q. H. *et al.* PPAR $\gamma$  forms a bridge between DNA methylation and histone acetylation at the C/EBP $\alpha$  gene promoter to regulate the balance between osteogenesis and adipogenesis of bone marrow stromal cells. *FEBS J.* **280**, 5801–5814 (2013).
346. Chen, Y., Jimenez, A. R. & Medh, J. D. Identification and regulation of novel PPAR- $\gamma$  splice variants in human THP-1 macrophages. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.* **1759**, 32–43 (2006).
347. Ameshima, S. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) expression is decreased in pulmonary hypertension and affects endothelial cell growth. *Circ. Res.* **92**, 1162–1169 (2003).
348. Guignabert, C. *et al.* Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  in mice causes PDGF receptor- $\beta$ -dependent pulmonary arterial muscularization. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **297**, (2009).
349. Hansmann, G. *et al.* An antiproliferative BMP-2/PPAR $\gamma$ /apoE axis in human and murine SMCs and its role in pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **118**, 1846–1857 (2008).
350. Barak, Y. *et al.* PPAR $\gamma$  is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol. Cell* **4**, 585–595 (1999).
351. Martin-Nizard, F. *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit oxidized low-density lipoprotein-induced endothelin-1 secretion in endothelial cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **40**, 822–831 (2002).
352. Calnek, D. S., Mazzella, L., Roser, S., Roman, J. & Hart, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands increase release of nitric oxide from endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **23**, 52–57 (2003).
353. Polikandriotis, J. A., Mazzella, L. J., Rupnow, H. L. & Hart, C. M. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ -dependent mechanisms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **25**, 1810–1816 (2005).
354. Palmer, R. M. J., Ferrige, A. G. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524–526 (1987).
355. Garg, U. C. & Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat

- vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest.* **83**, 1774–1777 (1989).
356. Goetze, S. *et al.* PPAR $\gamma$ -ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **33**, 798–806 (1999).
  357. Law, R. E. *et al.* Expression and function of PPAR $\gamma$  in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation* **101**, 1311–1318 (2000).
  358. Martin, H. Role of PPAR-gamma in inflammation. Prospects for therapeutic intervention by food components. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. 690 57–63 (2010).
  359. Szanto, A. & Nagy, L. The many faces of PPAR $\gamma$ : Anti-inflammatory by any means? *Immunobiology* vol. 213 789–803 (2008).
  360. Li, X. L., Guan, R. J. & Li, J. J. Attenuation of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats by rosuvastatin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **60**, 219–226 (2012).
  361. Crossno, J. T. *et al.* Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **292**, (2007).
  362. Matsuda, Y. *et al.* [Effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats]. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* **43**, 283–288 (2005).
  363. Nisbet, R. E. *et al.* Rosiglitazone attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in a mouse model. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **42**, 482–490 (2010).
  364. Kim, E. K., Lee, J. H., Oh, Y. M., Lee, Y. S. & Lee, S. Do. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Respirology* **15**, 659–668 (2010).
  365. Rosen, C. J. The Rosiglitazone Story — Lessons from an FDA Advisory Committee Meeting. *N. Engl. J. Med.* **357**, 844–846 (2007).
  366. Wilcox, R. *et al.* Effects of pioglitazone in patients with type 2 diabetes with or without previous stroke: Results from PROactive (PROspective pioglitAzone Clinical Trial In macroVascular Events 04). *Stroke* **38**, 865–873 (2007).
  367. Morris, H. E., Neves, K. B., Montezano, A. C., MacLean, M. R. & Touyz, R. M. Notch3 signalling and vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Clinical Science* vol. 133 2481–2498 (2019).
  368. Artavanis-Tsakonas, S., Rand, M. D. & Lake, R. J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development. *Science* vol. 284 770–776 (1999).
  369. Li, X. *et al.* Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* **15**, 1289–1297 (2009).
  370. Alva, J. A. & Iruela-Arispe, M. L. Notch signaling in vascular morphogenesis. *Current Opinion in Hematology* vol. 11 278–283 (2004).
  371. Li, X. *et al.* Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Med.* **15**, 1289–1297 (2009).
  372. Campos, A. H., Wang, W., Pollman, M. J. & Gibbons, G. H. Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: Implications in cell-cycle regulation. *Circ. Res.* **91**, 999–1006 (2002).
  373. Villa, N. *et al.* Vascular expression of Notch pathway receptors and ligands is restricted to arterial vessels. *Mech. Dev.* **108**, 161–164 (2001).
  374. Jin, S. *et al.* Notch signaling regulates platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  expression in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* **102**, 1483–1491 (2008).

375. Price, L. C. *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* vol. 141 210–221 (2012).
376. Kroeze, W., Kristiansen, K. & Roth, B. Molecular Biology of Serotonin Receptors - Structure and Function at the Molecular Level. *Curr. Top. Med. Chem.* **2**, 507–528 (2005).
377. Berger, M., Gray, J. A. & Roth, B. L. The expanded biology of serotonin. *Annual Review of Medicine* vol. 60 355–366 (2009).
378. Sarrouilhe, D. & Mesnil, M. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie* vol. 161 46–50 (2019).
379. Sarrouilhe, D., Clarhaut, J., Defamie, N. & Mesnil, M. Serotonin and Cancer: What Is the Link? *Curr. Mol. Med.* **15**, 62–77 (2015).
380. Dizeyi, N. *et al.* Expression of Serotonin Receptors and Role of Serotonin in Human Prostate Cancer Tissue and Cell Lines. *Prostate* **59**, 328–336 (2004).
381. Launay, J. M. *et al.* Ras involvement in signal transduction by the serotonin 5-HT<sub>2B</sub> receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 3141–3147 (1996).
382. Dizeyi, N. *et al.* Expression of serotonin receptors 2B and 4 in human prostate cancer tissue and effects of their antagonists on prostate cancer cell lines. *Eur. Urol.* **47**, 895–900 (2005).
383. Dizeyi, N. *et al.* Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **29**, 436–445 (2011).
384. Ballou, Y. *et al.* 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. *Mol. Clin. Oncol.* **9**, 243 (2018).
385. Kéréveur, A. *et al.* High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension: Effect of long-term epoprostenol (Prostacyclin) therapy. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **20**, 2233–2239 (2000).
386. Hervé, P. *et al.* Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am. J. Med.* **99**, 249–254 (1995).
387. Le Cras, T. D., Kim, D. H., Markham, N. E. & Abman, S. H. Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver’s altitude. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, (2000).
388. Eddahibi, S. *et al.* Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* **108**, 1141–1150 (2001).
389. Eddahibi, S. *et al.* Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene. *J. Clin. Invest.* **105**, 1555–1562 (2000).
390. Guignabert, C. *et al.* Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **98**, 1323–1330 (2006).
391. Marcos, E. *et al.* Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **168**, 487–493 (2003).
392. Long, L. *et al.* Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ. Res.* **98**, 818–827 (2006).
393. Morecroft, I., Heeley, R. P., Prentice, H. M., Kirk, A. & MacLean, M. R. 5-Hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: Importance of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.* **128**, 730–734 (1999).
394. Keegan, A., Morecroft, I., Smillie, D., Hicks, M. N. & MacLean, M. R. Contribution

- of the 5-HT<sub>1B</sub> receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: Converging evidence using 5-HT<sub>1B</sub>-receptor knockout mice and the 5-HT<sub>1B/1D</sub>-receptor antagonist GR127935. *Circ. Res.* **89**, 1231–1239 (2001).
395. MacLean, M. R. *et al.* 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 917–930 (1996).
  396. Launay, J. M. *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat. Med.* **8**, 1129–1135 (2002).
  397. Cheng, X., Wang, Y. & Du, L. Epigenetic Modulation in the Initiation and Progression of Pulmonary Hypertension. *Hypertension* **74**, 733–739 (2019).
  398. Napoli, C., Benincasa, G. & Loscalzo, J. Epigenetic Inheritance Underlying Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **39**, 653–664 (2019).
  399. Chelladurai, P., Seeger, W. & Pullamsetti, S. S. Epigenetic mechanisms in pulmonary arterial hypertension: The need for global perspectives. *Eur. Respir. Rev.* **25**, 135–140 (2016).
  400. Gamem, E., Seeger, W. & Pullamsetti, S. S. The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension. *Eur. Respir. J.* **48**, 903–917 (2016).
  401. Kim, G. H., Ryan, J. J., Marsboom, G. & Archer, S. L. Epigenetic mechanisms of pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation* vol. 1 347–356 (2011).
  402. Biswas, S. & Rao, C. M. Epigenetic tools (The Writers, The Readers and The Erasers) and their implications in cancer therapy. *European Journal of Pharmacology* vol. 837 8–24 (2018).
  403. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes and Development* vol. 16 6–21 (2002).
  404. Wu, H. & Zhang, Y. Reversing DNA methylation: Mechanisms, genomics, and biological functions. *Cell* vol. 156 45–68 (2014).
  405. Jones, P. A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* vol. 293 1068–1070 (2001).
  406. Esteller, M. Cancer Epigenetics and Methylation. *Science (80-. )*. **297**, 1807d – 1808 (2002).
  407. Baylin, S. B. & Herman, J. G. DNA hypermethylation in tumorigenesis: Epigenetics joins genetics. *Trends in Genetics* vol. 16 168–174 (2000).
  408. Handy, D. E., Castro, R. & Loscalzo, J. Epigenetic modifications: Basic mechanisms and role in cardiovascular disease. *Circulation* **123**, 2145–2156 (2011).
  409. de Smet, C. & Loriot, A. DNA hypomethylation in cancer: Epigenetic scars of a neoplastic journey. *Epigenetics* **5**, 206–213 (2010).
  410. Wild, L. & Flanagan, J. M. Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1806 50–57 (2010).
  411. Ehrlich, M. DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* vol. 1 239–259 (2009).
  412. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: Roles in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* vol. 14 204–220 (2013).
  413. Hautefort, A. *et al.* Pulmonary endothelial cell DNA methylation signature in pulmonary arterial hypertension. *Oncotarget* **8**, 52995–53016 (2017).
  414. Archer, S. L. *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in

- pulmonary arterial hypertension: A basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* **121**, 2661–2671 (2010).
415. Bravard, A. *et al.* SOD2: A new type of tumor-suppressor gene? *Int. J. Cancer* **51**, 476–480 (1992).
  416. Hitchler, M. J., Oberley, L. W. & Domann, F. E. Epigenetic silencing of SOD2 by histone modifications in human breast cancer cells. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 1573–1580 (2008).
  417. Potus, F. *et al.* Novel Mutations and Decreased Expression of the Epigenetic Regulator TET2 in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **141**, 1986–2000 (2020).
  418. Li, E. Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nature Reviews Genetics* vol. 3 662–673 (2002).
  419. Vidanes, G. M., Bonilla, C. Y. & Toczyski, D. P. Complicated tails: Histone modifications and the DNA damage response. *Cell* vol. 121 973–976 (2005).
  420. Polo, S. E. & Almouzni, G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Letters* vol. 220 1–9 (2005).
  421. Peterson, C. L. & Laniel, M. A. Histones and histone modifications. *Current biology : CB* vol. 14 (2004).
  422. Andreoli, F. & Del Rio, A. Physicochemical modifications of histones and their impact on epigenomics. *Drug Discovery Today* vol. 19 1372–1379 (2014).
  423. Bhaumik, S. R., Smith, E. & Shilatifard, A. Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. *Nature Structural and Molecular Biology* vol. 14 1008–1016 (2007).
  424. Wang, Y. *et al.* Epigenetic regulation and its therapeutic potential in pulmonary hypertension. *Frontiers in Pharmacology* vol. 9 241 (2018).
  425. Luna, R. C. P. *et al.* Insights on the epigenetic mechanisms underlying pulmonary arterial hypertension. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **51**, (2018).
  426. Verdone, L., Caserta, M. & Di Mauro, E. Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochemistry and Cell Biology* vol. 83 344–353 (2005).
  427. A, E. & PB, B. Histone acetylation: a switch between repressive and permissive chromatin. Second in review series on chromatin dynamics. *EMBO Rep.* **3**, (2002).
  428. Thiagalingam, S. *et al.* Histone deacetylases: Unique players in shaping the epigenetic histone code. in *Annals of the New York Academy of Sciences* vol. 983 84–100 (New York Academy of Sciences, 2003).
  429. Zentner, G. E. & Henikoff, S. Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural and Molecular Biology* vol. 20 259–266 (2013).
  430. Zhao, L. *et al.* Histone Deacetylation Inhibition in Pulmonary Hypertension. *Circulation* **126**, 455–467 (2012).
  431. Paulin, R. *et al.* Sirtuin 3 deficiency is associated with inhibited mitochondrial function and pulmonary arterial hypertension in rodents and humans. *Cell Metab.* **20**, 827–839 (2014).
  432. Chen, F. *et al.* Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Free Radic. Biol. Med.* **99**, 167–178 (2016).
  433. Boucherat, O. *et al.* HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
  434. Zhao, L. *et al.* Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: Therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid.

- Circulation* **126**, 455–467 (2012).
435. Cantoni, S. *et al.* Sodium butyrate inhibits platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration in pulmonary artery smooth muscle cells through Akt inhibition. *FEBS J.* **280**, 2042–2055 (2013).
  436. Yan, M. S. C., Matouk, C. C. & Marsden, P. A. Epigenetics of the vascular endothelium. *Journal of Applied Physiology* vol. 109 916–926 (2010).
  437. Bannister, A. J. & Kouzarides, T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research* vol. 21 381–395 (2011).
  438. Rea, S. *et al.* Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**, 593–599 (2000).
  439. Murray, K. The Occurrence of  $\epsilon$ -N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* **3**, 10–15 (1964).
  440. Rice, J. C. & Allis, C. D. Code of silence. *Nature* vol. 414 258–261 (2001).
  441. Feng, Q. *et al.* Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr. Biol.* **12**, 1052–1058 (2002).
  442. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics* vol. 13 343–357 (2012).
  443. Huang, J. & Berger, S. L. The emerging field of dynamic lysine methylation of non-histone proteins. *Current Opinion in Genetics and Development* vol. 18 152–158 (2008).
  444. Tsukada, Y. I. *et al.* Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**, 811–816 (2006).
  445. Shi, Y. *et al.* Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* **119**, 941–953 (2004).
  446. Yang, Q., Lu, Z., Singh, D. & Raj, J. U. BIX-01294 treatment blocks cell proliferation, migration and contractility in ovine foetal pulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Prolif.* **45**, 335–344 (2012).
  447. Aljubran, S. A. *et al.* Enhancer of Zeste homolog 2 induces Pulmonary artery Smooth Muscle cell proliferation. *PLoS One* **7**, (2012).
  448. Chen, D. *et al.* Megakaryocytic leukemia 1 directs a Histone H3 lysine 4 methyltransferase complex to regulate hypoxic pulmonary hypertension. *Hypertension* **65**, 821–833 (2015).
  449. Gambaryan, N., Meng, C., Humbert, M., Adcock, I. & Wort, S. H3K27 histone lysine methylation as potential therapeutic target in pulmonary arterial hypertension. (2013).
  450. Chalfie, M. & Au, M. Genetic control of differentiation of the *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons. *Science* **243**, 1027–33 (1989).
  451. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
  452. Wightman, B., Ha, I. & Ruvkun, G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* **75**, 855–862 (1993).
  453. Fire, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806–811 (1998).
  454. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* **14**, 1902–1910 (2004).

455. Hammond, S. M. An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 87 3–14 (2015).
456. Lee, Y. *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 4051–4060 (2004).
457. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
458. Ketting, R. F. *et al.* Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654–2659 (2001).
459. Hutvagner, G. *et al.* A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* (80-. ). **293**, 834–838 (2001).
460. Jackson, A. L. *et al.* Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* **21**, 635–637 (2003).
461. Kehl, T. *et al.* About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget* **8**, 107167–107175 (2017).
462. Ekimler, S. & Sahin, K. Computational methods for microRNA target prediction. *Genes* vol. 5 671–683 (2014).
463. Guttman, M. *et al.* Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**, 223–227 (2009).
464. Mello, C. C. & Conte, D. Revealing the world of RNA interference. *Nature* vol. 431 338–342 (2004).
465. Meister, G. & Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* vol. 431 343–349 (2004).
466. Tomari, Y. & Zamore, P. D. Perspective: Machines for RNAi. *Genes and Development* vol. 19 517–529 (2005).
467. Boucherat, O., Potus, F. & Bonnet, S. MicroRNA and pulmonary hypertension. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 888 237–252 (Springer New York LLC, 2015).
468. Zhou, G., Chen, T. & Usha Raj, J. MicroRNAs in pulmonary arterial hypertension. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* vol. 52 139–151 (2015).
469. Courboulin, A. *et al.* Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* **208**, 535–548 (2011).
470. Rhodes, C. J. *et al.* Reduced microRNA-150 is associated with poor survival in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **187**, 294–302 (2013).
471. Pullamsetti, S. S. *et al.* Inhibition of microRNA-17 improves lung and heart function in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **185**, 409–419 (2012).
472. Sessa, R. & Hata, A. Role of microRNAs in lung development and pulmonary diseases. *Pulmonary Circulation* vol. 3 315–328 (2013).
473. Caruso, P. *et al.* Dynamic changes in lung MicroRNA profiles during the development of pulmonary hypertension due to chronic hypoxia and monocrotaline. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**, 716–723 (2010).
474. Caruso, P. *et al.* A role for miR-145 in pulmonary arterial hypertension: Evidence from mouse models and patient samples. *Circ. Res.* **111**, 290–300 (2012).
475. Hu, S. *et al.* Correction: Nuclear Survivin and Its Relationship to DNA Damage Repair Genes in Non-Small Cell Lung Cancer Investigated Using Tissue Array. *PLoS One* **8**, 74161 (2013).

476. Estephan, L. E. *et al.* Distinct plasma gradients of microRNA-204 in the pulmonary circulation of patients suffering from WHO Groups I and II pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **9**, (2019).
477. Courboulin, A. *et al.* Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J. Exp. Med.* **208**, 535–548 (2011).
478. Li, X. *et al.* MicroRNA-204 as an indicator of severity of pulmonary hypertension in children with congenital heart disease complicated with pulmonary hypertension. *Med. Sci. Monit.* **25**, 10173–10179 (2019).
479. Lee, A. *et al.* Therapeutic implications of microRNAs in pulmonary arterial hypertension. *BMB Reports* vol. 47 311–317 (2014).
480. Mattick, J. S. The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genetics* vol. 5 (2009).
481. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81**, 145–166 (2012).
482. Salviano-Silva, A., Lobo-Alves, S. C., de Almeida, R. C., Malheiros, D. & Petzl-Erler, M. L. Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. *Non-coding RNA* vol. 4 (2018).
483. Carninci, P. *et al.* Molecular biology: The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science (80-. )*. **309**, 1559–1563 (2005).
484. Quinn, J. J. & Chang, H. Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nature Reviews Genetics* vol. 17 47–62 (2016).
485. Cabili, M. N. *et al.* Localization and abundance analysis of human lncRNAs at single-cell and single-molecule resolution. *Genome Biol.* **16**, (2015).
486. Iyer, M. K. *et al.* The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nat. Genet.* **47**, 199–208 (2015).
487. Carlevaro-Fita, J., Rahim, A., Guigó, R., Vardy, L. A. & Johnson, R. Cytoplasmic long noncoding RNAs are frequently bound to and degraded at ribosomes in human cells. *RNA* **22**, 867–882 (2016).
488. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* vol. 43 904–914 (2011).
489. Schmitt, A. M. & Chang, H. Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* vol. 29 452–463 (2016).
490. Jiang, M.-C., Ni, J.-J., Cui, W.-Y., Wang, B.-Y. & Zhuo, W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am. J. Cancer Res.* **9**, 1354–1366 (2019).
491. Barry, G. *et al.* The long non-coding RNA Gomafu is acutely regulated in response to neuronal activation and involved in schizophrenia-associated alternative splicing. *Mol. Psychiatry* **19**, 486–494 (2014).
492. Zhang, H. *et al.* Long noncoding RNA Hoxaas3 contributes to hypoxia-induced pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc. Res.* **115**, 647–657 (2018).
493. Gong, J. *et al.* Long non-coding RNA CASC2 suppresses pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and phenotypic switch in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Respir. Res.* **20**, 53 (2019).
494. Su, H. *et al.* LncRNA H19 promotes the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells through AT1R via sponging let-7b in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* **19**, (2018).
495. Han, B., Bu, P., Meng, X. & Hou, X. Microarray profiling of long non-coding RNAs

- associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Exp. Ther. Med.* **13**, 2657–2666 (2017).
496. Jandl, K. *et al.* Long non-coding RNAs influence the transcriptome in pulmonary arterial hypertension: the role of PAXIP1-AS1. *J. Pathol.* **247**, 357–370 (2019).
  497. Liu, L. *et al.* The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc. Res.* **111**, 56–65 (2016).
  498. Viereck, J. *et al.* Targeting muscle-enriched long non-coding RNA H19 reverses pathological cardiac hypertrophy. *Eur. Heart J.* **41**, 3462–3474 (2020).
  499. Luo, M. *et al.* Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett.* **333**, 213–221 (2013).
  500. Li, X., Lin, Y., Yang, X., Wu, X. & He, X. Long noncoding RNA H19 regulates EZH2 expression by interacting with miR-630 and promotes cell invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **473**, 913–919 (2016).
  501. White, M. E., Fenger, J. M. & Carson, W. E. Emerging roles of and therapeutic strategies targeting BRD4 in cancer. *Cellular Immunology* vol. 337 48–53 (2019).
  502. Donati, B., Lorenzini, E. & Ciarrocchi, A. BRD4 and Cancer: Going beyond transcriptional regulation. *Molecular Cancer* vol. 17 1–13 (2018).
  503. Penas, C. *et al.* Time series modeling of cell cycle exit identifies Brd4 dependent regulation of cerebellar neurogenesis. *Nat. Commun.* **10**, 1–11 (2019).
  504. Yang, Z., He, N. & Zhou, Q. Brd4 Recruits P-TEFb to Chromosomes at Late Mitosis To Promote G1 Gene Expression and Cell Cycle Progression. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 967–976 (2008).
  505. Khan, Y. M., Kirkham, P., Barnes, P. J. & Adcock, I. M. Brd4 is essential for IL-1 $\beta$ -induced inflammation in human airway epithelial cells. *PLoS One* **9**, (2014).
  506. Marazzi, I., Greenbaum, B. D., Low, Di. H. P. & Guccione, E. Chromatin dependencies in cancer and inflammation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 19 245–261 (2018).
  507. Grivennikov, S. I. & Karin, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. *Current Opinion in Genetics and Development* vol. 20 65–71 (2010).
  508. Andrieu, G. P. *et al.* BET proteins in abnormal metabolism, inflammation, and the breast cancer microenvironment. *Journal of Leukocyte Biology* vol. 104 265–274 (2018).
  509. Deeney, J. T., Belkina, A. C., Shirihai, O. S., Corkey, B. E. & Denis, G. V. BET Bromodomain proteins Brd2, Brd3 and Brd4 selectively regulate metabolic pathways in the pancreatic  $\beta$ -cell. *PLoS One* **11**, (2016).
  510. French, C. A. Small-Molecule Targeting of BET Proteins in Cancer. in *Advances in Cancer Research* vol. 131 21–58 (Academic Press Inc., 2016).
  511. Meloche, J. *et al.* Bromodomain-containing protein 4: The epigenetic origin of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* **117**, 525–535 (2015).
  512. Li, X. *et al.* BRD4 Promotes DNA Repair and Mediates the Formation of TMPRSS2-ERG Gene Rearrangements in Prostate Cancer. *Cell Rep.* **22**, 796–808 (2018).
  513. Duan, Y. *et al.* Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders. *MedChemComm* vol. 9 1779–1802 (2018).
  514. Stathis, A. & Bertoni, F. BET proteins as targets for anticancer treatment. *Cancer Discovery* vol. 8 24–36 (2018).
  515. Kanno, S., Wu, Y. J. L., Lee, P. C., Billiar, T. R. & Ho, C. Angiotensin-converting

- enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation* **104**, 945–950 (2001).
516. Van Der Feen, D. E. *et al.* Multicenter preclinical validation of BET inhibition for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **200**, 910–920 (2019).
  517. Mumby, S. *et al.* Bromodomain and extra-terminal protein mimic JQ1 decreases inflammation in human vascular endothelial cells: Implications for pulmonary arterial hypertension. *Respirology* **22**, 157–164 (2017).
  518. Alberts, B. *et al.* The Mitochondrion. (2002).
  519. Osellame, L. D., Blacker, T. S. & Duchen, M. R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism* vol. 26 711–723 (2012).
  520. Cooper, G. M. Mitochondria. (2000).
  521. Brand, M. D., Orr, A. L., Perevoshchikova, I. V. & Quinlan, C. L. The role of mitochondrial function and cellular bioenergetics in ageing and disease. *Br. J. Dermatol.* **169**, 1–8 (2013).
  522. Pizzorno, J. Mitochondria-Fundamental to Life and Health. *Integr. Med. (Encinitas)*. **13**, 8–15 (2014).
  523. Dromparis, P. & Michelakis, E. D. Mitochondria in vascular health and disease. *Annual Review of Physiology* vol. 75 95–126 (2013).
  524. Ward, P. S. & Thompson, C. B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. *Cancer Cell* vol. 21 297–308 (2012).
  525. Sutendra, G. & Michelakis, E. D. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab.* **19**, 558–573 (2014).
  526. Bonnet, S. *et al.* A Mitochondria-K<sup>+</sup> Channel Axis Is Suppressed in Cancer and Its Normalization Promotes Apoptosis and Inhibits Cancer Growth. *Cancer Cell* **11**, 37–51 (2007).
  527. Chen, L. B. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annual Review of Cell Biology* vol. 4 155–181 (1988).
  528. Warburg, O. À propos du métabolisme des cellules cancéreuses. *Biochem Z* (1924).
  529. Warburg, O. On the origin of cancer cells. *Science (80-. )*. **123**, 309–314 (1956).
  530. Heiden, M. G. V., Cantley, L. C. & Thompson, C. B. Understanding the warburg effect: The metabolic requirements of cell proliferation. *Science* vol. 324 1029–1033 (2009).
  531. Tuder, R. M., Davis, L. A. & Graham, B. B. Targeting energetic metabolism: A new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol. 185 260–266 (2012).
  532. Archer, S. L., Weir, E. K. & Wilkins, M. R. Basic science of pulmonary arterial hypertension for clinicians: New concepts and experimental therapies. *Circulation* vol. 121 2045–2066 (2010).
  533. Dromparis, P., Sutendra, G. & Michelakis, E. D. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodeling. *Journal of Molecular Medicine* vol. 88 1003–1010 (2010).
  534. Antico Arciuch, V. G., Elguero, M. E., Poderoso, J. J. & Carreras, M. C. Mitochondrial regulation of cell cycle and proliferation. *Antioxid. Redox Signal.* **16**, 1150–1180 (2012).

535. Jiang, X. & Wang, X. Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annual Review of Biochemistry* vol. 73 87–106 (2004).
536. Intengan, H. D. & Schiffrin, E. L. Vascular remodeling in hypertension: roles of apoptosis, inflammation, and fibrosis. *Hypertension* vol. 38 581–587 (2001).
537. Rabinovitch, M., Guignabert, C., Humbert, M. & Nicolls, M. R. Inflammation and immunity in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* **115**, 165–175 (2014).
538. Miyata, M. *et al.* Pulmonary hypertension in rats: 2. Role of interleukin-6. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**, 287–291 (1995).
539. Golembeski, S. M., West, J., Tada, Y. & Fagan, K. A. Interleukin-6 mild pulmonary hypertension and augments hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. in *Chest* vol. 128 572S-573S (American College of Chest Physicians, 2005).
540. Kawanishi, S., Ohnishi, S., Ma, N., Hiraku, Y. & Murata, M. Crosstalk between DNA damage and inflammation in the multiple steps of carcinogenesis. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 18 (2017).
541. Kidane, D. *et al.* Interplay between DNA repair and inflammation, and the link to cancer. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* vol. 49 116–139 (2014).
542. Savai, R. *et al.* Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 897–908 (2012).
543. Marsh, L. M. *et al.* The inflammatory cell landscape in the lungs of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **51**, (2018).
544. Mauad, T. *et al.* Immunopathological aspects of schistosomiasis-associated pulmonary arterial hypertension. *Elsevier*.
545. Holmes, A., Soon, E., Southwood, M., Circulation, R. M.- & 2010, undefined. ELEVATED LEVELS OF INFLAMMATORY CYTOKINES ARE STRONG PREDICTORS OF SURVIVAL IN IDIOPATHIC AND FAMILIAL PULMONARY ARTERIAL. *oak.novartis.com*.
546. Nishimura, T. *et al.* 40-O-(2-Hydroxyethyl)-rapamycin attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **163**, 498–502 (2001).
547. Okawa-Takatsuji, M. *et al.* Up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), endothelial leucocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) and class II MHC molecules on pulmonary artery endothelial cells by antibodies against U1-ribonucleoprotein. *Clin. Exp. Immunol.* **116**, 174–180 (1999).
548. Moatti, D. *et al.* Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* **97**, 1925–1928 (2001).
549. McDermott, D. H. *et al.* Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ. Res.* **89**, 401–407 (2001).
550. Kumar, Y., Bhatia, A. & Minz, R. W. Antinuclear antibodies and their detection methods in diagnosis of connective tissue diseases: A journey revisited. *Diagn. Pathol.* **4**, 1 (2009).
551. Mikolajczyk, T. P. *et al.* Role of chemokine RANTES in the regulation of perivascular inflammation, T-cell accumulation, and vascular dysfunction in hypertension. *FASEB J.* **30**, 1987–1999 (2016).

552. Dorfmueller, P., Perros, F., Balabanian, K. & Humbert, M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* **22**, 358–363 (2003).
553. Dorfmueller, P. *et al.* Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **165**, 534–539 (2002).
554. Sanchez, O. *et al.* Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **176**, 1041–1047 (2007).
555. Isern, R. A. *et al.* Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: Association with anti-Ku. *Am. J. Med.* **93**, 307–312 (1992).
556. Kopelman, R. G. & Zolla-Pazner, S. Association of human immunodeficiency virus infection and autoimmune phenomena. *Am. J. Med.* **84**, 82–88 (1988).
557. 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).
558. Emer, J. J. & Wolinsky, C. Rituximab: A review of dermatological applications. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* **2**, 29–37 (2009).
559. Bowers, R. *et al.* Oxidative Stress in Severe Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **169**, 764–769 (2004).
560. Archer, S. L., Nelson, D. P. & Weir, E. K. Detection of activated O<sub>2</sub> species in vitro and in rat lungs by chemiluminescence. *J. Appl. Physiol.* **67**, 1912–1921 (1989).
561. Taniyama, Y. & Griendling, K. K. Reactive Oxygen Species in the Vasculature: Molecular and Cellular Mechanisms. *Hypertension* vol. 42 1075–1081 (2003).
562. Burton, G. J. & Jauniaux, E. Oxidative stress. *Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology* vol. 25 287–299 (2011).
563. Liguori, I. *et al.* Oxidative stress, aging, and diseases. *Clinical Interventions in Aging* vol. 13 757–772 (2018).
564. Pizzino, G. *et al.* Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* vol. 2017 (2017).
565. DeMarco, V. G. *et al.* Oxidative stress contributes to pulmonary hypertension in the transgenic (mRen2)<sup>27</sup> rat. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **294**, (2008).
566. Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassègue, B. & Ushio-Fukai, M. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* vol. 20 2175–2183 (2000).
567. Reis, G. S. *et al.* Oxidative-stress biomarkers in patients with pulmonary hypertension. *Pulm. Circ.* **3**, 856–861 (2013).
568. Sanders, K. A. & Hoidal, J. R. The NOX on pulmonary hypertension. *Circulation Research* vol. 101 224–226 (2007).
569. Spiekermann, S., Schenk, K. & Hoeper, M. M. Increased xanthine oxidase activity in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal* vol. 34 276 (2009).
570. Vitry, G. *et al.* Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* rccm.202003-0627OC (2020) doi:10.1164/rccm.202003-0627OC.
571. Nakabeppu, Y. Cellular levels of 8-oxoguanine in either DNA or the nucleotide pool play pivotal roles in carcinogenesis and survival of cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 15 12543–12557 (2014).

572. Boucherat, O. *et al.* Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **198**, 90–103 (2018).
573. Patel, A. *et al.* MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene* **34**, 2586–2596 (2015).
574. Suzuki, Y. J. *et al.* Activation of GATA-4 by serotonin in pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 17525–17531 (2003).
575. Lee, S. L., Wang, W. W. & Fanburg, B. L. Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* **24**, 855–858 (1998).
576. Wedgwood, S., Dettman, R. W. & Black, S. M. ET-1 stimulates pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation via induction of reactive oxygen species. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **281**, (2001).
577. Park, A. M. *et al.* Pulmonary hypertension-induced GATA4 activation in the right ventricle. *Hypertension* **56**, 1145–1151 (2010).
578. Liu, L., Marcocci, L., Wong, C. M., Park, A. M. & Suzuki, Y. J. Serotonin-mediated protein carbonylation in the right heart. *Free Radic. Biol. Med.* **45**, 847–854 (2008).
579. Redout, E. M. *et al.* Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc. Res.* **75**, 770–781 (2007).
580. Redout, E. M. *et al.* Antioxidant treatment attenuates pulmonary arterial hypertension-induced heart failure. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **298**, (2010).
581. Csiszar, A. *et al.* Resveratrol prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hypertension* **54**, 668–675 (2009).
582. Kamezaki, F. *et al.* Gene transfer of extracellular superoxide dismutase ameliorates pulmonary hypertension in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **177**, 219–226 (2008).
583. Jackson, S. P. & Bartek, J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* vol. 461 1071–1078 (2009).
584. Kawanishi, S., Hiraku, Y., Pinlaor, S. & Ma, N. Oxidative and nitrative DNA damage in animals and patients with inflammatory diseases in relation to inflammation-related carcinogenesis. *Biological chemistry* vol. 387 365–372 (2006).
585. Barzilai, A. & Yamamoto, K. I. DNA damage responses to oxidative stress. *DNA Repair* vol. 3 1109–1115 (2004).
586. Salmon, T. B., Evert, B. A., Song, B. & Doetsch, P. W. Biological consequences of oxidative stress-induced DNA damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3712–3723 (2004).
587. Rastogi, R. P., Richa, Kumar, A., Tyagi, M. B. & Sinha, R. P. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *Journal of Nucleic Acids* vol. 2010 32 (2010).
588. Chatterjee, N. & Walker, G. C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environmental and Molecular Mutagenesis* vol. 58 235–263 (2017).
589. Harper, J. W. & Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell* vol. 28 739–745 (2007).
590. Meloche, J. *et al.* Role for DNA Damage Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **129**, 786–797 (2014).
591. Amé, J. C., Spenlehauer, C. & De Murcia, G. The PARP superfamily. *BioEssays* vol. 26 882–893 (2004).
592. Bouchard, V. J., Rouleau, M. & Poirier, G. G. PARP-1, a determinant of cell survival

- in response to DNA damage. in *Experimental Hematology* vol. 31 446–454 (Elsevier Inc., 2003).
593. Schiewer, M. J. & Knudsen, K. E. Transcriptional roles of PARP1 in cancer. *Molecular Cancer Research* vol. 12 1069–1080 (2014).
  594. Chaitanya, G. V., Alexander, J. S. & Babu, P. P. PARP-1 cleavage fragments: Signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. *Cell Communication and Signaling* vol. 8 31 (2010).
  595. Hanzlikova, H. *et al.* The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication. *Mol. Cell* **71**, 319-331.e3 (2018).
  596. Johnson, Z., Venters, J., Guarraci, F. A. & Zewail-Foote, M. Methamphetamine induces DNA damage in specific regions of the female rat brain. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **42**, 570–575 (2015).
  597. Andrezza, A. C. *et al.* Effects of mood stabilizers on DNA damage in an animal model of mania. *J. Psychiatry Neurosci.* **33**, 516–524 (2008).
  598. Gonçalves, C. L. *et al.* Effects of acute and chronic administration of fenproporex on DNA damage parameters in young and adult rats. *Mol. Cell. Biochem.* **380**, 171–176 (2013).
  599. Sadoughi, A. *et al.* Use of selective serotonin reuptake inhibitors and outcomes in pulmonary arterial hypertension. *Chest* **144**, 531–541 (2013).
  600. Bueno-Beti, C., Sassi, Y., Hajjar, R. J. & Hadri, L. Pulmonary artery hypertension model in rats by monocrotaline administration. in *Methods in Molecular Biology* vol. 1816 233–241 (Humana Press Inc., 2018).
  601. Huang, J., Wolk, J. H., Gewitz, M. H. & Mathew, R. Progressive endothelial cell damage in an inflammatory model of pulmonary hypertension. *Exp. Lung Res.* **36**, 57–66 (2010).
  602. Kay, J. M., Harris, P. & Heath, D. Pulmonary hypertension produced in rats by ingestion of *Crotalaria spectabilis* seeds. *Thorax* **22**, 176–179 (1967).
  603. Rosenberg, H. C. & Rabinovitch, M. Endothelial injury and vascular reactivity in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **255**, (1988).
  604. Gomez-Arroyo, J. G. *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 302 (2012).
  605. Wilson, D. W., Segall, H. J., Pan, L. C. W. & Dunston, S. K. Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc. Res.* **38**, 57–80 (1989).
  606. Copple, B. L. *et al.* Modes of Cell Death in Rat Liver after Monocrotaline Exposure. (2004) doi:10.1093/toxsci/kfh011.
  607. Lai, Y. L., Olson, J. W. & Gillespie, M. N. Ventilatory dysfunction precedes pulmonary vascular changes in monocrotaline-treated rats. *J. Appl. Physiol.* **70**, 561–566 (1991).
  608. Urboniene, D., Haber, I., Fang, Y. H., Thenappan, T. & Archer, S. L. Validation of high-resolution echocardiography and magnetic resonance imaging vs. high-fidelity catheterization in experimental pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **299**, (2010).
  609. Stenmark, K. R., Meyrick, B., Galie, N., Mooi, W. J. & McMurtry, I. F. Animal

- models of pulmonary arterial hypertension: The hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 297 (2009).
610. DeLeve, L. D. *et al.* Characterization of a reproducible rat model of hepatic veno-occlusive disease. *Hepatology* **29**, 1779–1791 (1999).
  611. TARASEVICIENE-STEWARD, L. *et al.* Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* **15**, 427–438 (2001).
  612. Jayasekera, G. *et al.* Longitudinal cardiac changes in a SUGEN/Hypoxic Rat Model of Pulmonary Hypertension determined by Cardiac MRI. in *European Respiratory Journal* vol. 50 PA2383 (European Respiratory Society (ERS), 2017).
  613. Raymond, S. L. & Dodds, W. J. Characterization of the fawn-hooded rat as a model for hemostatic studies. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **33**, 361–369 (1975).
  614. Kuijpers, M. H. M. & Gruys, E. Spontaneous hypertension and hypertensive renal disease in the fawn-hooded rat. *Br. J. Exp. Pathol.* **65**, 181–190 (1984).
  615. Kuijpers, M. H. M., Provoost, A. P. & de Jong, W. DEVELOPMENT OF HYPERTENSION AND PROTEINURIA WITH AGE IN FAWN-HOODED RATS. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **13**, 201–209 (1986).
  616. Bonnet, S. *et al.* An Abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: Similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630–2641 (2006).
  617. Archer, S. L. *et al.* Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: A basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* **121**, 2661–2671 (2010).
  618. Fukai, T. & Ushio-Fukai, M. Superoxide dismutases: Role in redox signaling, vascular function, and diseases. *Antioxidants and Redox Signaling* vol. 15 1583–1606 (2011).
  619. Rehman, J. & Archer, S. L. A proposed mitochondrial-metabolic mechanism for initiation and maintenance of pulmonary arterial hypertension in fawn-hooded rats: The warburg model of pulmonary arterial hypertension. in *Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 661 171–185 (Adv Exp Med Biol, 2010).
  620. Le Cras, T. D., Kim, D. H., Markham, N. E. & Abman, S. H. Early abnormalities of pulmonary vascular development in the Fawn-Hooded rat raised at Denver's altitude. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **279**, (2000).
  621. Le Cras, T. D. *et al.* Abnormal lung growth and the development of pulmonary hypertension in the Fawn-Hooded rat. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **277**, (1999).
  622. Hong, K. H. *et al.* Genetic ablation of the Bmpr2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **118**, 722–730 (2008).
  623. Gomez-Arroyo, J. *et al.* A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: Problems and prospects. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* vol. 302 (2012).
  624. Johnson, J. A. *et al.* Cytoskeletal defects in Bmpr2-associated pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **302**, L474–L484 (2012).
  625. Majka, S. *et al.* Physiologic and molecular consequences of endothelial Bmpr2 mutation. *Respir. Res.* **12**, 84 (2011).

626. Beppu, H. *et al.* BMPR-II heterozygous mice have mild pulmonary hypertension and an impaired pulmonary vascular remodeling response to prolonged hypoxia. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **287**, (2004).
627. Yasuda, T., Tada, Y., Tanabe, N., Tatsumi, K. & West, J. Rho-kinase inhibition alleviates pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative type II bone morphogenetic protein receptor gene. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **301**, (2011).
628. Hautefort, A. *et al.* Bmpr2 Mutant Rats Develop Pulmonary and Cardiac Characteristics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation* **139**, 932–948 (2019).
629. Machado, R. D. *et al.* Genetics and Genomics of Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 54 (2009).
630. Pfarr, N. *et al.* Hemodynamic and clinical onset in patients with hereditary pulmonary arterial hypertension and BMPR2 mutations. *Respir. Res.* **12**, (2011).
631. Pousada, G., Baloira, A., Vilariño, C., Cifrian, J. M. & Valverde, D. Novel mutations in BMPR2, ACVRL1 and KCNA5 genes and hemodynamic parameters in patients with pulmonary arterial hypertension. *PLoS One* **9**, (2014).
632. Maarman, G., Lecour, S., Butrous, G., Thienemann, F. & Sliwa, K. A comprehensive review: The evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary Circulation* vol. 3 739–756 (2013).
633. Graham, B. B. *et al.* Schistosomiasis-induced experimental pulmonary hypertension: Role of interleukin-13 signaling. *Am. J. Pathol.* **177**, 1549–1561 (2010).
634. Crosby, A. *et al.* Pulmonary vascular remodeling correlates with lung eggs and cytokines in murine schistosomiasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **181**, 279–288 (2010).
635. Crosby, A. *et al.* Praziquantel reverses pulmonary hypertension and vascular remodeling in murine schistosomiasis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **184**, 467–473 (2011).
636. Steiner, M. K. *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* **104**, 236–244 (2009).
637. Tuder, R. M., Groves, B., Badesch, D. B. & Voelkel, N. F. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am. J. Pathol.* **144**, 275–285 (1994).
638. Furuya, Y., Satoh, T. & Kuwana, M. Interleukin-6 as a potential therapeutic target for pulmonary arterial hypertension. *International Journal of Rheumatology* vol. 2010 (2010).
639. MacLean, M. R. *et al.* Overexpression of the 5-Hydroxytryptamine Transporter Gene: Effect on Pulmonary Hemodynamics and Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. *Circulation* **109**, 2150–2155 (2004).
640. Dempsie, Y. & MacLean, M. R. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br. J. Pharmacol.* **155**, 455–462 (2008).
641. Fuso, L., Baldi, F. & Di Perna, A. Therapeutic strategies in pulmonary hypertension. *Front. Pharmacol.* **APR**, (2011).
642. Humbert, M., Sitbon, O. & Simonneau, G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *New England Journal of Medicine* vol. 351 (2004).
643. Hirschrift, T., Steiner, M. K. & Hill, N. S. Transitions and Combination Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension. in *Pulmonary Hypertension* 337–362 (Humana

- Press, 2008). doi:10.1007/978-1-60327-075-5\_16.
644. Mereles, D. *et al.* Exercise and respiratory training improve exercise capacity and quality of life in patients with severe chronic pulmonary hypertension. *Circulation* **114**, 1482–1489 (2006).
  645. Barst, R. J. *et al.* Updated Evidence-Based Treatment Algorithm in Pulmonary Arterial Hypertension. *Journal of the American College of Cardiology* vol. 54 S78 (2009).
  646. Gabbay, E., Fraser, J. & McNeil, K. Review of bosentan in the management of pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk Management* vol. 3 887–900 (2007).
  647. Rivera-Lebron, B. N. & Risbano, M. G. Ambrisentan: A review of its use in pulmonary arterial hypertension. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease* vol. 11 233–244 (2017).
  648. Kholdani, C. A., Fares, W. H. & Trow, T. K. Macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *Vascular Health and Risk Management* vol. 10 665–673 (2014).
  649. Channick, R. N. *et al.* Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: A randomised placebo-controlled study. *Lancet* **358**, 1119–1123 (2001).
  650. Rubin, L. J. *et al.* Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **346**, 896–903 (2002).
  651. Pulido, T. *et al.* Macitentan and morbidity and mortality in pulmonary arterial hypertension. *N. Engl. J. Med.* **369**, 809–818 (2013).
  652. Badesch, D. B. *et al.* ARIES-3: Ambrisentan Therapy in a Diverse Population of Patients with Pulmonary Hypertension. *Cardiovasc. Ther.* **30**, 93–99 (2012).
  653. Kaneko, F. T. *et al.* Biochemical reaction products of nitric oxide as quantitative markers of primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158**, 917–923 (1998).
  654. Fagan, K. A. *et al.* Relative contributions of endothelial, inducible, and neuronal NOS to tone in the murine pulmonary circulation. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **277**, (1999).
  655. Girgis, R. E. *et al.* Decreased exhaled nitric oxide in pulmonary arterial hypertension: Response to Bosentan therapy. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **172**, 352–357 (2005).
  656. Ghosh, S. *et al.* Phosphorylation inactivation of endothelial nitric oxide synthesis in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **310**, L1199–L1205 (2016).
  657. Henrie, A. M., Nawarskas, J. J. & Anderson, J. R. Clinical utility of tadalafil in the treatment of pulmonary arterial hypertension: An evidence-based review. *Core Evid.* **10**, 99–108 (2015).
  658. Fogue, S. T. *et al.* Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **61**, 280–288 (2006).
  659. Frantz, R. P. *et al.* Conversion from sildenafil to tadalafil: Results from the sildenafil to tadalafil in pulmonary arterial hypertension (SITAR) study. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **19**, 550–557 (2014).
  660. Tay, E. L. W., Geok-Mui, M. K., Poh-Hoon, M. C. & Yip, J. Sustained benefit of tadalafil in patients with pulmonary arterial hypertension with prior response to sildenafil: A case series of 12 patients. *Int. J. Cardiol.* **125**, 416–417 (2008).

661. Singh, T. S., Kumar, D., Basu, S., Panja, M. & Mitra, B. Tadalafil in the management of severe pulmonary artery hypertension. *Indian Heart J.* **58**, 52–3.
662. de Carvalho, A. C. *et al.* Tadalafil as treatment for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Arq. Bras. Cardiol.* **87**, e195-7 (2006).
663. Affuso, F., Palmieri, E. A., Di Conza, P., Guardasole, V. & Fazio, S. Tadalafil improves quality of life and exercise tolerance in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Int. J. Cardiol.* **108**, 429–431 (2006).
664. Palmieri, E. A., Affuso, F., Fazio, S. & Lembo, D. Tadalafil in primary pulmonary arterial hypertension [5]. *Annals of Internal Medicine* vol. 141 743–744 (2004).
665. Christie, J. D. *et al.* The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Twenty-seventh official adult lung and heart-lung transplant report 2010. *J. Hear. Lung Transplant.* **29**, 1104–1118 (2010).
666. Higenbottam, T., Wells, F., Wheeldon, D. & Wallwork, J. LONG-TERM TREATMENT OF PRIMARY PULMONARY HYPERTENSION WITH CONTINUOUS INTRAVENOUS EPOPROSTENOL (PROSTACYCLIN). *Lancet* **323**, 1046–1047 (1984).
667. Barst, R. J. *et al.* A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *New England Journal of Medicine* vol. 334 296–300 (1996).
668. Wharton, J. *et al.* Prostacyclin analogues differentially inhibit growth of distal and proximal human pulmonary artery smooth muscle cells. *Circulation* **102**, 3130–3136 (2000).
669. Sitbon, O. *et al.* Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: Prognostic factors and survival. *J. Am. Coll. Cardiol.* **40**, 780–788 (2002).
670. 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).
671. Sitbon, O. *et al.* Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **111**, 3105–3111 (2005).
672. Skhiri, M., Hunt, S. A., Denault, A. Y. & Haddad, F. [Evidence-based management of right heart failure: a systematic review of an empiric field]. *Rev. Esp. Cardiol.* **63**, 451–471 (2010).
673. Beuschlein, F. Regulation of aldosterone secretion: From physiology to disease. *European Journal of Endocrinology* vol. 168 (2013).
674. Santos, R. A. S., Ferreira, A. J. & Simões E Silva, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. *Experimental Physiology* vol. 93 519–527 (2008).
675. Briet, M. & Schiffrin, E. L. Aldosterone: Effects on the kidney and cardiovascular system. *Nature Reviews Nephrology* vol. 6 261–273 (2010).
676. De Man, F. S. *et al.* Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 780–789 (2012).
677. Vassilatis, D. K. *et al.* The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 4903–4908 (2003).
678. Wallukat, G. The  $\beta$ -adrenergic receptors. *Herz* vol. 27 683–690 (2002).
679. Brodde, O. E. & Michel, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* **51**, 651–690 (1999).

680. Zhao, M. *et al.* Cardiac pressure overload hypertrophy is differentially regulated by  $\beta$ -adrenergic receptor subtypes. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **301**, H1461 (2011).
681. Bristow, M. R. *et al.* Decreased Catecholamine Sensitivity and  $\beta$ -Adrenergic-Receptor Density in Failing Human Hearts. *N. Engl. J. Med.* **307**, 205–211 (1982).
682. Packer, M. *et al.* The Effect of Carvedilol on Morbidity and Mortality in Patients with Chronic Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **334**, 1349–1355 (1996).
683. DiNicolantonio, J. J. *et al.*  $\beta$ -Blockers in hypertension, diabetes, heart failure and acute myocardial infarction: a review of the literature. *Open Hear.* **2**, e000230 (2015).
684. Hjalmarson, Å., Goldstein, S., Fagerberg, B., Jama, H. W.- & 2000, undefined. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention. *jamanetwork.com*.
685. Packer, M. *et al.* Effect of Carvedilol on Survival in Severe Chronic Heart Failure. *N. Engl. J. Med.* **344**, 1651–1658 (2001).
686. Bogaard, H. J. *et al.* Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **182**, 652–660 (2010).
687. Grinnan, D. *et al.* Treatment of group I pulmonary arterial hypertension with carvedilol is safe. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* vol. 189 1562–1564 (2014).
688. Konstam, M. A. *et al.* Vasodilator effect on right ventricular function in congestive heart failure and pulmonary hypertension: End-systolic pressure-volume relation. *Am. J. Cardiol.* **54**, 132–136 (1984).
689. Rossaint, R. *et al.* Effects of inhaled nitric oxide on right ventricular function in severe acute respiratory distress syndrome. *Intensive Care Med.* **21**, 197–203 (1995).
690. Packer, M., Medina, N. & Yushak, M. Adverse hemodynamic and clinical effects of calcium channel blockade in pulmonary hypertension secondary to obliterative pulmonary vascular disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* **4**, 890–901 (1984).
691. Pedersen, B. K. Anti-inflammatory effects of exercise: role in diabetes and cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Investigation* vol. 47 600–611 (2017).
692. Arena, R., Cahalin, L. P., Borghi-Silva, A. & Myers, J. The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension. *Prog. Cardiovasc. Dis.* **57**, 480–488 (2015).
693. Buys, R., Avila, A. & Cornelissen, V. A. Exercise training improves physical fitness in patients with pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of controlled trials. *BMC Pulm. Med.* **15**, (2015).
694. Babu, A. S., Padmakumar, R., Maiya, A. G., Mohapatra, A. K. & Kamath, R. L. Effects of Exercise Training on Exercise Capacity in Pulmonary Arterial Hypertension: A Systematic Review of Clinical Trials. *Heart Lung and Circulation* vol. 25 333–341 (2016).
695. Harbaum, L. *et al.* Acute effects of exercise on the inflammatory state in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *BMC Pulm. Med.* **16**, (2016).
696. Handoko, M. L. *et al.* Opposite effects of training in rats with stable and progressive pulmonary hypertension. *Circulation* **120**, 42–49 (2009).
697. Brown, M. B. *et al.* High-intensity interval training, but not continuous training,

- reverses right ventricular hypertrophy and dysfunction in a rat model of pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* **312**, R197–R210 (2017).
698. Chia, K. S. W. *et al.* Randomised controlled trial examining the effect of an outpatient exercise training programme on haemodynamics and cardiac MR parameters of right ventricular function in patients with pulmonary arterial hypertension: The ExPAH study protocol. *BMJ Open* **7**, (2017).
699. Vecchia, L. A. D. & Bussotti, M. Exercise training in pulmonary arterial hypertension. *Journal of Thoracic Disease* vol. 10 508–521 (2018).
700. Morris, N. R., Kermeen, F. D. & Holland, A. E. Exercise-based rehabilitation programmes for pulmonary hypertension. *Cochrane Database of Systematic Reviews* vol. 2017 (2017).
701. Zhang, X. & Xu, D. Effects of exercise rehabilitation training on patients with pulmonary hypertension. *Pulmonary Circulation* vol. 10 1–8 (2020).
702. Zhu, J. H. *et al.* Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: Open-label pilot study. *Pediatr. Transplant.* **12**, 650–655 (2008).
703. Ding, X. F. *et al.* Efficacy of stem cell therapy for pulmonary arterial hypertension: A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. *Stem Cell Research and Therapy* vol. 10 (2019).
704. Granton, J. *et al.* Endothelial NO-Synthase Gene-Enhanced Progenitor Cell Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension: The PHACeT Trial. *Circ. Res.* **117**, 645–654 (2015).
705. Voelkel, N. F. *et al.* Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. in *Chest* vol. 114 225S–230S (American College of Chest Physicians, 1998).
706. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–74 (2011).
707. Guignabert, C. *et al.* Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: Lessons from cancer. *European Respiratory Review* vol. 22 543–551 (2013).
708. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer. *Cell* vol. 100 57–70 (2000).
709. Boucherat, O. *et al.* The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary Circulation* vol. 7 285–299 (2017).
710. Guignabert, C. *et al.* Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: Lessons from cancer. *Eur. Respir. Rev.* **22**, 543–551 (2013).
711. Yamaguchi, H. & Hung, M. C. Regulation and role of EZH2 in cancer. *Cancer Res. Treat.* **46**, 209–222 (2014).
712. Kim, K. H. & Roberts, C. W. M. Targeting EZH2 in cancer. *Nature Medicine* vol. 22 128–134 (2016).
713. Delgado-Olguín, P. *et al.* Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nature Genetics* vol. 44 343–347 (2012).
714. Tan, J. Z., Yan, Y., Wang, X. X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2: Biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 35 161–174 (2014).
715. Cao, R. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science (80-. )*. **298**, 1039–1043 (2002).
716. Müller, J. *et al.* Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* **111**, 197–208 (2002).
717. Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. & Reinberg, D.

- Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein. *Genes Dev.* **16**, 2893–2905 (2002).
718. Moritz, L. E. & Trievel, R. C. Structure and Function of PRC2 1 Structure, Mechanism, and Regulation of Polycomb Repressive Complex 2. (2017) doi:10.1074/jbc.R117.800367.
719. Simon, J. A. & Lange, C. A. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. 647 21–29 (2008).
720. Di Croce, L. & Helin, K. Transcriptional regulation by Polycomb group proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* vol. 20 1147–1155 (2013).
721. Wang, X. *et al.* Regulation of histone methylation by automethylation of PRC2. *Genes Dev.* **33**, 1416–1427 (2019).
722. Chen, S., Jiao, L., Shubbar, M., Yang, X. & Liu, X. Unique Structural Platforms of Suz12 Dictate Distinct Classes of PRC2 for Chromatin Binding. *Mol. Cell* **69**, 840–852.e5 (2018).
723. Laugesen, A., Højfeldt, J. W. & Helin, K. Role of the polycomb repressive complex 2 (PRC2) in transcriptional regulation and cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, (2016).
724. Margueron, R. & Reinberg, D. The Polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* vol. 469 343–349 (2011).
725. Wen, Y., Cai, J., Hou, Y., Huang, Z. & Wang, Z. Role of EZH2 in cancer stem cells: From biological insight to a therapeutic target. *Oncotarget* vol. 8 37974–37990 (2017).
726. Smits, A. H., Jansen, P. W. T. C., Poser, I., Hyman, A. A. & Vermeulen, M. Stoichiometry of chromatin-associated protein complexes revealed by label-free quantitative mass spectrometry-based proteomics. doi:10.1093/nar/gks941.
727. Tan, J. Z., Yan, Y., Wang, X. X., Jiang, Y. & Xu, H. E. EZH2: Biology, disease, and structure-based drug discovery. *Acta Pharmacologica Sinica* vol. 35 161–174 (2014).
728. Kim, J. *et al.* Polycomb- and Methylation-Independent Roles of EZH2 as a Transcription Activator. *Cell Rep.* **25**, 2808–2820.e4 (2018).
729. Xu, K. *et al.* EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science (80-. )*. **338**, 1465–1469 (2012).
730. Huang, X. J. *et al.* EZH2 is essential for development of mouse preimplantation embryos. *Reprod. Fertil. Dev.* **26**, 1166–1175 (2014).
731. Pereira, J. D. *et al.* Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15957–15962 (2010).
732. Hirabayashi, Y. *et al.* Polycomb Limits the Neurogenic Competence of Neural Precursor Cells to Promote Astrogenic Fate Transition. *Neuron* **63**, 600–613 (2009).
733. Margueron, R. & Reinberg, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews Genetics* vol. 11 285–296 (2010).
734. He, A. *et al.* PRC2 directly methylates GATA4 and represses its transcriptional activity. *Genes Dev.* **26**, 37–42 (2012).
735. Gunawan, M. *et al.* The methyltransferase Ezh2 controls cell adhesion and migration through direct methylation of the extranuclear regulatory protein talin. *Nat. Immunol.* **16**, 505–516 (2015).
736. Lee, J. M. *et al.* EZH2 Generates a Methyl Degron that Is Recognized by the DCAF1/DDB1/CUL4 E3 Ubiquitin Ligase Complex. *Mol. Cell* **48**, 572–586 (2012).

737. Viré, E. *et al.* The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**, 871–874 (2006).
738. Liu, X. *et al.* The EZH2- H3K27me3-DNMT1 complex orchestrates epigenetic silencing of the *wwc1* gene, a Hippo/YAP pathway upstream effector, in breast cancer epithelial cells. *Cell. Signal.* **51**, 243–256 (2018).
739. Lee, S. T. *et al.* Context-Specific Regulation of NF- $\kappa$ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Mol. Cell* **43**, 798–810 (2011).
740. Shi, B. *et al.* Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5105–5119 (2007).
741. Xu, K. *et al.* EZH2 Oncogenic Activity in Castration-Resistant Prostate Cancer Cells Is Polycomb-Independent. *Science (80-. )*. **338**, 1465–1469 (2012).
742. Dasgupta, M., Dermawan, J. K. T., Willard, B. & Stark, G. R. STAT3-driven transcription depends upon the dimethylation of K49 by EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **112**, 3985–3990 (2015).
743. Gan, L. *et al.* Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential. *Biomarker Research* vol. 6 10 (2018).
744. Lee, S. T. *et al.* Context-Specific Regulation of NF- $\kappa$ B Target Gene Expression by EZH2 in Breast Cancers. *Mol. Cell* **43**, 798–810 (2011).
745. Jung, H. Y. *et al.* PAF and EZH2 induce wnt/ $\beta$ -catenin signaling hyperactivation. *Mol. Cell* **52**, 193–205 (2013).
746. Shi, B. *et al.* Integration of Estrogen and Wnt Signaling Circuits by the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer Cells. *Mol. Cell. Biol.* **27**, 5105–5119 (2007).
747. Yan, J. *et al.* EZH2 overexpression in natural killer/T-cell lymphoma confers growth advantage independently of histone methyltransferase activity. *Blood* **121**, 4512–4520 (2013).
748. Poppy Roworth, A., Ghari, F. & La Thangue, N. B. To live or let die—complexity within the E2F1 pathway. *Molecular and Cellular Oncology* vol. 2 (2015).
749. Ginsberg, D. E2F1 pathways to apoptosis. *FEBS Letters* vol. 529 122–125 (2002).
750. Tabbal, H. *et al.* EZH2 cooperates with E2F1 to stimulate expression of genes involved in adrenocortical carcinoma aggressiveness. *Br. J. Cancer* **121**, 384–394 (2019).
751. Yomtoubian, S. *et al.* Inhibition of EZH2 Catalytic Activity Selectively Targets a Metastatic Subpopulation in Triple-Negative Breast Cancer Article Inhibition of EZH2 Catalytic Activity Selectively Targets a Metastatic Subpopulation in Triple-Negative Breast Cancer. *CellReports* **30**, 755-770.e6 (2020).
752. Zheng, M. *et al.* EZH2 promotes invasion and tumour glycolysis by regulating STAT3 and FoxO1 signalling in human OSCC cells. *J. Cell. Mol. Med.* **23**, 6942–6954 (2019).
753. Liu, L. *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) promotes tumour cell migration and invasion via epigenetic repression of E-cadherin in renal cell carcinoma. *BJU Int.* **117**, 351–362 (2016).
754. Crea, F. *et al.* EZH2 inhibition: Targeting the crossroad of tumor invasion and angiogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews* vol. 31 753–761 (2012).
755. Yao, Y. *et al.* Downregulation of Enhancer of Zeste Homolog 2 (EZH2) is essential for the Induction of Autophagy and Apoptosis in Colorectal Cancer Cells. *Genes (Basel)*. **7**, 83 (2016).
756. Wang, X., Brea, L. T. & Yu, J. *Immune modulatory functions of EZH2 in the tumor microenvironment: implications in cancer immunotherapy.* *Am J Clin Exp Urol* vol. 7

- www.ajceu.us/ (2019).
757. Vilorio-Marqués, L. *et al.* The role of EZH2 in overall survival of colorectal cancer: A meta-Analysis. *Sci. Rep.* **7**, 1–8 (2017).
  758. Collett, K. *et al.* Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1168–1174 (2006).
  759. Behrens, C. *et al.* EZH2 protein expression associates with the early pathogenesis, tumor progression, and prognosis of non-small cell lung carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **19**, 6556–6565 (2013).
  760. Varambally, S. *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**, 624–629 (2002).
  761. Melling, N. *et al.* Overexpression of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) characterizes an aggressive subset of prostate cancers and predicts patient prognosis independently from pre-and postoperatively assessed clinicopathological parameters. *Carcinogenesis* **36**, 1333–1340 (2015).
  762. Bachmann, I. M. *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J. Clin. Oncol.* **24**, 268–273 (2006).
  763. Gan, L. *et al.* Epigenetic regulation of cancer progression by EZH2: From biological insights to therapeutic potential. *Biomarker Research* vol. 6 (2018).
  764. Bracken, A. P. *et al.* EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* **22**, 5323–5335 (2003).
  765. Song, X. *et al.* Selective inhibition of EZH2 by ZLD10A blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells proliferation. *Biomed. Pharmacother.* **81**, 288–294 (2016).
  766. Xue, L. *et al.* EZH2 upregulation by ER $\alpha$  induces proliferation and migration of papillary thyroid carcinoma. *BMC Cancer* **19**, 1094 (2019).
  767. Chen, Q., Zheng, P. S. & Yang, W. T. EZH2-mediated repression of GSK-3 $\beta$  and TP53 promotes Wnt/ $\beta$ -catenin signaling-dependent cell expansion in cervical carcinoma. *Oncotarget* **7**, 36115–36129 (2016).
  768. Lian, R. *et al.* EZH2 promotes cell proliferation by regulating the expression of RUNX3 in laryngeal carcinoma. *Mol. Cell. Biochem.* **439**, 35–43 (2018).
  769. Yun, C. W. & Lee, S. H. The roles of autophagy in cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
  770. Abounit, K., Scarabelli, T. M. & McCauley, R. B. Autophagy in mammalian cells. *World J. Biol. Chem.* **3**, 1 (2012).
  771. Baek, S. H. & Kim, K. II. Molecular Cell Minireview Epigenetic Control of Autophagy: Nuclear Events Gain More Attention. *Mol. Cell* **65**, 781–785 (2017).
  772. Liu, Z., Yang, L., Zhong, C. & Zhou, L. EZH2 regulates H2B phosphorylation and elevates colon cancer cell autophagy. *J. Cell. Physiol.* **235**, 1494–1503 (2020).
  773. Martin, T., Ye, L., Sanders, A., Lane, J. & Jiang, W. Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. *Metastatic Cancer Clin. Biol. Perspect.* **9**, 1–28 (2014).
  774. Krakhmal, N. V., Zavyalova, M. V., Denisov, E. V., Vtorushin, S. V. & Perelmuter, V. M. Cancer invasion: Patterns and mechanisms. *Acta Naturae* vol. 7 17–28 (2015).
  775. Morin, R. D. *et al.* Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat. Genet.* **42**, 181–185 (2010).

776. Bödör, C. *et al.* EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* vol. 25 726–729 (2011).
777. Herviou, L., Cavalli, G., Cartron, G., Klein, B. & Moreaux, J. EZH2 in normal hematopoiesis and hematological malignancies. *Oncotarget* **7**, 2284–2296 (2016).
778. Beaugerie, L. *et al.* Risk of colorectal high-grade dysplasia and cancer in a prospective observational cohort of patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **145**, (2013).
779. Coussens, L. M. & Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* vol. 420 860–867 (2002).
780. Goodman, J. E., Hofseth, L. J., Hussain, S. P. & Harris, C. C. Nitric oxide and p53 in cancer-prone chronic inflammation and oxyradical overload disease. in *Environmental and Molecular Mutagenesis* vol. 44 3–9 (2004).
781. Yang, X. P. *et al.* EZH2 is crucial for both differentiation of regulatory T cells and T effector cell expansion. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
782. Glazer, R. I. *et al.* 3-Deazaneplanocin: A new and potent inhibitor of S-adenosylhomocysteine hydrolase and its effects on human promyelocytic leukemia cell line HL-60. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 688–694 (1986).
783. Tan, J. *et al.* Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* **21**, 1050–1063 (2007).
784. Knutson, S. K. *et al.* Durable tumor regression in genetically altered malignant rhabdoid tumors by inhibition of methyltransferase EZH2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 7922–7927 (2013).
785. Ribrag, V. *et al.* Phase I Study of EPZ-6438 (E7438), an Enhancer of Zeste Homolog-2 (EZH2) Inhibitor: Dose Determination and Preliminary Activity in Non-Hodgkin Lymphoma.
786. Ribrag, V. *et al.* Phase I first-in-human study of the enhancer of zeste-homolog 2 (EZH2) histone methyl transferase inhibitor E7438 as a single agent in patients with advanced solid tumors or B cell lymphoma.
787. Stazi, G., Zwergel, C., Mai, A. & Valente, S. EZH2 inhibitors: a patent review (2014-2016). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* vol. 27 797–813 (2017).
788. McCabe, M. T. *et al.* EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* vol. 492 108–112 (2012).
789. Verma, S. K. *et al.* Identification of potent, selective, cell-Active inhibitors of the histone lysine methyltransferase EZH2. *ACS Med. Chem. Lett.* **3**, 1091–1096 (2012).
790. Zeng, D., Liu, M. & Pan, J. Blocking EZH2 methylation transferase activity by GSK126 decreases stem cell-like myeloma cells. *Oncotarget* **8**, 3396–3411 (2017).
791. Yap, T., Winter, J., Leonard, J. & Ribrag, V. A phase i study of gsk2816126, an enhancer of zeste homolog 2 (ezh2) inhibitor, in patients (pts) with relapsed/refractory diffuse large b-cell lymphoma (dlbcl), other. (2016).
792. Su, I. H. *et al.* Ezh2 controls B cell development through histone H3 methylation and Igh rearrangement. *Nat. Immunol.* **4**, 124–131 (2003).
793. Pereira, J. D. *et al.* Ezh2, the histone methyltransferase of PRC2, regulates the balance between self-renewal and differentiation in the cerebral cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 15957–15962 (2010).
794. Chen, L. *et al.* Conditional ablation of Ezh2 in murine hearts reveals its essential roles in endocardial cushion formation, cardiomyocyte proliferation and survival. *PLoS One*

- 7, (2012).
795. Greer, E. L. & Shi, Y. Histone methylation: A dynamic mark in health, disease and inheritance. *Nature Reviews Genetics* vol. 13 343–357 (2012).
796. He, A. *et al.* Polycomb repressive complex 2 regulates normal development of the mouse heart. *Circ. Res.* **110**, 406–415 (2012).
797. Delgado-Olguín, P. *et al.* Ezh2-mediated repression of a transcriptional pathway upstream of Mmp9 maintains integrity of the developing vasculature. *Dev.* **141**, 4610–4617 (2014).
798. Wu, J. C. & Child, J. S. Common congenital heart disorders in adults. *Curr. Probl. Cardiol.* **29**, 641–700 (2004).
799. Verzi, M. P., McCulley, D. J., De Val, S., Dodou, E. & Black, B. L. The right ventricle, outflow tract, and ventricular septum comprise a restricted expression domain within the secondary/anterior heart field. *Dev. Biol.* **287**, 134–145 (2005).
800. Oh, J. G. *et al.* Role of the PRC2-Six1-miR-25 signaling axis in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **129**, 58–68 (2019).
801. Bergmann, O. *et al.* Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (80-. )*. **324**, 98–102 (2009).
802. Ding, X. *et al.* The polycomb protein Ezh2 impacts on induced pluripotent stem cell generation. *Stem Cells Dev.* **23**, 931–940 (2014).
803. Tatton-Brown, K. *et al.* Germline mutations in the oncogene EZH2 cause Weaver syndrome and increased human height. *Oncotarget* **2**, 1127–1133 (2011).
804. Lui, J. C. *et al.* Ezh2 Mutations Found in the Weaver Overgrowth Syndrome Cause a Partial Loss of H3K27 Histone Methyltransferase Activity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **103**, 1470–1478 (2018).
805. Tatton-Brown, K. *et al.* Weaver syndrome and EZH2 mutations: Clarifying the clinical phenotype. *Am. J. Med. Genet. Part A* **161**, 2972–2980 (2013).
806. Cohen, A. S. A. *et al.* Weaver Syndrome-Associated EZH2 Protein Variants Show Impaired Histone Methyltransferase Function In Vitro. *Hum. Mutat.* **37**, 301–307 (2016).
807. Gibson, W. T. *et al.* Mutations in EZH2 cause weaver syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **90**, 110–118 (2012).
808. Weaver, D. D., Graham, C. B., Thomas, I. T. & Smith, D. W. A new overgrowth syndrome with accelerated skeletal maturation, unusual facies, and camptodactyly. *J. Pediatr.* **84**, 547–552 (1974).
809. Zhou, J. *et al.* Targeting EZH2 histone methyltransferase activity alleviates experimental intestinal inflammation. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
810. Neele, A. E. & de Winther, M. P. J. Repressing the repressor: Ezh2 mediates macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* vol. 215 1269–1271 (2018).
811. Aury-Landas, J. *et al.* EZH2 inhibition reduces IL-1 $\beta$ -mediated inflammation and increases anabolic gene expression in human chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **26**, S158–S159 (2018).
812. Tang, L. Novel pharmacological inhibition of EZH2 attenuates septic shock by altering innate inflammatory responses to sepsis. in *European Respiratory Journal* vol. 54 PA2271 (European Respiratory Society (ERS), 2019).
813. Keenan, C. R. *et al.* Polycomb repressive complex 2 is a critical mediator of allergic inflammation. *JCI Insight* **4**, (2019).

814. Li, R. *et al.* EZH2 inhibits autophagic cell death of aortic vascular smooth muscle cells to affect aortic dissection. *Cell Death Dis.* **9**, 1–15 (2018).
815. Sharma, S., Kelly, T. K. & Jones, P. A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* vol. 31 27–36 (2009).
816. Baylin, S. B. & Jones, P. A. Epigenetic determinants of cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **8**, (2016).
817. Delgado-Olguín, P. *et al.* Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat. Genet.* **44**, 343–347 (2012).
818. Watkins, S. J., Borthwick, G. M. & Arthur, H. M. The H9C2 cell line and primary neonatal cardiomyocyte cells show similar hypertrophic responses in vitro. *Vitr. Cell. Dev. Biol. - Anim.* **47**, 125–131 (2011).
819. MULLER, J., Surgery, J. D.-, obstetrics, gynecology & & 1952, undefined. The treatment of certain congenital malformations of the heart by the creation of pulmonic stenosis to reduce pulmonary hypertension and excessive. *euopepmc.org*.
820. Sharma, R. Pulmonary artery banding: Rationale and possible indications in the current era. *Annals of Pediatric Cardiology* vol. 5 40–43 (2012).
821. Faber, M. J. *et al.* Right and left ventricular function after chronic pulmonary artery banding in rats assessed with biventricular pressure-volume loops. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* **291**, (2006).
822. Van Der Feen, D. E. *et al.* Shunt surgery, right heart catheterization, and vascular morphometry in a rat model for flow-induced pulmonary arterial hypertension. *J. Vis. Exp.* **2017**, 55065 (2017).
823. Delgado-Olguín, P. *et al.* Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat. Genet.* **44**, 343–7 (2012).
824. Ng, B. *et al.* Intratracheal Administration of siRNA Triggers mRNA Silencing in the Lung to Modulate T Cell Immune Response and Lung Inflammation. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **16**, 194–205 (2019).
825. Fujita, Y., Kuwano, K. & Ochiya, T. Development of small RNA delivery systems for lung cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 16 5254–5270 (2015).
826. Fehring, V. *et al.* Delivery of therapeutic siRNA to the lung endothelium via novel lipoplex formulation DACC. *Mol. Ther.* **22**, 811–820 (2014).
827. Lam, J. K. W., Liang, W. & Chan, H. K. Pulmonary delivery of therapeutic siRNA. *Advanced Drug Delivery Reviews* vol. 64 1–15 (2012).
828. Itani, R. & Faraj, A. Al. SiRNA conjugated nanoparticles—a next generation strategy to treat lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 (2019).

## Annexes

### Annexe I.

Publié dans Circulation. 2020 Oct 13;142(15):1464-1484.

**Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial Hypertension.**

Junichi Omura, # **Karima Habbout**, # Tsukasa Shimauchi, Wen-Hui Wu, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, Valérie Nadeau, Kassandra Gagnon, Florence Mazoyer, Jean Perron, Francois Potus, Jian-Hui Lin, Hamza Zafar, David G. Kiely, Allan Lawrie, Stephen L. Archer, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Olivier Boucherat, Sébastien Bonnet. #*Ces auteurs ont contribué de façon équivalente au projet.*

**Identification of The Long Non-Coding RNA H19 as a New Biomarker and  
Therapeutic Target in Right Ventricular Failure in Pulmonary Arterial  
Hypertension**

**Running Title:** *Omura & Habbout et al.; LncRNA H19 in Right Ventricular Failure*

Junichi Omura & Karima Habbout, et al

*The full list of authors is available on page 27.*

**\*Addresses for Correspondence:**

Sébastien Bonnet, PhD and Olivier Boucherat, PhD  
Pulmonary Hypertention research Group  
IUCPQ Research Centre  
2725, chemin Sainte-Foy  
Québec, QC  
Canada, G1V 4G5  
Tel: (418) 656-8711 ext 2134  
Email: [sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca](mailto:sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca)  
[olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca)



## Abstract

**Background:** Right ventricular (RV) function is the major determinant for both functional capacity and survival in patients with pulmonary arterial hypertension (PAH). Despite the recognized clinical importance of preserving RV function, the subcellular mechanisms that govern the transition from a compensated to a decompensated state remain poorly understood and as a consequence there are no clinically established treatments for RV failure and a paucity of clinically useful biomarkers. Accumulating evidence indicates that long non-coding RNAs (lncRNAs) are powerful regulators of cardiac development and disease. Nonetheless, their implication in adverse RV remodeling in PAH is unknown.

**Methods:** Expression of the lncRNA H19 was assessed by quantitative PCR in plasma and RV from patients categorized as control RV, compensated RV (cRV) or decompensated RV (dRV) based on clinical history and cardiac index. The impact of H19 suppression using GapmeR was explored in two rat models mimicking RV failure, namely the monocrotaline (MCT) and pulmonary artery banding (PAB). Echocardiographic, hemodynamic, histological and biochemical analyses were conducted. *In vitro* gain- and loss-of-function experiments were performed in rat cardiomyocytes.

**Results:** We demonstrated that H19 is up-regulated in dRV from PAH patients and correlates with RV hypertrophy and fibrosis. Similar findings were observed in MCT and PAB rats. We found that silencing H19 limits pathological RV hypertrophy, fibrosis and capillary rarefaction, thus preserving RV function in MCT and PAB rats without affecting pulmonary vascular remodeling. This cardioprotective effect was accompanied by E2F transcription factor 1-mediated up-regulation of enhancer of zeste homolog 2. *In vitro*, knockdown of H19 suppressed cardiomyocyte hypertrophy induced by phenylephrine, while its overexpression has the opposite effect. Finally, we demonstrated that circulating H19 levels in plasma discriminate PAH patients from controls, correlate with RV function and predict long-term survival in two independent idiopathic PAH cohorts. Moreover, H19 levels delineate subgroups of patients with differentiated prognosis when combined with the NT-proBNP levels or the risk score proposed by both REVEAL and the 2015 European pulmonary hypertension guidelines.

**Conclusions:** Our findings identify H19 as a new therapeutic target to impede the development of maladaptive RV remodeling and a promising biomarker of PAH severity and prognosis.

**Key Words:** PAH; Cardiac remodeling; EZH2; Heart failure; Fibrosis

### Non-standard Abbreviations and Acronyms

$\alpha$ SMA	alpha smooth muscle actin
ANP	atrial natriuretic peptide
AMPK	AMP-activated protein kinase
BNP	B-type natriuretic peptide
NT-proBNP	N-terminal pro b-type natriuretic peptide
CAMKII $\delta$	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II $\delta$
CF	cardiac fibroblast
CM	cardiomyocyte
CO	cardiac output
Col1 $\alpha$ 1	Collagen, type I, alpha 1

Col3 $\alpha$ 1	Collagen, type III, alpha 1
CI	cardiac index
cRV	compensated right ventricle
dRV	decompensated right ventricle
CTRL	control
E2F1	E2F transcription factor 1
EI	eccentricity index
4E-BP1	eIF4E-binding protein1
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FAC	fractional area change
IGF1R	insulin-like growth factor 1 receptor
ISH	<i>in situ</i> hybridization
lncRNA	long non-coding RNA
LV	left ventricle/ventricular
MCT	monocrotaline
MOI	multiplicity of infection
mTOR	mammalian target of rapamycin
PA	pulmonary artery
PAB	Pulmonary artery banding
PAH	pulmonary arterial hypertension
PE	phenylephrine
RVEDD	RV end-diastolic diameter
RVEDP	RV end-diastolic pressure
RV	right ventricle/ventricular
RVSP	RV systolic pressure
SCRM	scramble
siRNA	small interfering RNA
SV	stroke volume
SvO <sub>2</sub>	mixed venous oxygen saturation
TAPSE	tricuspid annular plane systolic excursion
YB1	Y-box-binding protein 1
WHO	World Health Organization

## Clinical Perspective

### What is new?

- We have identified for the first time a direct role of the long non-coding RNA “H19” in right ventricular failure in pulmonary arterial hypertension (PAH) patients.
- We also provide evidences on how H19 compromises the right ventricular functions in PAH.
- Using preclinical animal models, which shares the same pathophysiological features observed in PAH patients, we showed that H19 inhibition provides therapeutic benefits on right heart functions without affecting the pulmonary vasculature.
- Our data provide evidence in 2 independent cohorts that circulating H19 levels can predict outcomes in idiopathic pulmonary hypertension patients.

### What are the clinical implications?

- The long non-coding RNA H19 is specifically implicated in the maladaptative right ventricular hypertrophy seen in pulmonary arterial hypertension (PAH) patients.
- The inhibition of the long non-coding RNA H19 may have therapeutic value in PAH-related right heart failure.
- Elevated circulating levels of H19 discriminated patients with right ventricular dysfunction and predicted the long-term outcomes in 2 independent cohorts of idiopathic PAH patients.
- Although these observations require further validation, H19 circulating levels show promises as a biomarker for the assessment of the severity of the disease and prognosis.

4

4

## Introduction

Pulmonary Arterial Hypertension (PAH) is a vascular remodeling disease characterized by vasoconstriction and progressive obliteration of distal pulmonary arteries (PA) leading to elevation of PA pressure and right ventricular (RV) failure.<sup>1</sup> Despite advances in therapies targeting the pulmonary vasculature, PAH remains a fatal disease with 3-year survival around 60% for newly diagnosed patients with idiopathic PAH.<sup>2,3</sup> Although RV function is the major prognostic factor for both morbidity and mortality in PAH patients, no RV-specific therapies exist. This underscores the need to better understand the cellular and molecular mechanisms underlying RV dysfunction in PAH and to identify biomarkers of disease progression.

It is now recognized that development of RV hypertrophy in PAH is divided into two periods.<sup>4</sup> In early-stage of the disease, RV hypertrophy is considered as an adaptive physiological response to increased afterload (also called compensated state) preserving RV filling pressures, cardiac output (CO) and exercise capacity. In response to persistent elevated RV afterload and inflammation, RV compensatory mechanisms are insufficient and the RV transitions to maladaptive hypertrophy, a process characterized by RV dilatation, elevated RV end-diastolic pressure (RVEDP), decreased CO, excessive fibrosis, and loss of capillaries that collectively contribute to RV failure and premature death.<sup>5,6</sup> Thus, therapeutic strategies should be aimed at supporting adaptive remodeling and/or reversing the signaling pathways responsible for maladaptive RV remodeling in addition to the goal of improving pulmonary vascular hemodynamics.

Long non-coding RNAs (lncRNAs), defined as non-coding transcripts longer than 200 nucleotides, have recently emerged as an important class of molecules involved in many cellular processes and development of various diseases.<sup>7</sup> By interacting with RNA, DNA and proteins,

lncRNAs can regulate gene expression at multiple levels.<sup>7,8</sup> Although several studies have pinpointed the implication of lncRNAs in cardiac hypertrophy and failure,<sup>9-11</sup> their contribution in RV dysfunction in PAH is largely unknown. The imprinted maternally transcribed and evolutionary conserved lncRNA H19 (hereafter called H19) is highly expressed during *in utero* development and down-regulated postnatally, except in the skeletal muscle and the heart.<sup>12</sup> Besides modulating miRNA availability by acting as a molecular sponge, and interacting with various proteins to regulate gene expression, H19 is known to serve as the primary precursor of miR-675, adding further complexity to its biological functions.<sup>8</sup> Large scale transcription profilings repeatedly identified H19 as one of the lncRNA most consistently and significantly overexpressed in failing LV from human and animal models.<sup>13,14</sup> Mechanistically, *in vitro* studies showed that H19 regulates cardiomyocyte (CM) hypertrophy,<sup>15</sup> promotes CM apoptosis in dilated cardiomyopathy<sup>16</sup> and stimulates cardiac fibroblast proliferation and fibrosis<sup>17,18</sup>; all implicated in progression of RV failure. In addition, H19 expression levels in circulation were documented to be increased in various pathological conditions such as coronary artery disease<sup>19</sup> and neoplasia,<sup>20,21</sup> underscoring its potential utility as a diagnostic and monitoring biomarker. Considering the aforementioned studies, we hypothesize that H19 is critically involved in RV dysfunction and represent a rare molecular target with promising potential for therapeutic, diagnostic and prognostic purposes.

Using a translational approach, we show that H19 is specifically increased in decompensated RV from PAH patients and animal models and its expression level significantly correlates with biochemical and histological hallmarks of maladaptive RV remodeling as well as deterioration of cardiac functions. Furthermore, we provide evidence that *in vivo* knockdown of H19, using modified antisense oligonucleotides, provides therapeutic benefits in two

complementary animal models of RV failure. Finally, we demonstrate that H19 can serve as a new diagnostic and prognostic biomarker of RV dysfunction in PAH in two well-phenotyped and independent PAH cohorts.

### **Methods**

The data, analytic methods, and study materials for the purposes of reproducing the results or replicating procedures can be made available on request to the corresponding author who manages the information.

### **Human Tissue and Blood Samples**

Experimental procedures using human tissues or cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and were performed with the approval of Laval University and the IUCPQ Biosafety and Ethics Committees (CER#20773, CER#20735 and CER#21747). All the experiments were performed in accordance to the latest preclinical PAH research guidelines.<sup>22</sup> Tissues were obtained from patients who had previously given written informed consent. Right ventricular (RV) samples were categorized as control RV, compensated RV (cRV) or decompensated RV (dRV) based on clinical history and cardiac index (CI). Additional data are available in the online-only Data Supplement.

### **Additional materials and methods**

The expanded Methods section in the online-only Data Supplement contains information on patients' clinical characteristics and results for univariate and multivariate predictors of death or lung transplant in the PAH cohorts (**Tables I-VIII in the Supplement**); a description of animal models, echocardiographic and hemodynamic analyses of cardiac function, in situ hybridization, GapmeR delivery in vivo, histological and immunofluorescence analyses, cell culture and

treatments, cell surface area measurement, quantitative real-time polymerase chain reaction and Western blotting. All primer pairs and antibodies used in this study are provided in **Tables IX and X in the Supplement**.

#### Statistical analysis

Values are presented as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM) unless indicated otherwise. For in-depth description of statistics, see the expanded materials and methods section in the online-only Data Supplement. A P value  $<0.05$  was considered significant.

#### Results

##### **H19 is specifically increased in decompensated RV from PAH patients and positively correlates with cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy.**

To explore the role of H19 in RV remodeling in PAH, we first measured H19 expression in human control RV, versus cRV and dRV from PAH patients (**Table 1**). H19 expression was significantly increased in cRV compared to control and further increased in dRV from PAH patients (**Figure 1A**). Expression of miR-675-3p and miR-675-5p, the processed products of H19 showed a similar expression pattern, with a trend to be increased in cRV and a marked up-regulation in dRV (**Figure 1B-C**). We then quantified the expression of H19 in the LV and lungs from control and PAH patients. Contrary to that the expression profile in the RV, there was no significant difference in H19 expression between control and PAH patients (**Figure 1D and 1E**). To support these findings, we performed *in situ* hybridization using a probe against H19 on human control RV, cRV and dRV tissues. Consistent with results generated by qRT-PCR, the overall signal intensity of H19 was clearly increased in the dRV group (**Figure 1F and Figure I in the Supplement**). These analyses further revealed that H19 is expressed in all cardiac cell

types with a pronounced expression in cardiac myocytes. To establish the pathophysiological role of H19 in RV failure, both cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy were measured in our human RV biopsies (**Figure 1G and 1H**) and (**Figure 1G and 1I**). Analyses revealed that H19 expression positively correlates with both fibrosis and hypertrophy (**Figure 1J and 1K**).

### **H19 is upregulated in animal models mimicking the clinical progression from compensated RVH to RV failure**

We next investigated whether animal models classically used to study the evolution of RV remodeling (from cRV to dRV stages) reproduce the molecular and histological features described in PAH patients. We first modeled the natural history of RV failure in MCT rat model. To this end, MCT-treated male rats were sacrificed at different time points or euthanized when exhibiting clinical symptoms of RV failure (ruffled fur, red discoloration of head and neck, less active than previously and decreased food consumption defined as less than 5 g per day). To avoid inherent biases due to inter-animal variability and batch sampling, hemodynamic data (RV systolic pressure (RVSP), CO and RVEDP) collected by closed chest right heart catheterization and echocardiography before sacrifice were used to classify rats into the following four groups: 1) early cRV; 2) late cRV; 3) early dRV and 4) late dRV (**Table 1, Figure 2A-B, Figures II and III-A in the Supplement**). Based on this definition, we found that total pulmonary resistance (TPR), Fulton index, gene expression of Atrial natriuretic peptide (*Nppa*) and B-type natriuretic peptide (*Nppb*), cardiac fibrosis as well as cross-sectional area of cardiac myocytes were increased in late versus early RV remodeling (**Figure III-B-G in the Supplement**), thus validating the proposed classification at the structural and biochemical levels. In agreement with results obtained from human samples, H19 and miR-675 were significantly and specifically overexpressed in the RV from MCT-treated rats at the early and late decompensated stages

compared to the early and late compensated stages (**Figure 2C-D, Figure III-H in the Supplement**). Similar to that found in human, H19 expression levels negatively correlated with CO (**Figure III-I in the Supplement**) and positively correlated with fibrosis and cardiac myocyte hypertrophy (**Figure 2E**), as well as TPR, RVEDP and expression of *Nppa* and *Nppb* (**Figure III-J-M in the Supplement**).

To further strengthen our results, a second rat model of pressure overload-induced RV dysfunction was generated by PAB. PAB rats were categorized into 1) cRV and 2) dRV based on clinical signs of RV failure (**Table 1 and Figure IV in the Supplement**). Relative to the sham group, the peak pressure gradient across the PA constriction and Fulton index were significantly increased in the PAB group, with no difference between cRV and dRV rats (**Figure V-A-B in the Supplement**). As expected, CO, TAPSE and S wave were significantly decreased in dRV compared to cRV (**Figure 2 F-G and Figure V-C in the Supplement**), while expression of *Myh7/Myh6* ratio, *Nppa*, *Nppb*, fibrosis and cardiac myocyte hypertrophy exhibited the opposite pattern (**Figure V-D-H in the Supplement**). Compared with the sham group, H19 and miR-675 were unchanged in cRV but drastically augmented in dRV (**Figure 2H-I**). By contrast, no change in H19 expression levels was observed in the corresponding LV (**Figure V-I in the Supplement**). Furthermore, RV H19 expression correlated positively with fibrosis, cardiac myocyte hypertrophy, *Nppa* and *Nppb* (**Figure 2J and Figure V-J-K in the Supplement**). Consistently, H19 expression levels negatively correlated with CO, TAPSE and S wave (**Figure V-L-N in the Supplement**). This suggests that H19 is implicated in the transition from cRV to dRV in human PAH and animal models.

#### **Inhibition of H19 in the MCT rat model exerts cardioprotective effect on the RV**

To determine whether H19 silencing improves RV dysfunction, a loss-of-function approach was

undertaken, using modified antisense oligonucleotides (GapmeRs) in the MCT model. At week 2 following MCT injection, scrambled or H19-targeting GapmeRs (10mg/kg) were injected in adult male rats once a week over a period of two weeks (**Figure 3A**). At the end of the protocol, the delivery efficiency and efficacy of Gapmer H19 was tested by measuring H19 and miR-675-3p expression levels in the RV. As expected, treatment with Gapmer-H19 resulted in a significant reduction of H19 and miR-675-3p in the RV (**Figure 3B and Figure VI-A in the Supplement**). A significant knockdown was also noticed in lungs (**Figure VI-B in the Supplement**). Although this study was not designed to evaluate survival, a significantly higher cumulative survival rate was observed in the Gapmer H19-treated group than in the scrambled group, strengthening the fact that *in vivo* inhibition of H19 counteracts maladaptive RV remodeling (**Figure 3C**). Serial functional measures of cardiac function by noninvasive echocardiography revealed preserved CO, CI, stroke volume (SV), TAPSE and S wave as well as decreased RV end-diastolic diameter (RVEDD) upon GapmeR H19 treatment as compared with scrambled controls (**Figure 3D-H, Figures VI-C and VII in the Supplement**). Moreover, echocardiography revealed that RV dilatation and corresponding LV compression were attenuated in Gapmer H19-treated rats (**Figure 3I**). Indeed, RV fractional area change (FAC), a surrogate measurement of RV ejection fraction, was higher in Gapmer H19-treated rats. Concurrently, the end-diastolic and end-systolic LV eccentricity indices (EI) (markers for RV pressure and volume overload) were diminished (**Figure VI-D-F in the Supplement**). Furthermore, hemodynamics measured by right heart catheterization showed that two weeks of GapmeR H19 treatment resulted in significant improvements in CO, CI and RVEDP compared to control Gapmer-injected MCT rats (**Figure 3J-L and Figure VI-G in the Supplement**). Although there was no difference in RV mass (expressed as Fulton index, **Figure VI-H in the**

**Supplement**), this apparent hemodynamic improvement of RV function was associated with reduction of cardiomyocyte cross-sectional area (**Figure 3N and 3P**) and downregulation of the fetal genes and cardiac stressed markers *Nppa*, *Nppb* and *Myh7/Myh6* ratio (**Figure 3R**, and **Figure VI-I-J in the Supplement**). Interestingly, pulmonary vascular remodeling, as assessed by Elastica-van-Gieson staining (**Figure VI-L in the Supplement**) and TPR (**Figure 3M**), were unchanged between groups, indicating that *in vivo* knockdown of H19 has no effect on the pulmonary histopathological changes induced by MCT. Thus, the observed improvements in RV function cannot be attributed to regression of pulmonary vascular disease; rather they are best attributed to H19-mediated suppression of RV decompensation. In support of this, a trend for increased RVSP was observed in GapmeR H19-treated rats (**Figure 3J**). We next quantified the extent of fibrosis in RV sections by Masson's trichrome staining. RV collagen accumulation was noticeably reduced in MCT rats treated with GapmeR H19 when compared to those injected with control GapmeR (**Figure 3N and 3O**). Expression of the fibrosis marker genes collagen type I  $\alpha 1$  (*Col1a1*) and collagen type III  $\alpha 1$  (*Col3a1*) were diminished by H19 silencing (**Figure 3Q and Figure VI-K in the Supplement**). Moreover, RV capillary rarefaction was significantly improved in MCT rats receiving GapmeR H19 (**Figure VIII in the Supplement**). Taken together, these findings indicate that H19 inhibition exerts RV-specific beneficial effects and increases survival in the MCT PAH model.

#### **Suppression of H19 improves RV function in the PAB rat model of RV failure**

To follow the recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH<sup>6</sup>, we decided to test the therapeutic potential of GapmeR H19 in a second animal model. To this end, we used the PAB model in which RV dysfunction and remodeling occur independently of changes in the pulmonary vasculature. As observed in the MCT model, *in vivo* administration of GapmeR H19

(10mg/kg) 3 weeks after PAB, with follow-up injections every week during five weeks (**Figure 4A**) led to a significant reduction of RV H19 and miR-675-3p expression compared with PAB rats treated with control Gapmer (**Figure 4B** and **Figure IX-A in the Supplement**). Although there was no difference of afterload as indicated by the peak pressure gradient at the banding site (**Figure 4C** and **Figure X-A in the Supplement**) and Fulton index (**Figure IX-B in the Supplement**), we found that depletion of H19 significantly attenuates the deterioration of RV function, as assessed by serial echocardiography. Indeed, the natural decline of CO, CI, SV TAPSE, FAC and S wave observed in control PAB rats was attenuated by GapmeR H19 therapy (**Figure 4D-4F**, **Figures IX-C-E** and **X in the Supplement**). In contrast, RVEDD (**Figure 4G**) and EI (**Figure IX-F-G in the Supplement**) were diminished upon treatment with GapmeR H19. Similarly, echocardiography revealed that RV dilatation and LV compression were attenuated in GapmeR H19-treated rats (**Figure 4H**). These results were corroborated by right heart catheterization showing improvement in CO, CI, RVEDP and SV in rats receiving GapmeR H19 compared with rats receiving a control GapmeR despite similar RVSP (**Figure 4I-4L** and **Figure IX-H in the Supplement**). As in MCT rats, these hemodynamic and structural improvements were associated with reduced expression of the cardiac stress markers *Nppa*, *Nppb* and *Myh7/Myh6* ratio (**Figure 4O**, and **Figure IX-I-J in the Supplement**). We next assessed the percentage of RV fibrosis via Masson's trichrome staining and observed a significant diminution of the surface area occupied by fibrous tissue (**Figure 4M**). In line with this observation, expression of the fibrosis markers *Col3a1* and *Col1a1* (**Figure 4N** and **Figure IX-K in the Supplement**) and the cardiomyocyte surface area were significantly reduced in PAB rats treated with GapmeR H19 (**Figure 4M**). Finally, RV capillary density was significantly increased in PAB rats injected with GapmeR H19 (**Figure XI in the Supplement**). Collectively, these data

demonstrate that inhibition of H19 delays progression towards RV failure independently of RV afterload. Demonstrating how long H19 inhibition effects last on RV functions or determining any putative rebound effects in the setting of PAH will be important to know, although not achievable in animal models with evolving PAH as it will request everyday RV echo and thus repetitive anesthesia which are not ethically feasible. Nonetheless, recent *in vivo* studies showed that the knockdown effects were still highly efficient in most tissue including heart even 5 weeks after last dose.

#### **Impact of H19 depletion in animal models on factors implicated in cardiac remodeling**

Given that H19/miR-675 signaling has previously been documented to affect key factors known to contribute to cardiac remodeling, such as mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling,<sup>23</sup> calcium/calmodulin-dependent protein kinase II  $\delta$  (CAMKII $\delta$ ),<sup>24</sup> AMP-activated protein kinase (AMPK),<sup>25</sup> and insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R),<sup>26</sup> the expression levels of these proteins were first evaluated in MCT and PAB rats treated or not with GapmeR H19. In addition, we screened a number of proteins identified as regulators of cardiac hypertrophy and fibrosis that have not been reported to be altered by H19 in the literature. As shown in **Figure XII in the Supplement**, RV functional improvement in animal models treated with GapmeR H19 was not associated with a major change in IGF1R expression nor AMPK activity. In the MCT model, *in vivo* knockdown of H19 was accompanied by a trend towards increased eIF4E-binding protein1 (4E-BP1) phosphorylation without impacting the phosphorylation level of S6K (**Figure XII-A in the Supplement**). In contrast, GapmeR H19 injection in the PAB model was not related to changes in the phosphorylation levels of mTORC1 downstream targets (**Figure XII-B in the Supplement**). Similarly, we found that CAMKII $\delta$  expression was not impacted by H19 knockdown in the MCT model whereas it was up-regulated

after suppression of H19 in PAB model (**Figure XII-A-B in the Supplement**). Interestingly, expression of IGF1R, CAMKII $\delta$  and phosphorylation levels of 4E-BP1 were all reduced in dRV from PAH patients (**Figure XIII in the Supplement**). Although most of factors tested exhibited no concordant gene expression changes in both models after H19 suppression, we found that transcript and protein expression levels of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2), known to silence hypertrophic and fibrotic gene programs in cardiomyocytes,<sup>27</sup> were markedly increased in both models (**Figure 5A-D**). In line with these observations, EZH2 mRNA and protein expression levels were significantly diminished in dRV from PAH patients compared to patients presenting cRV; a pattern recapitulated in MCT and PAB animals (**Figure 5E-H**).

#### **In vitro inhibition of H19 prevents phenylephrine (PE)-induced pathological cardiomyocyte hypertrophy**

To consolidate our results, cardiomyocytes isolated from RV neonatal rats (RV-NRCMs) and H9c2 myoblast cells were first challenged with phenylephrine (PE, 50  $\mu$ M for 24 hours) with or without H19 RNA interference. Cardiomyocyte hypertrophy was examined by measuring cell surface area and the mRNA levels of *Nppb*, a well-established marker of the hypertrophic response.<sup>28</sup> As shown in **Figure 6**, PE increased the surface area of RV-NRCMs which was accompanied by a concomitant elevation of *Nppa*, *Nppb* and *Myh7/Myh6* ratio expression. This effect was completely abolished by H19 knockdown using siRNA (**Figures 6A-E and Figure XIV-A in the Supplement**). Similar findings were found in H9c2 (**Figure XIV-B-D in the Supplement**). In contrast, forced expression of H19 using adenoviral vector induced hypertrophy, as assessed by cell surface area and *Nppb* measurements (**Figure 6F-G**). To determine whether these effects exerted by H19 are mediated, at least in part, by the miRNA embedded with it (e.g. miR-675), cells were transfected with either miR-675 mimic or its

corresponding control. As observed for H19 gain-of function, supplementation in miR-675 induced cell hypertrophy (**Figure 6H-J**). Based on our human and in vivo data supporting EZH2 as a new downstream negative effector of H19, EZH2 expression was measured in cells exposed to PE and subjected to H19 inhibition. We found that inhibition of H19 augmented EZH2 mRNA and protein expression levels in PE-treated RV-NRCMs (**Figure 6K**) or H9c2 (**Figure XIV-E-F in the Supplement**); whereas increased miR-675 expression downregulated it (**Figure 6L**). We next evaluated the effects of EZH2 manipulation at baseline or upon exposure to PE. Overexpression of EZH2, using adenoviral vector, prevents the PE-induced hypertrophic response (**Figure XIV-G-I in the Supplement**) whilst EZH2 inhibition, using siRNA, induced myocyte hypertrophy under basal conditions (**Figure XV-A-C in the Supplement**). In line with this, we found that knockdown of EZH2 abolishes the anti-hypertrophic effects of H19 inhibition in PE-stimulated RV-NRCMs or H9c2 (**Figure XV-D-I in the Supplement**). Since EZH2 is not a predicted target of miR-675 (Targetscan 7.2), we next investigated how miR-675 can indirectly regulate EZH2. By merging transcription factor binding data generated by the ENCODE project and available literature showing that E2F1 is a direct target of miR-675<sup>29</sup> (**Figure XVI-A in the Supplement**) and a key transactivator of EZH2,<sup>30</sup> we thus hypothesized that up-regulation of E2F1 mediates H19/miR-675 downregulation-induced increased expression of EZH2. To test our hypothesis, we first measured E2F1 in PE-exposed RV-NRCMs treated or not with siH19. As expected, E2F1 was upregulated following H19 knockdown (**Figure 6M**) and diminished by miR-675 supplementation (**Figure XVI-B in the Supplement**). Consistently, E2F1 and EZH2 were shown to share the same expression profile with a significant increase observed in GapmeR H19-treated MCT and PAB rats and a diminution between human compensated and decompensated RV (**Figure XVI-C-E in the Supplement**). Finally, both molecular and

pharmacological inhibition of E2F1 reduced EZH2 expression levels in cardiac myocytes (Figure 6N and Figure XVI-F in the Supplement). Taken together, these results strengthen the fact that H19/miR-675 promotes maladaptive pro-hypertrophic growth and suggest that down-regulation of E2F1/EZH2 axis by H19/miR-675 accounts, at least in part, for this process.

#### **H19 promotes cardiac fibroblast activation**

Together with cardiomyocytes, cardiac fibroblasts (CFs) are recognized as key protagonists of RV failure.<sup>4</sup> To gain a more complete picture of the role of H19 in RV failure, gain- and loss-of-function approaches were carried out in fibroblasts isolated from patients with normal RV functions (Figure XVII-A in the Supplement). We found that *in vitro* knockdown of H19 delays or prevents the spontaneous differentiation of CFs into myofibroblasts, as illustrated by reduced expression of  $\alpha$ SMA, Col1 $\alpha$ 1 and Col3 $\alpha$ 1 (Figure XVII-B-D in the Supplement), while forced expression of H19 or miR-675 significantly increased expression of these pro-fibrotic genes (Figure XVII-E-L in the Supplement). Contrary to what observed in CMs, these effects were not associated with changes in E2F1 or EZH2 expression (data not shown), underscoring a cell-type-specific regulation. Collectively, our data support previous studies showing that inhibition of H19/miR-675 antagonizes the proliferation and activation of CFs<sup>17,18</sup> and indicate that the cardioprotective effects of H19 suppression in our animal models is likely the result of its action in multiple cell types.

#### **Plasma H19 levels function as a diagnostic and prognostic biomarker for PAH**

Because expression of H19 is altered in many diseases<sup>20,31,32</sup> and its levels in the circulation often reflect the changes in expression of the disease organ, we next determined whether H19 can serve as a circulating biomarker in PAH and/or correlate with disease severity. To fulfill the above objective, we measured H19 expression in plasma samples from an existing cohort from

Québec (Canada) composed of patients with either idiopathic PAH (IPAH, n=52) or connective tissue diseases associated PAH (CTD-PAH, n=21) or controls (n=57). We then replicated this study in an independent validation cohort of subjects with either IPAH (n=75) or CTD-PAH (n=31) and controls (n=54) from Sheffield (United Kingdom, UK). Characteristics of both cohorts are presented in Table IV and V in the Supplement. H19 plasma levels were higher in PAH (IPAH and CTD-PAH) and discriminated PAH patients from control subjects in individual and combined cohorts (IPAH, **Figure 7A-7C** and **Figure XVIII-A-C in the Supplement**; CTD-PAH, **Figure XIX-A-F in the Supplement**). Having established that H19 correlates with cardiac fibrosis and cardiomyocyte hypertrophy and is elevated in the peripheral circulation of PAH patients, we sought to determine the potential utility of plasma H19 as a diagnostic biomarker of RV function. As observed in animal models, H19 levels in plasma were predominantly increased in PAH patients with dRV ( $CI < 2.2 \text{ L/min/m}^2$ ) in each cohort respectively or combined cohorts (IPAH, **Figure 7D-7F**; CTD-PAH, **Figure XIX-G-I in the Supplement**). Therefore, we assessed whether H19 discriminates dRV from cRV in each cohort respectively or in the combined cohort (IPAH, **Figure 7G-7I**; CTD-PAH, **Figure XIX-J-L in the Supplement**). ROC curves analyses suggested moderate discriminative properties for H19 in IPAH (AUC 0.71-0.74). As expected, H19 expression levels negatively correlated with CI in PAH patients (IPAH; **Figure 7J**, and CTD-PAH; **Figure XX-A in the Supplement**). Amongst IPAH patients, circulating H19 levels also correlated with NT-proBNP and PVR (**Figure 7K** and **Figure XVIII-E in the Supplement**). Although H19 plasma levels were correlated with PVR, there was no significant correlation between H19 plasma levels and NT-proBNP in CTD-PAH (**Figure XX-B-C in the Supplement**). H19 circulating levels were not correlated with mean PA pressure in PAH (IPAH and CTD-PAH; **Figure XVIII-F** and **XX-D in the Supplement**,

respectively). Contrary to NT-proBNP, however, H19 circulating levels were not significantly influenced by renal function among PAH patients (IPAH; **Figure 7L** and **Figure XVIII-D in the Supplement**, CTD-PAH; **Figure XX-E-F in the Supplement**). We further studied the prognostic value of this potential biomarker in IPAH. During a mean follow-up of  $37\pm 22$  months after blood sample was drawn, 29 IPAH patients died and 9 were transplanted when both cohorts were combined. The event-free survival estimates were 90%, 71% and 63% at 1, 3 and 5 years, respectively. Variables associated with mortality or lung transplant of IPAH are shown in Table VI in the Supplement. Using Cox regression analysis, H19 predicted event-free survival (HR 1.61; 95%CI 1.23-2.11 per log unit,  $p<0.001$ ). IPAH patients with higher H19 circulating levels had a lower long-term survival in each cohort respectively or combined cohorts (**Figure 8A** and **Figure XXI-A-B in the Supplement**). Event-free survival estimates at 1, 3 and 5 years were 98%, 92% and 84% for patients with H19 levels below 37.2 units versus 85%, 54% and 46% for those with H19 levels above 37.2 units (HR 5.7, 95% CI:3.0-10.7,  $P<0.001$ ) (**Figure 8A**). Event-free survival were also lower for IPAH patients with NT-proBNP levels above 300ng/ml (**Figure 8B** and **Figure XXI-C-D in the Supplement**), at intermediate and high-risk using the ESC/ERJ risk score (**Figure 8C** and **Figure XXI-E-F in the Supplement**), at intermediate and high-risk using the REVEAL2.0 score (**Figure 8D** and **Figure XXI-G-H in the Supplement**) or low exercise capacity (**Figure XXI-I-K in the Supplement**). In multivariate analyses incorporating either the ESC/ERS and the REVEAL2.0 risk scores, H19 plasma levels independently predicted long-term event-free survival (**Table VI in the Supplement**). To further evaluate the accuracy of the survival model, we calculated the overall concordance statistic using the C-statistics dealing with censored data.<sup>33</sup> It appeared that models with H19 had larger concordance statistics compared to the model without H19 (**Table VII in the Supplement**). Consistently, H19

circulating levels delineating subgroups of patients with differential prognosis when combined with the NT-proBNP levels (Figure 8E), the ERS/ESC risk score (Figure 8F), REVEAL2.0 risk score (Figure 8G) or exercise capacity (Figure XXI-L in the Supplement). Conversely, NT-proBNP, the ESC/ERJ risk score, REVEAL2.0 risk score or exercise capacity did not predict event-free survival in CTD-PAH patients (Figure XXII in the Supplement). Additionally, there was no association between the future occurrence of adverse events and H19 in CTD-PAH (data not shown).

### Discussion

Although the initial insult in PAH involves the PA vasculature, survival of PAH patients is closely related to RV function.<sup>34-38</sup> Despite the tremendous attention that LV failure has received, RV failure has remained understudied both at the preclinical and clinical levels and is now considered a research priority in PAH.<sup>39</sup> As the two ventricles are in series, failure of either has the same impact, resulting in heart failure syndrome and premature death. Notably, critical differences exist between the LV and the RV in terms of embryologic origin, metabolism, vascularity and response to pressure overload.<sup>40</sup> Overall, the RV is less able to adapt to pressure overload, but has more “plasticity” in its ability to adopt and switch phenotypes. RV adaptation in PAH is a complex process that depends not only on PAH severity, but also on the interplay between myocardial perfusion and metabolism, neuro-hormonal activation, the rate and time of onset of PAH and, although poorly defined, genetic and epigenetic factors.<sup>4</sup> Thus, RV failure is likely to be multifactorial in origin, and molecular mechanisms responsible for the transition from cRV to dRV remain largely unknown.

During the past decade and owing to RNA sequencing technology, the number of lncRNAs linked to heart failure has rapidly growing.<sup>10,11,41-43</sup> Despite increasing evidence, the functions of most of these lncRNAs are still unknown due, at least in part, to their generally low sequence conservation between species limiting translation of *in vitro* discoveries to animal models *in vivo*. Indeed, only few lncRNAs,<sup>10,11,41-43</sup> including H19<sup>13-15</sup> have been experimentally validated as powerful regulators and therapeutic targets in heart failure, with an almost exclusively emphasis on pathological LV remodeling; a condition for which knowledge gained cannot be systematically extrapolated to its counterpart of the right side.

In the present study, we found that H19 is markedly and specifically up-regulated in dRV from PAH patients. In order to get a better understanding of its role in the progression of RV failure, we first categorized for the first time RV function based on end-stage RV failure clinical symptoms and hemodynamics (CO and RVEDP) in two rat models commonly used to mimic right-sided heart failure (PAB and MCT). This categorization replicated the clinical course of PAH patients, as reduced CO and elevated RVEDP were associated with aggravation of clinical symptoms and impaired quality of life in addition to the prognosis in patients with PAH.<sup>44</sup> CO and RVEDP are regulated by the complex interplay of contractility, preload and afterload. This RV categorization was further supported by indirect and non-invasive parameters of RV function measured by echocardiography. Therefore, our categorization could describe the pathological pathways of dRV in animal models which were more similar to the pathogenesis of dRV in patients with PAH. Using this categorization, we demonstrated that the RV-specific up-regulation of H19 observed in PAH patients is replicated in our two animal models. More importantly, we provided evidence that *in vivo* suppression of H19 improves the features of

pathological cardiac remodeling (hypertrophy, fibrosis and capillary rarefaction), thus ameliorating RV function and survival independently of pulmonary hemodynamics.

Intriguingly, the *in vivo* cardioprotective effects of H19 silencing was characterized by concordant and discordant gene expression patterns between each of the two animal models of RV failure. Among the factors whose expression changed following H19 knockdown, enhanced expression of the histone methyltransferase EZH2 was noted in both models. Supportively, inactivation of *Ezh2* targeted to cardiac myocytes was associated with the development of cardiac hypertrophy and fibrosis.<sup>27</sup> Our data demonstrating that H19 knockdown in PE-exposed NRCM isolated from RV or H9c2 prevents hypertrophy and results in E2F1-mediated upregulation of EZH2 expression along with the fact that EZH2 is markedly diminished in failing RV from human and animal models support the notion that H19 exerts negative regulatory inputs on EZH2 expression within the dRV. Moreover, our *in vitro* findings showing that inhibition of EZH2-induced myocyte hypertrophy whereas its overexpression blunted PE-induced hypertrophy suggest that up-regulation of EZH2 likely contributes to the improvement in cardiomyocytes cross-sectional area seen in animals treated with GapmeR H19. The adaptive capacity of the RV likely depends on the complex interplay between cardiomyocyte hypertrophy and contractility, fibrosis, capillary density and nutrient supply, metabolism and the appropriate extracellular network response and cannot be fully explained by one type of cellular response alone. In this sense, we also demonstrated that the therapeutic effect of H19 suppression in animal models is likely not limited to its impact on CMs, as *in vitro* inhibition of H19 in human CFs isolated from control RV prevents their activation while H19 overexpression exerts opposite effects. These findings are consistent with data showing that 1) H19 stimulates proliferation and differentiation of CFs into myofibroblasts in a cell-autonomous manner *in vitro*<sup>17</sup> and 2) ectopic

expression of H19 exacerbates cardiac dilation and fibrosis in mouse hearts following myocardial infarction.<sup>18</sup> Besides negatively regulating the expression of E2F1 and EZH2 in cardiomyocytes, it is likely that H19 impacts the expression of multiples genes associated with RV failure which could thus explain the E2F1/EZH2-independent effects on fibrosis seen in human RV cardiac fibroblasts. For instance, H19/miR-675 axis was also reported to promote cardiomyocyte apoptosis in dilated cardiomyopathy by targeting VDAC1.<sup>45</sup> Furthermore, H19 can interact with and inhibit Y-box-binding protein 1 (YB1) resulting in de-repression of *Coll1 $\alpha$ 1*<sup>18</sup> as well as to sponge multiples miRNAs, such as miR-29b<sup>46</sup> and miR-455<sup>47</sup> known to exert pro-survival and anti-fibrotic effects within the heart and both described in PAH. The mechanism by which H19 regulates cardiac fibrosis in human RV remains to be established and will be the topic of future study.

Biochemical markers emerged within the last decade as an attractive noninvasive and less costly tool for assessment and monitoring of PAH severity. Coupled with clinical parameters, natriuretic peptides were shown to discriminate prognostic groups in large cohorts.<sup>48</sup> Importantly, many biomarkers are largely influenced by variables independent of PAH (e.g. exercise capacity), become elevated in severe/end-stage disease only (e.g. troponin)<sup>49</sup>, are influenced by variables independent of PAH (e.g. renal function) and mainly reflect consequences of PAH on RV function rather than the intrinsic mechanisms contributing to RV dysfunction. Indeed, in heart failure, the main stimulus for natriuretic peptide synthesis and secretion from cardiomyocytes and cardiac fibroblasts are myocardial stretch, neurohormonal activation and hypoxia.<sup>50</sup> Given the paucity of non-invasive biochemical markers available in PAH and nurtured by published data pinpointing the promising potential of circulation H19 for diagnosing acute myocardial infarction,<sup>51</sup> coronary artery disease<sup>51</sup> and various cancers,<sup>52,53</sup> we

sought to determine whether circulating H19 levels may discriminate PAH patients from controls and whether they could predict RV function and outcome in these patients. We found that H19 plasma levels partly discriminate PAH patients from controls, modestly correlate with markers of RV function amongst PAH patients and was predominantly elevated in PAH patients characterized by low CI. Ultimately, higher H19 plasma levels were associated with poorer long-term outcomes in both our discovery and validation cohorts. Interestingly, recent studies have highlighted the importance of multidimensional, comprehensive risk assessment, rather than reliance on isolated parameters, to predict prognosis and guide treatment. The new tools proposed for PAH risk assessment include the “Swedish” method<sup>44</sup> by calculating an integer risk score based on the 2015 ESC/ERS guidelines and REVEAL2.0 risk table. This method are simple, reproducible and have been validated in several cohorts. Interestingly, H19 independently predicted event-free survival in IPAH, thus improving risk stratification when combined to exercise capacity, NT-proBNP, the 2015 ESC/ERS risk score or the REVEAL2.0 risk score. Intriguingly, while discriminating dRV amongst CTD-PAH patients, H19 levels were not associated with long-term outcomes in this subset of patients. This is not surprising given that PAH accounted for only 52% of all deaths in a large cohort of PAH associated with scleroderma,<sup>54</sup> confirming the diverse clinical manifestations and the multiple organs’ involvement of this multifaceted systemic disease.

It must keep in mind that the journey from the discovery of a biomarker to its implementation into clinical practice is long and complex and will require a better understanding of mechanisms responsible for its secretion and elimination, demonstration of its reproducibility, its biological effects and above all the external validation of the added value of H19 measurements in larger PAH cohorts.

### Study limitations

Although a strength in preclinical research, the usage of human rare tissues like human RVs comes with several limitations: 1) control patients had a surgery for a disease not directly related to RV and thus had normal RV functions but are not healthy subjects, therefore the underlying disease can on its own induce variability in H19 and other protein expression profile as seen in our study. To minimize it, we performed multiple measurements using various techniques in the largest cohort possible given the rarity of the samples ; 2) In dRV obtained from warm autopsy in PAH patients who died from RV failure, the correlation between H19 RV expression and hemodynamic data was not possible as in most patients last hemodynamic measurements occurred several months prior the death. To diminish this second limitation, we used 2 independent animal models and correlate circulating H19 levels in PAH patients to the RV hemodynamic measured within day of right heart catheter. From a mechanistic point of view, we did not evaluate the effect of inhibition of miR-675 on pathological cardiac remodeling *in vivo*, although we showed that miR-675 was up-regulated in dRV from MCT and PAB rats and patients with PAH. Second, even though we demonstrated that up-regulation of H19/miR-675 contributes to the downregulation of E2F1/EZH2 axis during the decompensated phase, enhanced expression of E2F1/EZH2 at the compensated stage is likely independent of variation in H19/miR-675 levels. Although at its core, RV hypertrophy is likely driven by a generic program, adaptive and maladaptive RV hypertrophy are each characterized by distinct gene expression changes. Therefore, it can be assumed that various factors necessary for the adaptation response of the adult RV to pressure overload, cooperatively and positively regulate E2F1/EZH2 as an attempt to restrain maladaptive features, thus counterbalancing the slight increase of H19/miR-675 observed at the same period. Third, the mechanisms responsible for

H19 up-regulation in dRV in PAH remain to be investigated. In this regard, several factors including hypoxia and enhanced expression of Bromodomain containing protein (BRD)-4, known to precipitate RV failure,<sup>55</sup> have been shown to trigger H19 expression.<sup>56,57</sup> Deciphering the multiple mechanisms contributing to the up-regulation of H19 in RV failure will certainly be the subject of future studies as it may identify new actionable targets to improve RV function.

In conclusion, we demonstrated for the first time that H19 contributes to the transition from cRV to dRV in the setting of PAH through stimulating cardiomyocyte hypertrophy and fibrosis. Thus, targeting H19 may represent a promising therapeutic avenue for RV failure associated with PAH. Finally, we demonstrated that plasmatic H19 levels showed strong potential as a biomarker in RV failure severity and outcomes in PAH (**Figure 8H**).

#### Acknowledgments

We greatly appreciate the intellectual input from members of the pulmonary hypertension research Group from Québec. We also acknowledge the advice of Serge Simard, senior biostatistician from the IUCPQ Research Centre who performed and reviewed the statistical analyses.

#### Disclosures

None

#### Sources of Funding

OB has been funded by the Canadian Institute of Health Research (CIHR, # IC121617); CMREF/PHBI and is supported by FRQS scholarship. SB and SP hold CIHR; CMREF/PHBI

and heart and Stroke foundation of Canada grants; SB is funded by Dinosaur trust fund from PVRI.

### Authors

Junichi Omura, MD, PhD<sup>1#</sup>; Karima Habbout, MSc<sup>1#</sup>; Tsukasa Shimauchi, MD, PhD<sup>1</sup>;  
Wen-Hui Wu, MD, PhD<sup>1,6</sup>; Sandra Breuils-Bonnet, MSc<sup>1</sup>; Eve Tremblay, BSc<sup>1</sup>;  
Sandra Martineau, MSc<sup>1</sup>; Valérie Nadeau, PhD<sup>1</sup>; Kassandra Gagnon, BSc<sup>1</sup>; Florence Mazoyer,  
BSc<sup>1</sup>; Jean Perron, MD<sup>1</sup>; Francois Potus, PhD<sup>2</sup>; Jian-Hui Lin, MSc<sup>3</sup>; Hamza Zafar, MD<sup>3,4</sup>;  
David G. Kiely MD<sup>3,4</sup>; Allan Lawrie, PhD<sup>3</sup>; Stephen L. Archer, MD<sup>2</sup>; Roxane Paulin, PhD<sup>1,5</sup>;  
Steeve Provencher, MD<sup>1,5</sup>; Olivier Boucherat, PhD<sup>1,5\*</sup>; Sébastien Bonnet, PhD<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec, QC, Canada; <sup>2</sup>Department of Medicine, Queen's University, Kingston, ON, Canada; <sup>3</sup>Department of Infection, Immunity and Cardiovascular Science, University of Sheffield, Sheffield, UK; <sup>4</sup>Sheffield Pulmonary Vascular Disease Unit, Royal Hallamshire Hospital, Sheffield, UK; <sup>5</sup>Department of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada; <sup>6</sup>Department of Cardio-Pulmonary Circulation, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200433, China

<sup>#</sup> Authors have equally contributed

\* Co-corresponding authors: Sébastien Bonnet and Olivier Boucherat

**Supplemental Materials**

Supplemental MATERIALS and METHODS

Supplemental Tables I-X

Supplemental Figures I-XXII

References 58-74

**References**

1. Lau EMT, Giannoulitou E, Celmajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol*. 2017;14:603-614.
2. Humbert M, Sitbon O, Yaici A, Montani D, O'Callaghan DS, Jais X, Parent F, Savale L, Natali D, Gunther S, et al. Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2010;36:549-555.
3. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, et al. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122:156-163.
4. Vonk Noordegraaf A, Chin KM, Haddad F, Hassoun PM, Hennes AR, Hopkins SR, Kawut SM, Langleben D, Lumens J, Naeije R. Pathophysiology of the right ventricle and of the pulmonary circulation in pulmonary hypertension: an update. *Eur Respir J*. 2019;53. DOI: 10.1183/13993003.01900-2018
5. Haddad F, Doyle R, Murphy DJ, Hunt SA. Right ventricular function in cardiovascular disease, part II: pathophysiology, clinical importance, and management of right ventricular failure. *Circulation*. 2008;117:1717-1731.
6. Vonk-Noordegraaf A, Haddad F, Chin KM, Forfia PR, Kawut SM, Lumens J, Naeije R, Newman J, Oudiz RJ, Provencher S, et al. Right heart adaptation to pulmonary arterial hypertension: physiology and pathobiology. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D22-33.
7. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*. 2011;43:904-914.
8. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*. 2007;13:313-316.
9. Greco CM, Condorelli G. Epigenetic modifications and noncoding RNAs in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Rev Cardiol*. 2015;12:488-497.
10. Micheletti R, Plaisance I, Abraham BJ, Sarre A, Ting CC, Alexanian M, Maric D, Maison D, Nemir M, Young RA, et al. The long noncoding RNA Wisper controls cardiac fibrosis and remodeling. *Sci Transl Med*. 2017;9. eaai9118. DOI: 10.1126/scitranslmed.aai9118
11. Wang Z, Zhang XJ, Ji YX, Zhang P, Deng KQ, Gong J, Ren S, Wang X, Chen I, Wang H, et al. The long noncoding RNA Chaer defines an epigenetic checkpoint in cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2016;22:1131-1139.

12. Martinet C, Monnier P, Louault Y, Benard M, Gabory A, Dandolo L. H19 controls reactivation of the imprinted gene network during muscle regeneration. *Development*. 2016;143:962-971.
13. Lee JH, Gao C, Peng G, Greer C, Ren S, Wang Y, Xiao X. Analysis of transcriptome complexity through RNA sequencing in normal and failing murine hearts. *Circ Res*. 2011;109:1332-1341.
14. Greco S, Zaccagnini G, Perfetti A, Fuschi P, Valaperta R, Voellenkle C, Castelvichio S, Gaetano C, Finato N, Beltrami AP, et al. Long noncoding RNA dysregulation in ischemic heart failure. *J Transl Med*. 2016;14:183.
15. Liu L, An X, Li Z, Song Y, Li L, Zuo S, Liu N, Yang G, Wang H, Cheng X, et al. The H19 long noncoding RNA is a novel negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 2016;111:56-65.
16. Zhang Y, Zhang M, Xu W, Chen J, Zhou X. The long non-coding RNA H19 promotes cardiomyocyte apoptosis in dilated cardiomyopathy. *Oncotarget*. 2017;8:28588-28594.
17. Tao H, Cao W, Yang JJ, Shi KH, Zhou X, Liu LP, Li J. Long noncoding RNA H19 controls DUSP5/ERK1/2 axis in cardiac fibroblast proliferation and fibrosis. *Cardiovasc Pathol*. 2016;25:381-389.
18. Choong OK, Chen CY, Zhang J, Lin JH, Lin PJ, Ruan SC, Kamp TJ, Hsieh PCH. Hypoxia-induced H19/YB-1 cascade modulates cardiac remodeling after infarction. *Theranostics*. 2019;9:6550-6567.
19. Bitarafan S, Yari M, Broumand MA, Ghaderian SMH, Rahimi M, Mirfakhraie R, Azizi F, Omrani MD. Association of Increased Levels of lncRNA H19 in PBMCs with Risk of Coronary Artery Disease. *Cell J*. 2019;20:564-568.
20. Zhou X, Yin C, Dang Y, Ye F, Zhang G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci Rep*. 2015;5:11516.
21. Pan Y, Chen H, Shen X, Wang X, Ju S, Lu M, Cong H. Serum level of long noncoding RNA H19 as a diagnostic biomarker of multiple myeloma. *Clin Chim Acta*. 2018;480:199-205.
22. Provencher S, Archer SL, Ramirez FD, Hibbert B, Paulin R, Boucherat O, Lacasse Y, Bonnet S. Standards and Methodological Rigor in Pulmonary Arterial Hypertension Preclinical and Translational Research. *Circ Res*. 2018;122:1021-1032.
23. Sciarretta S, Forte M, Frati G, Sadoshima J. New Insights Into the Role of mTOR Signaling in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2018;122:489-505.
24. Dewenter M, von der Lieth A, Katus HA, Backs J. Calcium Signaling and Transcriptional Regulation in Cardiomyocytes. *Circ Res*. 2017;121:1000-1020.
25. Salt IP, Hardie DG. AMP-Activated Protein Kinase: An Ubiquitous Signaling Pathway With Key Roles in the Cardiovascular System. *Circ Res*. 2017;120:1825-1841.
26. Troncoso R, Ibarra C, Vicencio JM, Jaimovich E, Lavandero S. New insights into IGF-1 signaling in the heart. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25:128-137.
27. Delgado-Olguin P, Huang Y, Li X, Christodoulou D, Seidman CE, Seidman JG, Tarakhovskiy A, Bruneau BG. Epigenetic repression of cardiac progenitor gene expression by Ezh2 is required for postnatal cardiac homeostasis. *Nat Genet*. 2012;44:343-347.
28. Kerkela R, Ulvila J, Magga J. Natriuretic Peptides in the Regulation of Cardiovascular Physiology and Metabolic Events. *J Am Heart Assoc*. 2015;4:e002423.
29. Ma L, Tian X, Guo H, Zhang Z, Du C, Wang F, Xie X, Gao H, Zhuang Y, Kormann M,

- et al. Long noncoding RNA H19 derived miR-675 regulates cell proliferation by down-regulating E2F-1 in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Cancer*. 2018;9:389-399.
30. Lee SR, Roh YG, Kim SK, Lee JS, Seol SY, Lee HH, Kim WT, Kim WJ, Heo J, Cha HJ, et al. Activation of EZH2 and SUZ12 Regulated by E2F1 Predicts the Disease Progression and Aggressive Characteristics of Bladder Cancer. *Clin Cancer Res*. 2015;21:5391-5403.
  31. Zhang Z, Gao W, Long QQ, Zhang J, Li YF, Liu DC, Yan JJ, Yang ZJ, Wang LS. Increased plasma levels of lncRNA H19 and LIPCAR are associated with increased risk of coronary artery disease in a Chinese population. *Sci Rep*. 2017;7:7491.
  32. Luo J, Li Q, Pan J, Li L, Fang L, Zhang Y. Expression level of long noncoding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther*. 2018;14:860-863.
  33. Uno H, Cai T, Pencina MJ, D'Agostino RB, Wei LJ. On the C-statistics for evaluating overall adequacy of risk prediction procedures with censored survival data. *Stat Med*. 2011;30:1105-1117.
  34. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT, et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Ann Intern Med*. 1991;115:343-349.
  35. Forfia PR, Fisher MR, Mathai SC, Houston-Harris T, Hemnes AR, Borlaug BA, Chamara E, Corretti MC, Champion HC, Abraham TP, et al. Tricuspid annular displacement predicts survival in pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;174:1034-1041.
  36. Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, et al. Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010;122:164-172.
  37. Mauritz GJ, Kind T, Marcus JT, Bogaard HJ, van de Veerdonk M, Postmus PE, Boonstra A, Westerhof N, Vonk-Noordegraaf A. Progressive changes in right ventricular geometric shortening and long-term survival in pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2012;141:935-943.
  38. Courand PY, Pina Jomir G, Khouatra C, Scheiber C, Turquier S, Glerant JC, Mastroianni B, Gentil B, Blanchet-Legens AS, Dib A, et al. Prognostic value of right ventricular ejection fraction in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2015;45:139-149.
  39. Lahm T, Douglas IS, Archer SL, Bogaard HJ, Chesler NC, Haddad F, Hemnes AR, Kawut SM, Kline JA, Kolb TM, et al. Assessment of Right Ventricular Function in the Research Setting: Knowledge Gaps and Pathways Forward. An Official American Thoracic Society Research Statement. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:e15-e43.
  40. Buckingham M, Meilhac S, Zaffran S. Building the mammalian heart from two sources of myocardial cells. *Nat Rev Genet*. 2005;6:826-835.
  41. Di Salvo TG, Guo Y, Su YR, Clark T, Brittain E, Absi T, Maltais S, Hemnes A. Right ventricular long noncoding RNA expression in human heart failure. *Pulm Circ*. 2015;5:135-161.
  42. Viereck J, Kumarswamy R, Foinquinos A, Xiao K, Avramopoulos P, Kunz M, Dittrich

- M, Maetzig T, Zimmer K, Remke J, et al. Long noncoding RNA Chast promotes cardiac remodeling. *Sci Transl Med*. 2016;8:326ra322.
43. Yu J, Yang Y, Xu Z, Lan C, Chen C, Li C, Chen Z, Yu C, Xia X, Liao Q, et al. Long Noncoding RNA Ahit Protects Against Cardiac Hypertrophy Through SUZ12 (Suppressor of Zeste 12 Protein Homolog)-Mediated Downregulation of MEF2A (Myocyte Enhancer Factor 2A). *Circ Heart Fail*. 2020;13:e006525.
  44. Kylhammar D, Kjellstrom B, Hjalmarsson C, Jansson K, Nisell M, Soderberg S, Wikstrom G, Radegran G. A comprehensive risk stratification at early follow-up determines prognosis in pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J*. 2018;39:4175-4181.
  45. Li X, Wang H, Yao B, Xu W, Chen J, Zhou X. lncRNA H19/miR-675 axis regulates cardiomyocyte apoptosis by targeting VDAC1 in diabetic cardiomyopathy. *Sci Rep*. 2016;6:36340.
  46. Tang Y, He R, An J, Deng P, Huang L, Yang W. The effect of H19-miR-29b interaction on bleomycin-induced mouse model of idiopathic pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016;479:417-423.
  47. Huang ZW, Tian LH, Yang B, Guo RM. Long Noncoding RNA H19 Acts as a Competing Endogenous RNA to Mediate CTGF Expression by Sponging miR-455 in Cardiac Fibrosis. *DNA Cell Biol*. 2017;36:759-766.
  48. Boucly A, Weatherald J, Savale L, Jais X, Cottin V, Prevot G, Picard F, de Groote P, Jevnikar M, Bergot E, et al. Risk assessment, prognosis and guideline implementation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2017;50:1700889.
  49. Torbicki A, Kurzyna M, Kuca P, Fijalkowska A, Sikora J, Florczyk M, Pruszczyk P, Burakowski J, Wawrzynska L. Detectable serum cardiac troponin T as a marker of poor prognosis among patients with chronic precapillary pulmonary hypertension. *Circulation*. 2003;108:844-848.
  50. Gardner DG, Chen S, Glenn DJ, Grigsby CL. Molecular biology of the natriuretic peptide system: implications for physiology and hypertension. *Hypertension*. 2007;49:419-426.
  51. Wang XM, Li XM, Song N, Zhai H, Gao XM, Yang YN. Long non-coding RNAs H19, MALAT1 and MIAT as potential novel biomarkers for diagnosis of acute myocardial infarction. *Biomed Pharmacother*. 2019;118:109208.
  52. Yoruker EE, Keskin M, Kulle CB, Holdenrieder S, Gezer U. Diagnostic and prognostic value of circulating lncRNA H19 in gastric cancer. *Biomed Rep*. 2018;9:181-186.
  53. Zhang K, Luo Z, Zhang Y, Zhang L, Wu L, Liu L, Yang J, Song X, Liu J. Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomark*. 2016;17:187-194.
  54. Kolstad KD, Li S, Steen V, Chung L, Investigators P. Long-Term Outcomes in Systemic Sclerosis-Associated Pulmonary Arterial Hypertension From the Pulmonary Hypertension Assessment and Recognition of Outcomes in Scleroderma Registry (PHAROS). *Chest*. 2018;154:862-871.
  55. Van der Feen DE, Kurakula K, Tremblay E, Boucherat O, Bossers GPL, Szulcek R, Bourgeois A, Lampron MC, Habbout K, Martineau S, et al. Multicenter Preclinical Validation of BET Inhibition for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2019;200:910-920.
  56. Gong LC, Xu HM, Guo GL, Zhang T, Shi JW, Chang C. Long Non-Coding RNA H19

- Protects H9c2 Cells against Hypoxia-Induced Injury by Targeting MicroRNA-139. *Cell Physiol Biochem*. 2017;44:857-869.
57. Pastori C, Kapranov P, Penas C, Peschansky V, Volmar CH, Sarkaria JN, Bregy A, Komotar R, St Laurent G, Ayad NG, et al. The Bromodomain protein BRD4 controls HOTAIR, a long noncoding RNA essential for glioblastoma proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:8326-8331.
  58. Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, Lampron MC, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, et al. HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension. *Sci Rep*. 2017;7:4546.
  59. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, 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*. 2016;37:67-119.
  60. Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, 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 Respir J*. 2015;46:903-975.
  61. Benza RL, Miller DP, Foreman AJ, Frost AE, Badesch DB, Benton WW, McGoon MD. Prognostic implications of serial risk score assessments in patients with pulmonary arterial hypertension: a Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL) analysis. *J Heart Lung Transplant*. 2015;34:356-361.
  62. Tofovic SP. Estrogens and development of pulmonary hypertension: interaction of estradiol metabolism and pulmonary vascular disease. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2010;56:696-708.
  63. Potus F, Ruffenach G, Dahou A, Thebault C, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Nadeau V, Paradis R, Graydon C, Wong R, et al. Downregulation of microRNA-126 contributes to the failing right ventricle in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2015;132:932-943.
  64. Fulton RM, Hutchinson EC, Jones AM. Ventricular weight in cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 1952;14:413-420.
  65. Kikuchi N, Satoh K, Kurosawa R, Yaoita N, Elias-Al-Mamun M, Siddique MAH, Omura J, Satoh T, Nogi M, Sunamura S, et al. Selenoprotein P promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2018;138:600-623.
  66. Augustine DX, Coates-Bradshaw LD, Willis J, Harkness A, Ring L, Grapsa J, Coghlan G, Kaye N, Oxborough D, Robinson S, et al. Echocardiographic assessment of pulmonary hypertension: a guideline protocol from the British Society of Echocardiography. *Echo Res Pract*. 2018;5:G11-G24.
  67. Bourgeois A, Lambert C, Habbout K, Ranchoux B, Paquet-Marceau S, Trinh I, Breuils-Bonnet S, Paradis R, Nadeau V, Paulin R, et al. FOXM1 promotes pulmonary artery

- smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)*. 2018;96:223-235.
68. Shimauchi T, Numaga-Tomita T, Ito T, Nishimura A, Matsukane R, Oda S, Hoka S, Ide T, Koitabashi N, Uchida K, et al. TRPC3-Nox2 complex mediates doxorubicin-induced myocardial atrophy. *JCI Insight*. 2017;2. e93358. DOI: 10.1172/jci.insight.93358.
  69. de Man FS, Handoko ML, van Ballegoij JJ, Schalij I, Bogaards SJ, Postmus PE, van der Velden J, Westerhof N, Paulus WJ, Vonk-Noordegraaf A. Bisoprolol delays progression towards right heart failure in experimental pulmonary hypertension. *Circ Heart Fail*. 2012;5:97-105.
  70. Bogaard HJ, Natarajan R, Mizuno S, Abbate A, Chang PJ, Chau VQ, Hoke NN, Kraskauskas D, Kasper M, Salloum FN, et al. Adrenergic receptor blockade reverses right heart remodeling and dysfunction in pulmonary hypertensive rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:652-660.
  71. Tian L, Potus F, Wu D, Dasgupta A, Chen KH, Mewburn J, Lima P, Archer SL. Increased Drp1-Mediated Mitochondrial Fission Promotes Proliferation and Collagen Production by Right Ventricular Fibroblasts in Experimental Pulmonary Arterial Hypertension. *Front Physiol*. 2018;9:828.
  72. Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, et al. Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2015;117:525-535.
  73. Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, Nadeau V, Breuils-Bonnet S, Boilet-Molez S, Potus F, Meloche J, Chabot S, Lambert C, et al. Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2018;198:90-103.
  74. Benza RL, Gomberg-Maitland M, Elliott CG, Farber HW, Foreman AJ, Frost AE, McGoon MD, Pasta DJ, Selej M, Burger CD, et al. Predicting Survival in Patients With Pulmonary Arterial Hypertension: The REVEAL Risk Score Calculator 2.0 and Comparison With ESC/ERS-Based Risk Assessment Strategies. *Chest*. 2019;156:323-337.

**Table 1.** Criteria used to define normal compensated RV (cRV) and decompensated RV (dRV) for human and animal models.

	Group	Definition	Hemodynamics before collecting samples*		
			RVSP <sup>†</sup> (mmHg)	CO <sup>‡</sup> (ml/min)	RVEDP <sup>†</sup> (mmHg)
<b>Human</b>	<b>CTRL</b>	subjects with normal RV function or no medical history	-	-	-
	<b>cRV</b>	subjects with RV dilatation and preserved CI (CI > 2.2 L/min/m <sup>2</sup> ) by echocardiography	-	-	-
	<b>dRV</b>	PAH patients who died due to RV failure	-	-	-
<b>MCT rat<sup>§</sup></b>	<b>CTRL</b>	rats which received saline	27.7 ± 0.8	102.1 ± 3.6	1.7 ± 0.2
	<b>early cRV</b>	MCT rats exhibiting PH without an end-stage of RV failure sign <sup>†</sup> and with preserved CO (CO > 85.7 ml/min)	55.8 ± 2.8	95.7 ± 1.7	3.2 ± 0.4
	<b>late cRV</b>	MCT rats exhibiting PH without an end-stage of RV failure sign <sup>†</sup> and with mild reduced CO (85.7 ml/min > CO > 61.3 ml/min)	64.4 ± 3.1	73.2 ± 1.6	3.9 ± 1.6
	<b>early dRV</b>	MCT rats exhibiting PH without an end-stage of RV failure sign <sup>†</sup> and met one of the following criteria: 1. severe reduced CO (CO < 61.3 ml/min) without elevated RVEDP (RVEDP < 7.7 mmHg) 2. mild reduced CO (85.7 ml/min > CO > 61.3 ml/min) with elevated RVEDP (RVEDP > 7.7 mmHg)	71.5 ± 2.6	59.2 ± 2.8	5.7 ± 0.4
	<b>late dRV</b>	MCT rats exhibiting PH <sup>†</sup> and an end-stage of RV failure sign <sup>†</sup>	78.2 ± 2.2	56.1 ± 1.4	9.8 ± 0.6
	<b>sham</b>	rats which underwent thoracotomy alone	28.6 ± 0.9	116.1 ± 5.8	0.9 ± 0.2
<b>PAB rat<sup>§</sup></b>	<b>cRV</b>	PAB rats without any end-stage of RV failure sign <sup>†</sup>	83.8 ± 3.3	99.3 ± 6.2	1.5 ± 0.3
	<b>dRV</b>	PAB rats with end-stage of RV failure signs <sup>†</sup>	76.9 ± 3.6	49 ± 6.3	6.1 ± 0.5

Data are expressed as mean ± SEM. RV, right ventricle/ventricular; CTRL, control; cRV, compensated RV; dRV, decompensated RV; RVSP, RV systolic pressure; CO, cardiac output; RVEDP, RV end-diastolic pressure.

<sup>†</sup> an end-stage of RV failure sign: death or the sever clinical symptom from RV failure (ruffled fur, red discoloration of head and neck, less active than previously and decreased food consumption defined as less than 5 g per day).

<sup>‡</sup> Measured by closed-chest right heart catheterization.

<sup>§</sup> PH was confirmed by closed-chest right heart catheterization (RVSP > 40 mmHg)

<sup>¶</sup> PAB was confirmed by echocardiography (peak velocity above 3.5 m/s at banding site)

### Figure Legends

#### Figure 1. H19 up-regulation in human PAH patients with decompensated RV.

(A) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses of H19 in human RVs from controls (CTRL), compensated RV (cRV) and decompensated RV (dRV). (B) and (C) qRT-PCR analyses of miR-675-5p (B) and miR-675-3p (C) in human RVs from CTRL, cRV and dRV. (D) qRT-PCR analyses of H19 in human LVs from CTRL and PAH patients. (E) qRT-PCR analyses of H19 in lungs from CTRL and PAH patients. (F) Representative images of H19 *in situ* hybridization in human RVs from CTRL, cRV and dRV. Blue dots represent signal from the H19 probe. Right pictures show high-magnification imaging performed in the area delimited by the dotted square. (G) Representative images of human RVs stained with Masson-trichrome or hematoxylin and eosin. (H) Quantitative analysis of fibrotic area in human RVs from CTRL, cRV and dRV. (I) Quantitative analysis of cardiomyocyte cross-sectional area in human RVs from CTRL, cRV and dRV. (J and K) Correlations between H19 expression levels and fibrosis area (Pearson  $R^2 = 0.47$ ,  $p = 0.0001$ ) or cardiomyocyte cross-sectional area (Pearson  $R^2 = 0.55$ ,  $p < 0.0001$ ) in human RV. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 7-14$  patients/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . miR-675, microRNA-675; LV, left ventricle; PAH, pulmonary arterial hypertension, RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; CTRL, control; RV, right ventricle; cRV, compensated right ventricle; dRV, decompensated RV.

**Figure 2. H19 is overexpressed in decompensated RV from monocrotaline (MCT) or pulmonary artery banding (PAB) rat models of RV failure.**

(A and B) Measurements of cardiac output (CO, A) and right ventricular end-diastolic pressure (RVEDP, B) in control (CTRL) and MCT rats and subsequent categorization of MCT rats in early and late compensated RV (cRV), early and late decompensated (dRV). (C) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses of H19 in RVs from CTRL and MCT rats with early cRV, late cRV, early dRV and late dRV. (D) qRT-PCR analyses of miR-675-3p in RVs from CTRL and MCT rats with early cRV, late cRV, early dRV and late dRV. (E) Left, Representative images of RVs stained with Masson-trichrome or hematoxylin and eosin from CTRL or MCT rat with cRV or dR. Right, Correlation between H19 expression levels and RV fibrosis area (Pearson  $R^2 = 0.32$ ,  $p < 0.0001$ ) or cardiomyocyte cross-sectional area (Pearson  $R^2 = 0.28$ ,  $p < 0.0001$ ). (F and G) CO (F) and TAPSE (G) were measured by echocardiography in sham and PAB rats presenting cRV or dRV. (H) qRT-PCR analyses of H19 in RVs from sham, PAB rats with cRV and PAB rats with dRV. (I) qRT-PCR analyses of miR-675-3p in RVs from sham, PAB rats with cRV and PAB rats with dRV. (J) Left, Representative images of RVs stained with Masson-trichrome or hematoxylin and eosin from sham or PAB rats with cRV or dRV. Right, Correlation between H19 expression levels and RV fibrosis (Pearson  $R^2 = 0.44$ ,  $p = 0.0003$ ) or cardiomyocyte cross-sectional area (Pearson  $R^2 = 0.27$ ,  $p = 0.011$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 7-21$  rats/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . miR-675, microRNA-675; RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; RV, right ventricle; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion.

**Figure 3. Suppression of H19 improves RV function in the monocrotaline (MCT) rat model.**

(A) Overview of the experimental setup of GapmeRs injection in the MCT rat model. At 2 weeks after MCT injection, GapmeR control (CTRL) or H19-targeting GapmeRs (10mg/kg, i.p.) were injected in rats once a week over a period of two weeks. Echocardiography was performed before and every week after GapmeR injection. Rats underwent right heart catheterization at the end of the protocol. (B) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of H19 in RVs from control (CTRL) and MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (C) Kaplan-Meier curve of MCT rats showing a survival benefit for rats treated with GapmeR H19 compared to GapmeR CTRL (Log-rank test). (D-H) Cardiac output (CO, D), stroke volume (SV, E), TAPSE (F), S wave (G) and end-diastolic RV diameter (RVEDD, H) were measured by echocardiography in MCT rats treated with GapmeR control or GapmeR H19. (I) Representative echocardiographic images of RV and LV in MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19 at two weeks after GapmeR treatment was initiated. (J-M) RV systolic pressure (RVSP, J), CO (K), RV end-diastolic pressure (RVEDP, L) and total pulmonary resistance (TPR, M) were measured by right heart catheterization in CTRL and MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (N) Representative images of RVs stained with Masson-trichrome or hematoxylin and eosin from CTRL and MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (O and P) Quantification of fibrosis (O) and cardiomyocyte cross-sectional area (P) in RVs from CTRL and MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (Q and R) qRT-PCR analyses of collagen type III  $\alpha 1$  (*Col3a1*, Q) and B-type natriuretic peptide (*Nppb*, R) in RVs from CTRL and MCT rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. n = 6-14 rats/group.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; RV, right ventricle; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion.

**Figure 4. Inhibition of H19 improved RV function in the pulmonary artery banding (PAB) rat model.**

(A) Overview of the experimental setup of GapmeRs injection. At 3 weeks after PAB surgery, control (CTRL) or H19-targeting GapmeRs (10mg/kg, i.p.) were injected in rats once a week over a period of five weeks. (B) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of H19 in RVs from sham, PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (C-G) Pressure gradient (PG, C) at PAB site, cardiac output (CO, D), TAPSE (E), S wave (F) and end-diastolic RV diameter (RVEDD, G) were measured by echocardiography performed before and every week after GapmeR injection in sham and PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (H) Representative echocardiographic images of RV and LV in PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19 at five weeks after initiation of the treatment. (I-L) RV systolic pressure (RVSP, I), CO (J), RV end-diastolic pressure (RVEDP, K) and stroke volume (SV, L) were measured by right heart catheterization at the end of the protocol in sham and PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (M) Left, Representative images of RV stained with Masson-trichrome or hematoxylin and eosin from sham and PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. Right, Quantitative analyses of fibrotic area and cardiomyocyte cross-sectional area in RVs from sham and PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (N-O) qRT-PCR analyses of collagen type III  $\alpha 1$  (*Col3a1*, N) and B-type natriuretic peptide (*Nppb*, O) in RVs from sham and PAB rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. n = 5-9 rats/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and

\*\*\*\* $p < 0.0001$ . RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; RV, right ventricle; TAPSE, tricuspid annular plane systolic excursion.

**Figure 5. Improvement of RV function after H19 knockdown in animal models is associated with up-regulation of EZH2.**

(A-B) Representative immunoblot, corresponding densitometric analysis of EZH2 (A) and quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of *EZH2* (B) in RVs from control and monocrotaline (MCT) rats treated with GapmeR control (CTRL) or GapmeR H19. (C-D) Representative immunoblot, corresponding densitometric analysis of EZH2 (C) and qRT-PCR analysis of *EZH2* (D) in RVs from sham and pulmonary artery banding (PAB) rats treated with GapmeR CTRL or GapmeR H19. (E-F) Representative immunoblot blot and corresponding densitometric analysis of EZH2 (E) and qRT-PCR analysis of *EZH2* (F) in human RVs from CTRL, compensated RV (cRV) and decompensated RV (dRV). (G) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of EZH2 in RVs from CTRL and MCT rats in early cRV, late cRV, early dRV and late dRV. (H) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of EZH2 in RVs from sham, PAB rats with cRV and PAB rats with dRV. Protein expression was normalized to AB. Data are presented as mean  $\pm$  SEM.  $n = 5-14$  samples/group. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . AB, amido black; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; RV, right ventricle.

**Figure 6. Effects of H19 gain- and loss-of-function on cardiomyocytes hypertrophy.**

(A-E) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of H19 and miR-675-3p (A), quantitative analysis of cell surface area (B), qRT-PCR analysis of B-type natriuretic peptide (*Nppb*) (C),

Atrial natriuretic peptide (*Nppa*) (D) and *Myh7/Myh6* ratio (E) in cardiomyocytes isolated from RV neonatal rats (RV-NRCMs) treated with scrambled siRNA (siSCRM) or siH19 (50 nmol/L) for 24 hours followed by stimulation of phenylephrine (PE, 50  $\mu$ mol/L) for 24 hours. (F and G) Representative images and corresponding quantification of cell surface area (F) and qRT-PCR analysis of *Nppb* (G) in H9c2 infected with an adenovirus coding for H19 (AdH19, 100 MOI) or a control backbone adenovirus (AdNull) for 48 hours. (H-J) qRT-PCR analysis of miR-675-3p (H), representative images and corresponding quantitative analysis of cell surface area (I), and qRT-PCR analysis of *Nppb* (J) in H9c2 treated with mimic negative control (mimic-CTRL) or mimic miR-675-3p (mimic-675, 5 nmol/L) for 24 hours. (K) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of EZH2 as well as qRT-PCR analysis of *EZH2* in RV-NRCMs treated with scrambled siRNA (siSCRM) or siH19 (50 nmol/L) for 24 hours followed by stimulation of PE (50  $\mu$ mol/L) for 24 hours. (L) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of EZH2 in H9c2 treated with mimic negative control (mimic-CTRL) or mimic miR-675-3p (mimic-675, 5 nmol/L) for 24 hours. (M) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of E2F1 in RV-NRCMs treated with siSCRM or siH19 (50 nmol/L) for 24 hours followed by stimulation of PE (50  $\mu$ mol/L) for 24 hours. (N) Representative immunoblot and corresponding densitometric analysis of E2F1 and EZH2 in H9c2 treated siSCRM or siE2F1 (50 nmol/L) for 24 hours. Protein expression was normalized to AB. Data are presented as mean  $\pm$  SEM. n = 3/group. \*p<0.05, \*\*p<0.01 and \*\*\*p<0.001. AB, amido black; E2F1, E2F transcription factor 1; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction.

**Figure 7. H19 expression levels are increased in plasma from IPAH patients of 2 cohorts and correlate with disease severity.**

(A-C) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analyses of H19 in plasma from control (CTRL) and patients with IPAH of 2 cohorts from Canada (57 CTRL and 52 IPAH) and UK (54 CTRL and 75 IPAH). H19 levels were higher in patients with IPAH (A for Canada, B for UK and C for combined cohorts). (D-F) According to contemporary cardiac index (CI) measured by right heart catheterization at the time blood sample was drawn, IPAH patients were categorized as compensated RV (cRV,  $CI > 2.2 \text{ L/min/m}^2$ ,  $n = 33$  and  $31$  for IPAH patients from Canada and UK, respectively) and decompensated RV (dRV,  $CI \leq 2.2 \text{ L/min/m}^2$ ,  $n = 19$  and  $40$  for IPAH patients from Canada and UK respectively). H19 levels was higher in IPAH patients with dRV (D for Canada, E for UK and F for combined cohorts). (G-I) Receiving Operating Characteristic (ROC) curves for H19 plasma blood level discriminated IPAH patients with dRV from IPAH patients with cRV (G, area under the curve (AUC) = 0.73; 95%CI 0.60-0.87,  $p = 0.005$  in Canada cohort; H, AUC = 0.74; 95%CI 0.63-0.86,  $p = 0.0005$  in UK; I, AUC = 0.71; 95%CI 0.62-0.80,  $p < 0.0001$  in combined cohorts). (J-L) Among IPAH patients from Canada (red dots) and UK (blue dots), H19 circulating levels correlated with CI (J,  $n = 123$ , Spearman rank correlation  $r = -0.36$ ,  $p = 0.002$ ) and NT-proBNP (K,  $n = 97$ , Spearman rank correlation  $r = 0.56$ ,  $p < 0.0001$ ). No significant relationship between H19 and eGFR was observed (L,  $n = 91$ , Spearman rank correlation  $r = -0.20$ ,  $p = 0.055$ ). Data are presented as mean  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ . Red dots and Blue dots demonstrate data from Canada and UK respectively. CI, cardiac index; eGFR, eGFR, estimating glomerular filtration rate; IPAH, idiopathic pulmonary arterial hypertension; NT-proBNP, N-terminal pro b-type natriuretic peptide; RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction.

**Figure 8. H19 expression levels correlate with prognosis of IPAH patients.**

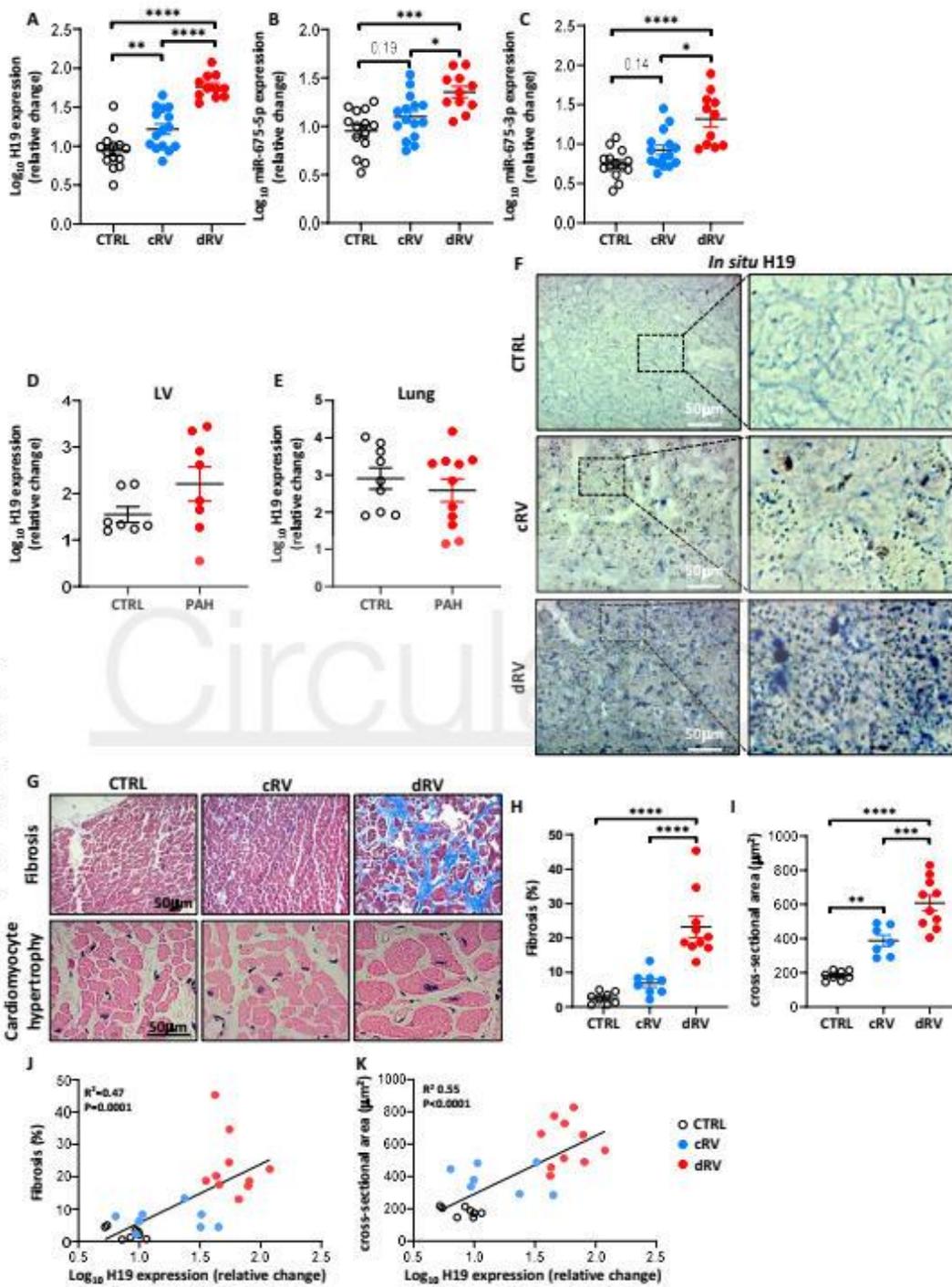
(A) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the individual and combined IPAH cohorts to the plasma H19 levels. The cut-off value of H19 plasma blood level measured by quantitative RT-PCR (qRT-PCR) was defined based on Receiving Operating Characteristic (ROC) curves for H19 plasma blood level discriminated IPAH patients with adverse events (death or lung transplant) from those without adverse events in combined Canada and UK cohorts (area under the curve (AUC) = 0.70; 95%CI 0.60-0.79,  $p = 0.0004$ ). IPAH patients with lower plasma H19 levels had a better long-term survival ( $p < 0.0001$ , Log-rank test). Event-free survival estimates at 1, 3 and 5 years of 98%, 92% and 84% for IPAH patients with H19 levels below 37.2 units versus 85%, 54% and 46% for those with H19 levels above 37.2 units in the combined cohort.

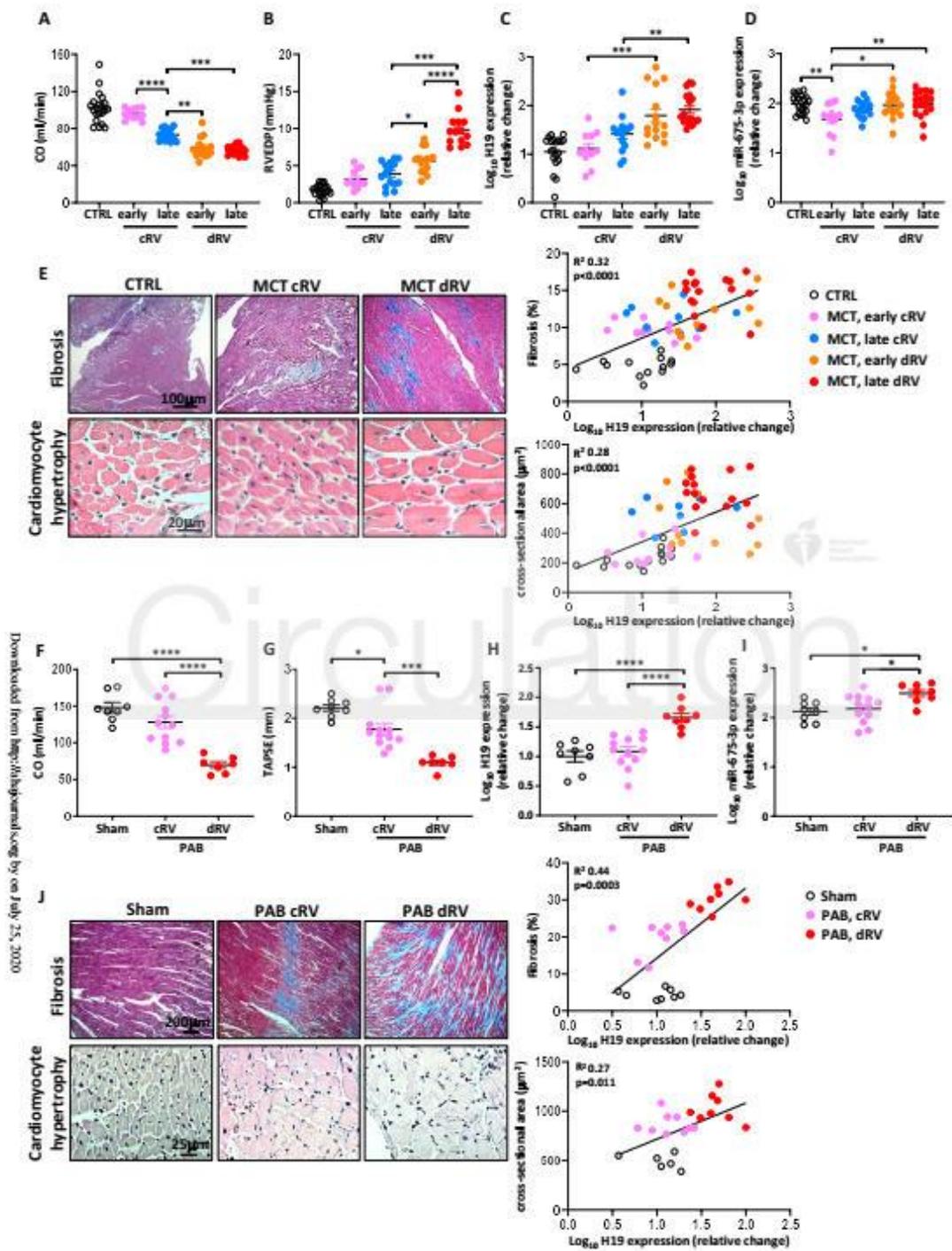
(B) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts according to NT-proBNP plasma levels. The cut-off value of NT-proBNP was defined using the 2015 European Society of Cardiology/European Respiratory Society guidelines (NT-proBNP value, 300 pg/ml).

(C) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts with patients categorized as low-, intermediate-, or high-risk using the 2015 European Society of Cardiology/European Respiratory Society risk stratification strategy using 6 clinical parameters (WHO functional class, 6-minute walking distance, NT-proBNP, mean right atrial pressure, CI, and SvO<sub>2</sub>, as previously described ( $p = 0.0055$ , Log-rank test).

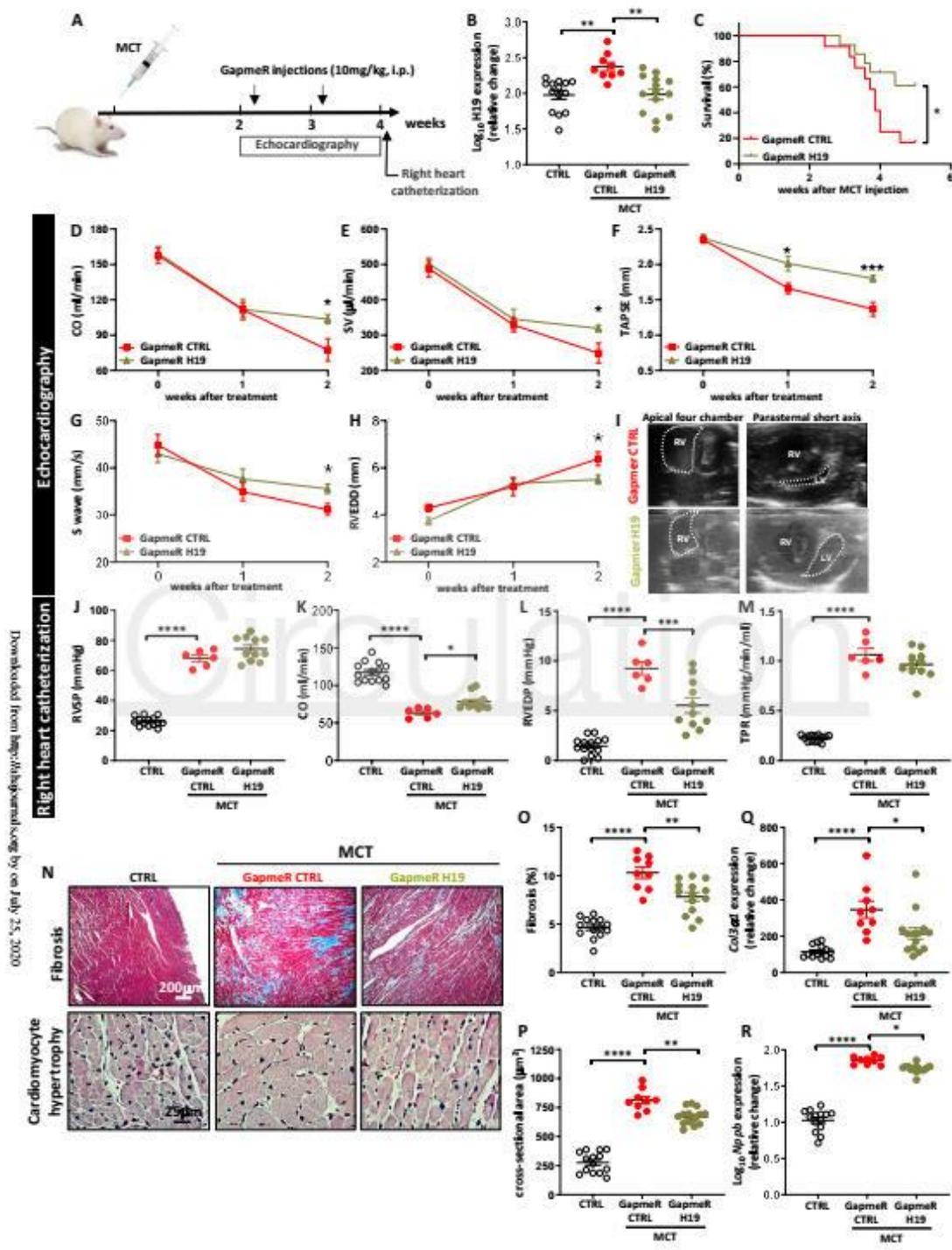
(D) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts with patients categorized as low-, intermediate-, or high-risk using the REVEAL2.0 risk score using clinical parameters (different types of PAH, age, comorbidities, WHO functional class, 6-minute walking distance, NT-proBNP, vital signs, certain blood tests, pulmonary function tests, echocardiography, right heart catheterization and information from previous hospitalizations) as previously described ( $p =$

0.0004, Log-rank test). (E) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts according to NT-proBNP and H19 plasma levels using cut-off values described above. The addition of H19 improved risk stratification of IPAH patients with high and low NT-proBNP plasma levels ( $p = 0.0026$ , Log-rank test). (F) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts according to ESC/ERS risk score and H19 plasma levels using cut-off values described above. The addition of H19 improved risk stratification of IPAH patients with low-, intermediate- and high-risk score ( $p < 0.0001$ , Log-rank test). (G) Kaplan-Meier estimates of event-free survival of the combined IPAH cohorts according to REVEAL2.0 risk score and H19 plasma levels using cut-off values described above. The addition of H19 improved risk stratification of IPAH patients with low-, intermediate- and high-risk score ( $p < 0.0001$ , Log-rank test). (H) Schematic representation of the H19/E2F1/EZH2 axis promoting the transition from adaptive RV hypertrophy (compensated form) characterized by preserved cardiac output (CO) to RV Failure (decompensated form) characterized by decreased CO. H19 is increased in the RV when RV function is impaired and categorized as decompensated form after sustained increases in afterload. E2F1/EZH2 is suppressed as a result of H19 up-regulation, which facilitates RV failure process (cardiac hypertrophy and fibrosis). The H19 level in plasma is increased when RV is categorized as RV failure. CI, cardiac index; IPAH, idiopathic pulmonary arterial hypertension; SvO<sub>2</sub>, mixed venous oxygen saturation; NT-proBNP, N-terminal pro b-type natriuretic peptide; RT-PCR, Real-time polymerase chain reaction; RV, right ventricle; WHO, World Health Organization.

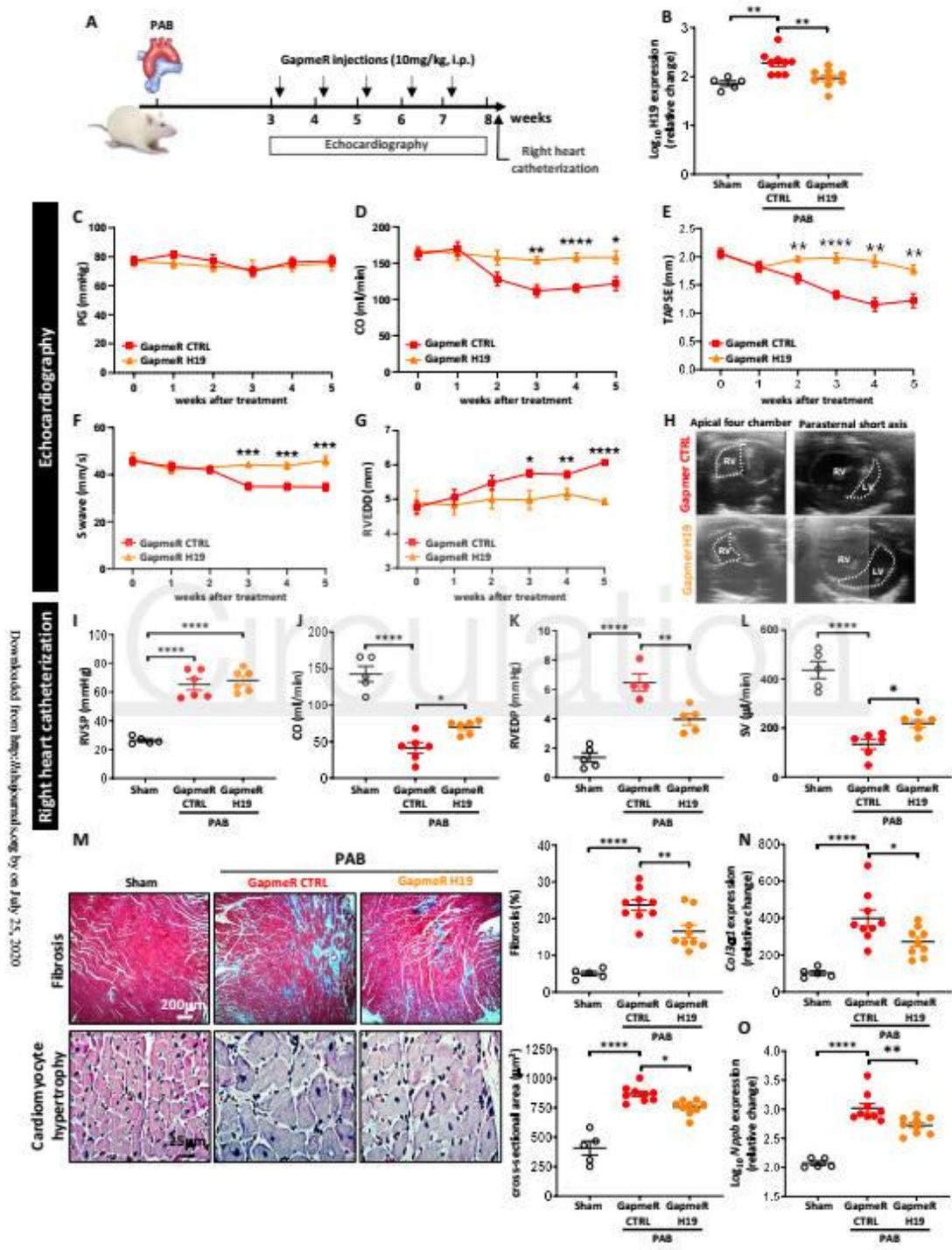




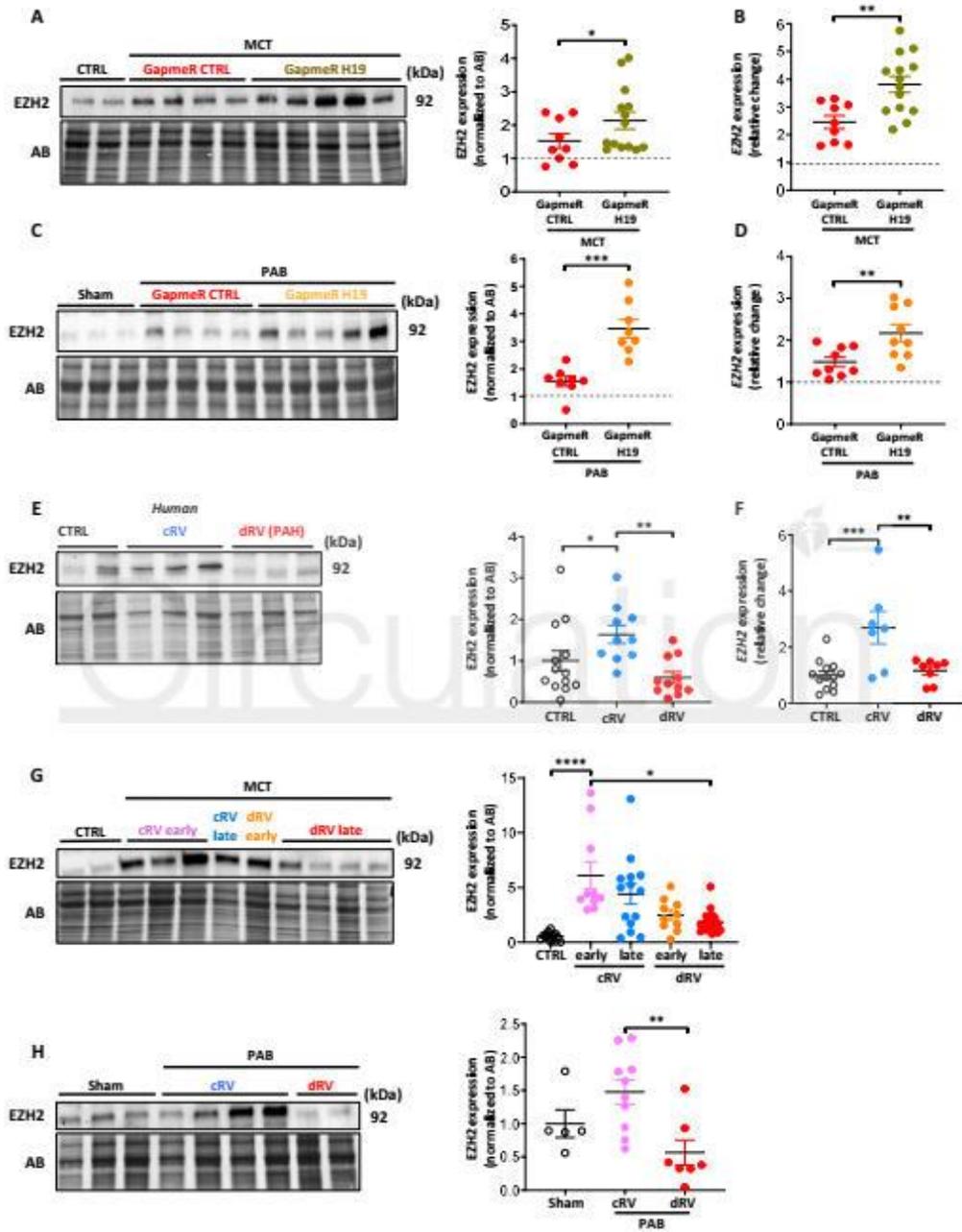
Downloaded from <http://ahajournals.org/> by on July 25, 2020

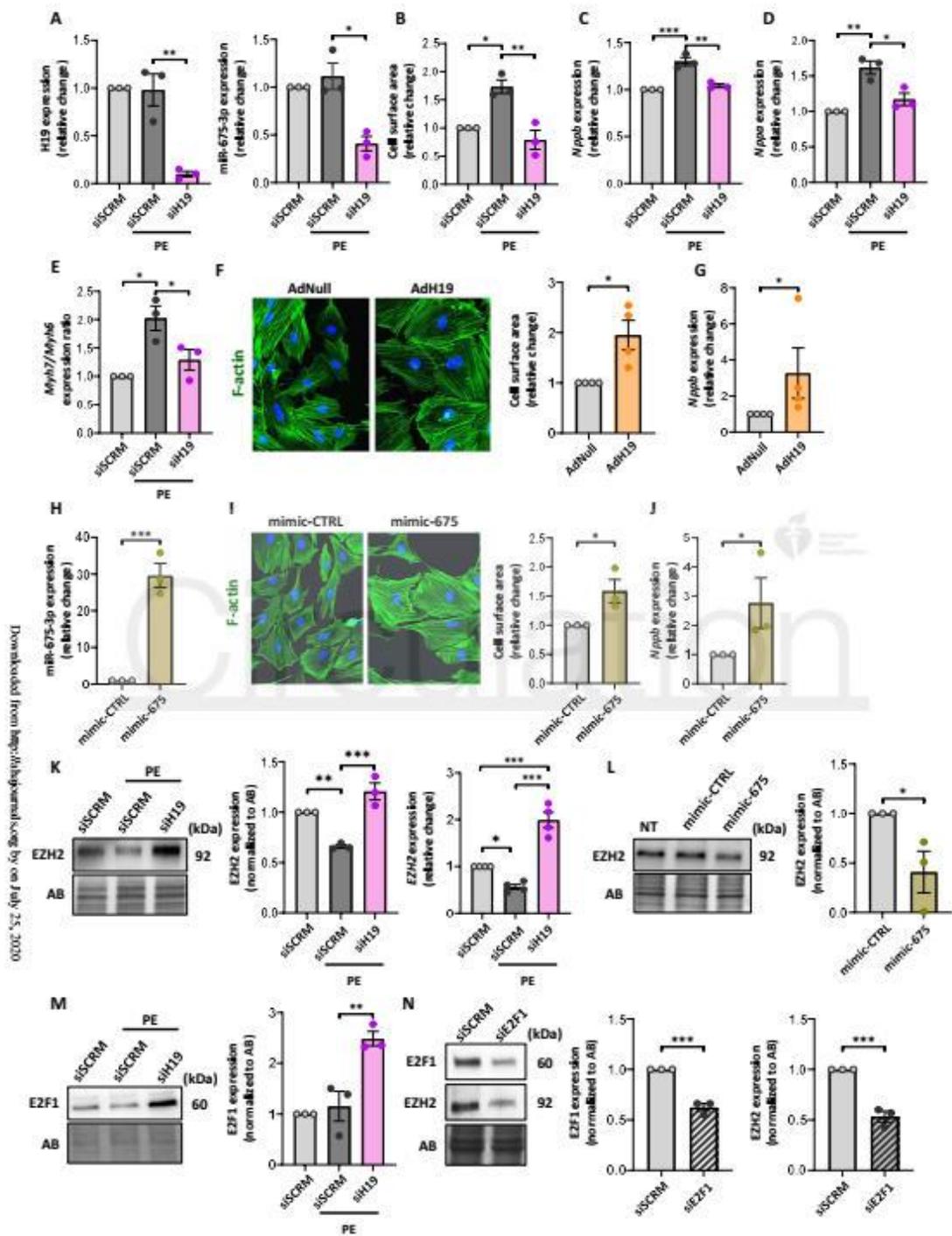


Downloaded from <http://ahajournals.org/> by on July 25, 2020

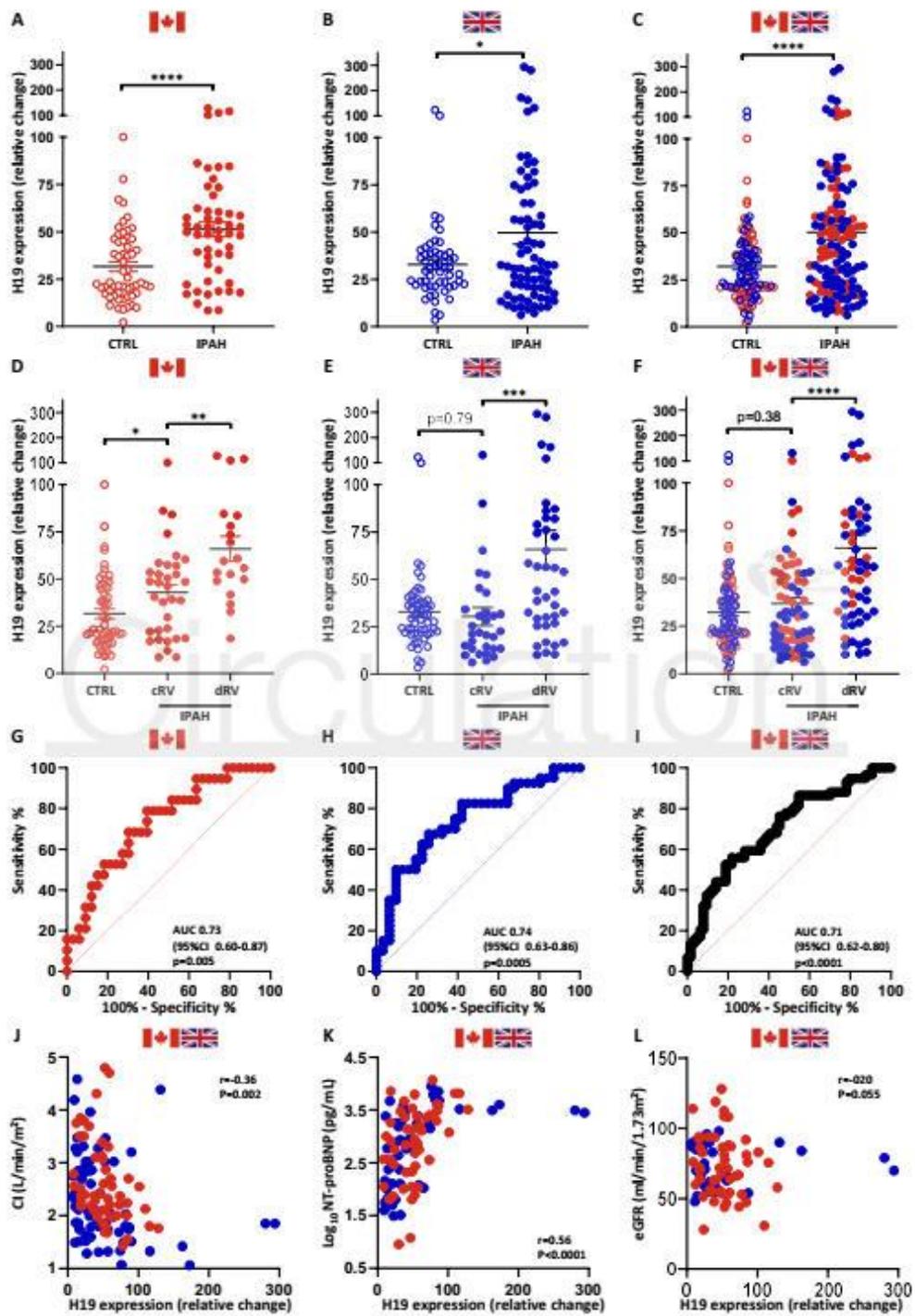


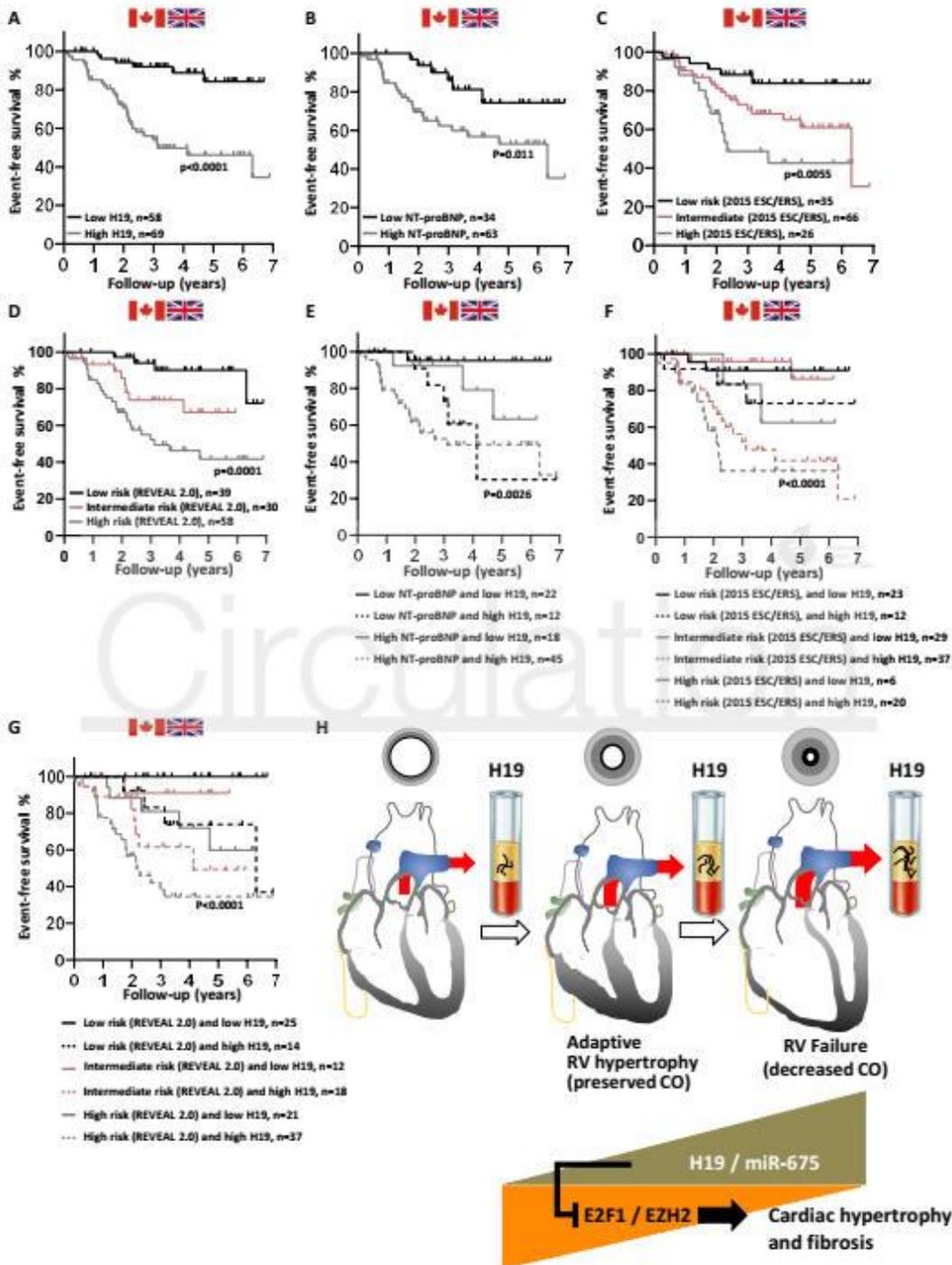
Downloaded from <http://ahajournals.org> by on July 25, 2020





Downloaded from <http://ahajournals.org/> by on July 25, 2020





Downloaded from <http://ahajournals.org> by on July 25, 2020

## **Annexe II.**

Publié dans Eur Respir J. 2021 Jan 14;2003271.

### **(R)-Crizotinib Predisposes to and Exacerbates Pulmonary Arterial Hypertension in Animal Models.**

Charifa Awada, Yann Grobs, Wen-Hui Wu, **Karima Habbout**, Charlotte Romanet, Sandra Breuils-Bonnet, Eve Tremblay, Sandra Martineau, Roxane Paulin, Sébastien Bonnet, Steeve Provencher, François Potus and Olivier Boucherat. Potus and O. Boucherat contributed equally to this article as lead authors and supervised the work.



## R-Crizotinib predisposes to and exacerbates pulmonary arterial hypertension in animal models

### To the Editor:

Pulmonary hypertension (PH) is a life-threatening disease of multiple aetiologies. Regardless of the underlying cause, PH is characterised by vasoconstriction and progressive thickening of the pulmonary vessel wall, all of which is initiated by the loss of pulmonary artery endothelial cells (PAECs) [1]. Indeed, a large body of work has shown that damaged or apoptotic PAECs initiate the remodelling process through the release of growth, fibrogenic and pro-inflammatory factors that directly induce contraction and enhance survival and proliferation of adjacent pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) and fibroblasts [1, 2]. Over the past decade, intense research efforts have been directed at deciphering how PH cells acquire their "cancer-like" properties. As a consequence, the therapeutic potential of numerous anti-neoplastic drugs has been tested in preclinical models, with some of them reaching clinical assays [3]. Considering the biphasic pattern of apoptosis that characterises the disease (*i.e.* PAEC apoptosis that triggers the disease is followed by an apoptosis-resistant state allowing vascular remodelling [4]), it is not surprising that some anticancer agents can both predispose to and treat pulmonary arterial hypertension (PAH). This is exemplified by studies showing that dasatinib, a second-generation tyrosine kinase inhibitor (TKI) approved for Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukaemia, improves established PAH in multiple animal models [5], while its administration before exposure to PH inducers exacerbates pulmonary vascular remodelling and pulmonary artery pressures; histological and haemodynamic changes not observed in rats exposed to dasatinib alone [6].

Recently, several observational studies have highlighted the development of PAH in patients with metastatic non-small cell lung cancer with anaplastic lymphocyte kinase (ALK) rearrangement who received ALK/cMET TKIs (including R-crizotinib, ceritinib, brigatinib and lorlatinib) [7, 8]. Since PH can be associated with multiple diseases including lung cancer [9], the question remains whether development of PAH in lung cancer patients receiving c-MET/ALK TKI represents an adverse drug event or disease spread. To clarify this point and potentially improve our understanding of the pathogenesis underlying PH development, we investigated in different animal models whether R-crizotinib (also known as Xalkori), a standard frontline therapy for c-MET-positive and ALK-rearranged lung cancer [10], exacerbates existing PH and/or predisposes to PH in well-established animal models (ethics approval #VRR-19-018).

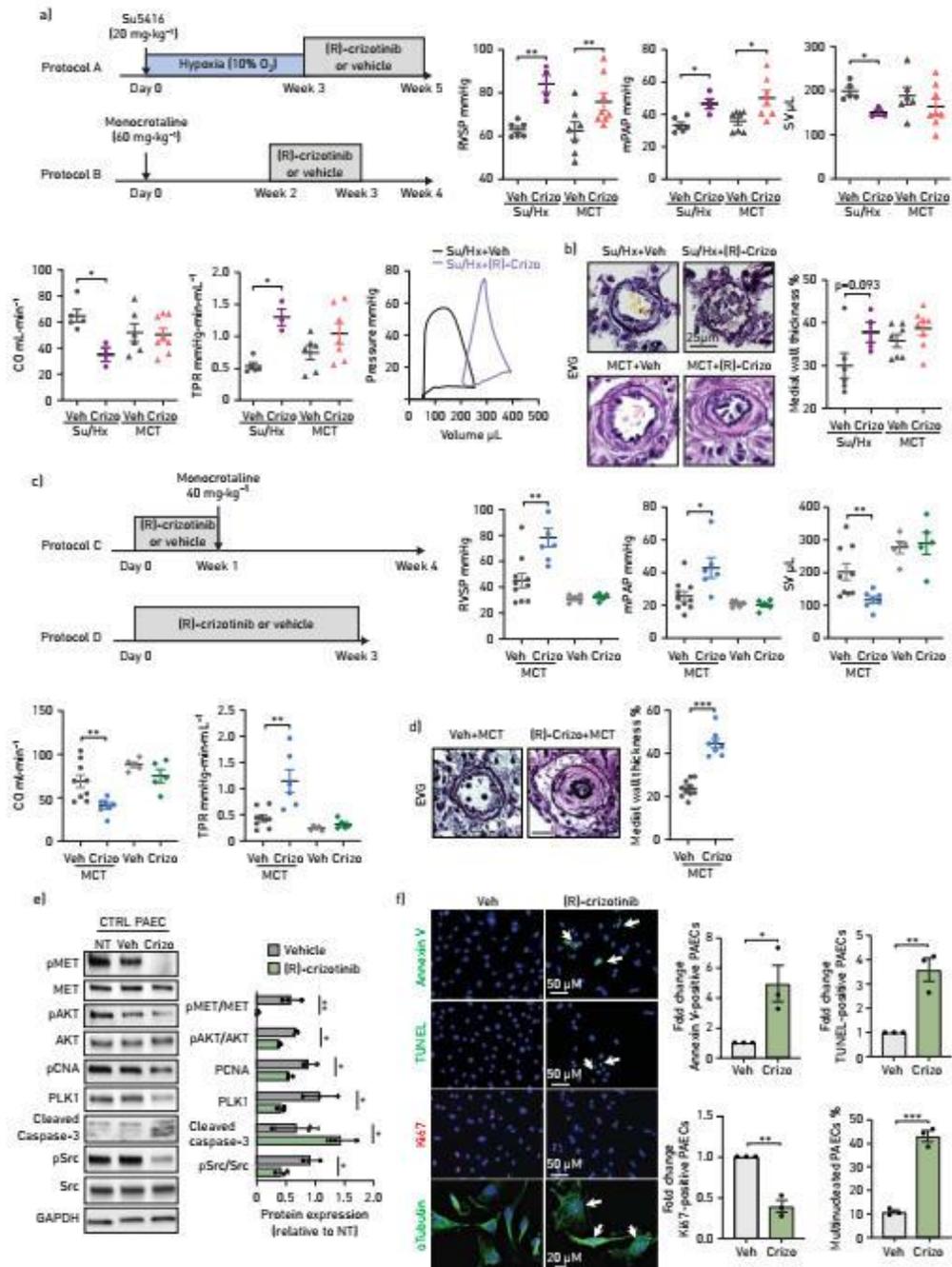
We first explored the influence of R-crizotinib therapy on existing PH in the Sugen/Hypoxia (Su/Hx) rat model (figure 1a; protocol A). We found that one-third of R-crizotinib-treated Su/Hx rats died between weeks 4 and 5, whereas none of the Su/Hx rats receiving vehicle died. In agreement with this, treatment with R-crizotinib resulted in a significant increase in right ventricular (RV) systolic pressure (RVSP) and mean pulmonary artery pressure (mPAP) compared to the injured vehicle-treated group, as assessed by RV catheterisation in closed-chest animals (figure 1a). Although RV hypertrophy, as measured by Fulton index, and natriuretic peptide A (*Nppa*) and B (*Nppb*) transcript levels were not significantly different between groups (data not shown), stroke volume (SV) and cardiac output (CO) were more significantly declined in R-crizotinib-treated rats. Total pulmonary resistance (TPR, calculated by dividing the mPAP by the CO) was augmented and this was reflected by an increase in medial wall thickness of distal PAs (figure 1b). We next investigated whether R-crizotinib-induced adverse cardiopulmonary effects could be reproduced in a second PAH model; namely the monocrotaline (MCT) rat. In view of the high mortality

Q1

### @ERSpublications

This study demonstrates that R-crizotinib, a frontline therapy for lung cancer, predisposes to and exacerbates PH in animal models. Caution and regular follow-up should be exercised in lung cancer patients treated with the compound. <http://bit.ly/39s6stp>

Cite this article as: Awada C, Grobs Y, Wu W-H, *et al.* R-Crizotinib predisposes to and exacerbates pulmonary arterial hypertension in animal models. *Eur Respir J* 2021; 0: 2003271 [<https://doi.org/10.1183/13993003.03271-2020>].



<https://doi.org/10.1183/13993003.03271-2020>

2

**FIGURE 1** R-Crizotinib predisposes to and aggravates existing pulmonary hypertension (PH) in animal models. **a)** Male Sprague Dawley rats (8–9 weeks, 250–300 g body weight) were exposed to Sugen (20 mg·kg<sup>-1</sup>) followed by 3 weeks of hypoxia (10% O<sub>2</sub>, protocol A) or were subcutaneously injected with monocrotaline (MCT) (60 mg·kg<sup>-1</sup>, protocol B) to induce PH. After PH establishment, MCT-injected or Su/Hx rats were randomly assigned to receive either R-crizotinib (100 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) or vehicle by oral gavage, for 2 or 1 week respectively. 2 weeks after treatment was started, rats were anaesthetised and underwent right heart catheterisation with pressure–volume analyses to measure the right ventricular (RV) systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), stroke volume (SV), cardiac output (CO) and total pulmonary resistance (TPR), calculated as mPAP/CO, prior to euthanasia and tissue collection. A representative RV pressure–volume loop in both vehicle-treated Su/Hx and R-crizotinib-treated Su/Hx rats is shown. **b)** Paraffin-embedded lung tissue sections were stained with Elastica Van Gieson (EVG) and medial wall thickness of small pulmonary arteries (<75 µm) was quantified. At least 15 pulmonary arteries per rat were measured. **c)** Male Sprague Dawley rats were treated with R-crizotinib (100 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) or vehicle for 1 week followed by a single subcutaneous injection of low dose MCT (40 mg·kg<sup>-1</sup>) (protocol C) or received R-crizotinib (100 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) or vehicle by oral gavage for 21 consecutive days (protocol D). Before sacrifice, cardiac haemodynamic and RV function were assessed by right heart catheterisation. **d)** Lung tissue sections were stained with EVG to analyse and quantify pulmonary artery wall thickness. Scale bars: 25 µm. **e)** Representative Western blots and corresponding densitometric quantifications of phospho-MET [Tyr1234/1235], MET, phospho-AKT [Ser473], AKT, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Cleaved caspase-3, PLK1, phospho-Src [Tyr416] and Src in control pulmonary artery endothelial cells (PAECs) [n=3] exposed to R-crizotinib (1 µM) or its vehicle [DMSO] for 48 h. The levels of protein expression were normalised to GAPDH. **f)** Apoptosis (Annexin V staining and TUNEL labelling) and proliferation [Ki67 staining] were measured in serum-stimulated (10% FBS) control PAECs [n=3] treated with R-crizotinib (1 µM) or its corresponding vehicle for 48 h. Representative images and quantification of alpha-tubulin labelled control PAECs exhibiting multinucleation upon R-crizotinib (1 µM) exposure for 48 h. For each different PAEC cell line, at least 350 cells per condition from 10 randomly selected visual fields were counted. All the data were analysed in a blinded fashion without knowledge of the treatment groups. Data are expressed as mean±SEM. NT: non-treated cells. Statistical significance was calculated using Mann-Whitney U-test. p<0.05 was considered to indicate statistical significance. \*: p<0.05; \*\*: p<0.01; and \*\*\*: p<0.001.

rate seen in R-crizotinib-treated Su/Hx rats, the duration of R-crizotinib treatment was reduced to 1 week, initiated 2 weeks after MCT injection (figure 1a; protocol B). In comparison with vehicle-treated MCT rats, R-crizotinib treatment significantly increased RVSP and mPAP. No significant differences were observed with regard to SV, CO, TPR and vascular remodelling (figure 1a and b) nor with RV hypertrophy (data not shown), possibly due to the shorter duration of treatment.

Having demonstrated that treatment with R-crizotinib aggravates existing PH in rodent models, we next adopted a reverse reasoning and investigated whether the drug given to rats prior to exposure to a PH inducer potentiates the development of the disease by exacerbating haemodynamic and structural changes (figure 1c). Because a single dose of 60 mg·kg<sup>-1</sup> of MCT produces severe PH that could mask the potential worsening effects of R-crizotinib pretreatment, mild PH was induced by a low dose of MCT (40 mg·kg<sup>-1</sup>). In this protocol, R-crizotinib-treated rats exhibited an exaggerated pulmonary hypertensive response compared to vehicle-pretreated animals, as demonstrated by a significant increase in RVSP and mPAP, lower SV and reduced CO (figure 1c) without any impact on the degree of RV hypertrophy (data not shown). Accordingly, TPR was significantly augmented and medial wall thickness of distal pulmonary arteries was increased approximately two-fold in rats who received R-crizotinib (figure 1c and d). It must be noticed that for each protocol, a left heart catheterisation was not performed. However, measurement of *Nppa* and *Nppb* expression in left ventricles revealed no significant changes between groups (data not shown). Finally, effects of chronic administration of R-crizotinib alone (100 mg·kg<sup>-1</sup>·day<sup>-1</sup>) for 21 consecutive days were investigated. R-Crizotinib-treated rats did not show any haemodynamic difference (i.e. RVSP, mPAP, SV, CO and TPR) when compared with vehicle-treated animals (figure 1c), indicating that the drug by itself is not sufficient to elicit PH.

Since injury-induced death of PAECs is recognised as a critical initiating event in PAH, we next investigated whether *in vitro* exposure of control human PAECs to a clinically relevant dose of R-crizotinib influences their survival and proliferative capacities. We first verified its capacity to inhibit basal phosphorylation of its primary target, c-Met, in cultured cells. As expected, R-crizotinib drastically diminished phosphorylation of c-Met and its downstream pro-survival signal AKT (figure 1e). As revealed by Annexin V staining, terminal transferase-mediated DNA end labelling (TUNEL) assay and immunoblot for cleaved Caspase-3, apoptosis of PAECs was markedly increased upon exposure to R-crizotinib (figure 1e and f). In agreement with this, R-crizotinib elicited anti-proliferative effects, as illustrated by a significant diminution in the proportion of Ki67-positive cells and reduced expression levels of proliferating cell nuclear antigen (figure 1e and f). Surprisingly, exposure to R-crizotinib was associated with an increase in the number of large, flat PAECs containing multiple nuclei or aberrant nuclei clusters (figure 1f), a feature usually seen in cells that undergo a form of cell death called mitotic catastrophe induced by ionising radiation and certain anticancer drugs. Accordingly, expression levels of the mitotic regulator Polo-like kinase 1 (PLK1) was nearly abolished in PAECs treated with R-crizotinib (figure 1e).

Interestingly, HGF/c-MET signalling was documented to elicit pro-survival effects on endothelial cells [11] and activation of cMET signalling, via supplementation in HGF 2 weeks after MCT injection, was shown to improve vascular remodelling [12]. These data may explain in part why R-crizotinib both predisposes to and aggravates established PH. Whether the deleterious impact of R-crizotinib on PAECs is mediated by on- or off-target effects remains to be explored. Several studies have evidenced that R-crizotinib elicits

anti-tumour activity via off-target effects [13, 14], including the inhibition of multiple kinases, such as Src (figure 1e), Lck, Abl and Yes, all critically involved in PAH development [15]. This suggests that the adverse outcome induced by R-crizotinib on the pulmonary vasculature is likely the consequence of its cumulative effects on multiple targets.

In conclusion, our study shows for the first time that the anticancer agent R-crizotinib may cause endothelial cell injury, and by doing so, amplify the response to well-established PH inducers. Although it remains unclear whether a similar relationship between R-crizotinib-induced endothelial cell injury and PH development in lung cancer patients exists, further study of the affected signalling pathways may provide important information into the pathophysiology of PAH, and potentially new targets to combat this serious condition. In addition, our findings suggest that clinicians should consider further evaluation for PH in lung cancer patients treated with R-crizotinib who develop worsening dyspnoea or heart failure symptoms.

Charifa Awada<sup>1</sup>, Yann Grobs<sup>1</sup>, Wen-Hui Wu<sup>1,2</sup>, Karima Habbout<sup>1</sup>, Charlotte Romanet<sup>1</sup>, Sandra Breuils-Bonnet<sup>1</sup>, Eve Tremblay<sup>3</sup>, Sandra Martineau<sup>1</sup>, Roxane Paulin<sup>3,4</sup>, Sébastien Bonnet<sup>1,3</sup>, Steeve Provencher<sup>1,3</sup>, François Potus<sup>1,3,4</sup> and Olivier Boucherat<sup>1,3,4</sup>

<sup>1</sup>Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec City, QC, Canada. <sup>2</sup>Dept of Cardio-Pulmonary Circulation, Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai, China. <sup>3</sup>Dept of Medicine, Université Laval, Québec City, QC, Canada. <sup>4</sup>F. Potus and O. Boucherat contributed equally to this article as lead authors and supervised the work.

Correspondence: Olivier Boucherat, Pulmonary Hypertension Research Group, IUCPQ Research Centre, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec, QC, Canada, G1V 4G5. E-mail: olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca

Received: 25 Aug 2020 | Accepted after revision: 2 Jan 2021

Conflict of interest: C. Awada has nothing to disclose. Y. Grobs has nothing to disclose. W-H. Wu has nothing to disclose. K. Habbout has nothing to disclose. C. Romanet has nothing to disclose. S. Breuils-Bonnet has nothing to disclose. E. Tremblay has nothing to disclose. S. Martineau has nothing to disclose. R. Paulin has nothing to disclose. S. Bonnet has nothing to disclose. S. Provencher has nothing to disclose. F. Potus has nothing to disclose. O. Boucherat has nothing to disclose.

## References

- Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159–165.
- Huertas A, Guignabert C, Barbera JA, et al. Pulmonary vascular endothelium: the orchestra conductor in respiratory diseases: highlights from basic research to therapy. *Eur Respir J* 2018; 51: 1700745.
- Bourgeois A, Omura J, Habbout K, et al. Pulmonary arterial hypertension: new pathophysiological insights and emerging therapeutic targets. *Int J Biochem Cell Biol* 2018; 104: 9–13.
- Michelakis ED. Spatio-temporal diversity of apoptosis within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: heterogeneous BMP signaling may have therapeutic implications. *Circ Res* 2006; 98: 172–175.
- Pullamsetti SS, Berghausen EM, Dabral S, et al. Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1354–1365.
- Guignabert C, Phan C, Seferian A, et al. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2016; 126: 3207–3218.
- Chahel A, Mayenga M, Hamid AM, et al. Lorlatinib-induced pulmonary arterial hypertension. *Lung Cancer* 2018; 120: 60–61.
- Tabbo F, D'Avanti A, Tota D, et al. Pulmonary arterial hypertension in ALK receptor tyrosine kinase-positive lung cancer patient: adverse event or disease spread? *J Thorac Oncol* 2019; 14: e38–e40.
- Pullamsetti SS, Kojonazarov B, Storm S, et al. Lung cancer-associated pulmonary hypertension: role of microenvironmental inflammation based on tumor cell-immune cell cross-talk. *Sci Transl Med* 2017; 9: eaa19048.
- Blackhall F, Cappuzzo F. Crizotinib: from discovery to accelerated development to front-line treatment. *Ann Oncol* 2016; 27: Suppl. 3, iii35–iii41.
- Ma H, Calderon TM, Fallon JT, et al. Hepatocyte growth factor is a survival factor for endothelial cells and is expressed in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis* 2002; 164: 79–87.
- Ono M, Sawa Y, Mizuno S, et al. Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation* 2004; 110: 2896–2902.
- Zhou Y, Zhao C, Gery S, et al. Off-target effects of c-MET inhibitors on thyroid cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2014; 13: 134–143.
- Megjorini F, McDowell HP, Camero S, et al. Crizotinib-induced antitumour activity in human alveolar rhabdomyosarcoma cells is not solely dependent on ALK and MET inhibition. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34: 112.
- Cornet L, Khouri C, Roustir M, et al. Pulmonary arterial hypertension associated with protein kinase inhibitors: a pharmacovigilance-pharmacodynamic study. *Eur Respir J* 2019; 53: 1802472.

Copyright ©The authors 2021. For reproduction rights and permissions contact permissions@ersnet.org

## Author Queries

*Journal:* ERJ

*Manuscript:* ERJ-03271-2020

Q1 Most other publications (e.g the review cited as reference 10) refer only to "crizotinib" (not R-crizotinib). Please check and advise.

### **Annexe III.**

Publié dans *Am J Respir Crit Care Med* 2020.

#### **Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH.**

Vitry G, Paulin R, Grobs Y, Lampron MC, Shimauchi T, Lemay SE, Tremblay E, **Habbout K**, Awada C, Bourgeois A, Nadeau V, Paradis R, Breuils-Bonnet S, Roux-Dalvai F, Orcholski M, Potus F, Provencher S, Boucherat O, Bonnet S.

## **Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH**

Géraldine Vitry<sup>1\*</sup>, Roxane Paulin<sup>1,2\*</sup>, Yann Grobs<sup>1</sup>, Marie-Claude Lampron<sup>1</sup>, Tsukasa Shimauchi<sup>1</sup>, Sarah-Eve Lemay<sup>1</sup>, Eve Tremblay<sup>1</sup>, Karima Habbout<sup>1</sup>, Charifa Awada<sup>1</sup>, Alice Bourgeois<sup>1</sup>, Valérie Nadeau<sup>1</sup>, Renée Paradis<sup>1</sup>, Sandra Breuils-Bonnet<sup>1</sup>, Florence Roux-Dalvai<sup>3</sup>, Mark Orcholski<sup>1</sup>, François Potus<sup>1</sup>, Steeve Provencher<sup>1,2</sup>, Olivier Boucherat<sup>1,2,#</sup>, and Sébastien Bonnet<sup>1,2,#</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Medicine, Université Laval, Québec City, QC, Canada.

<sup>3</sup> Proteomics platform, CHU de Québec, Université Laval Research Center, Québec City, QC, Canada.

\*G. Vitry and R. Paulin have equally contributed to the study

# Corresponding authors: Sébastien Bonnet, PhD, FAHA

Pulmonary Hypertension research Group

Québec Heart and Lung Institute Research Centre

2725, chemin Sainte-Foy

Québec, QC

Canada, G1V 4G5

Phone: (418) 656-8711 ext 2134

E-mail: [sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca](mailto:sebastien.bonnet@criucpq.ulaval.ca)

**Author's contributions:** Conceptualization, S.B., O.B., G.V., R.P., and S.P.; Investigation and Validation, V.G., Y.G., M.C.L., T.S., E.T., K.H., C.A., A.B., V.N., R.P., S.B.B., S.E.L., A.B., F.R.D., M.O., and F.P.; Writing - Original Draft, O.B. and S.B.; Writing - Review & Editing, O.B., S.P., S.B., and R.P.; Funding Acquisition, S.B.

**Acknowledgements:** We thank the Respiratory Health Network Tissue Bank as well as Drs. Pasquale Ferraro and Emmanuelle Brochiero from the Centre Hospitalier de l'Université de Montreal Research Centre for their help in obtaining PAH lung tissues.

**Short title:** NUDT1 in pulmonary hypertension

**Descriptor:** 9.35

**Total word count:** 4239

This article has an online data supplement, which is accessible from this issue's table of content online at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

#### **At a Glance Commentary**

**Scientific Knowledge on the Subject:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a debilitating disease characterized by progressive obliteration of small-caliber pulmonary arteries. Contrary to their normal counterparts, pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from PAH patients experience numerous cellular stresses that should jeopardize their survival. Nevertheless, PAH-PASMCs are characterized by a cell death-resistant and hyper-proliferative phenotype contributing to vascular remodeling. However, molecular strategies by which PAH cells build a protective cellular response to cope with stresses and to ensure their survival remains largely unknown.

**What This Study Adds to the Field:** Our study demonstrates for the first time that PAH-PASMCs overexpress the detoxifying DNA enzyme Nudix hydrolase 1 (NUDT1) to avoid accumulation of oxidative DNA damage contributing to their survival and proliferation under environmental stresses and thus promoting vascular remodeling in PAH. Moreover, we provided evidence that pharmacological inhibition of NUDT1 improves PAH in rodents.

**Funding Sources:** This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research grant to S.B.

**Abstract**

**Rationale:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a life-threatening condition characterized by abnormally elevated pulmonary pressures and right ventricular failure. Excessive proliferation and resistance to apoptosis of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is one of the most important drivers of vascular remodeling in PAH, for which available treatments have limited effectiveness.

**Objective:** To gain insights into the mechanisms leading to the development of the disease and identify new actionable targets. **Measurements and Main Results:** Here, protein expression profiling was conducted by two-dimensional liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in isolated PASMCs from control and PAH patients. Among differentially expressed proteins, increased expression of the detoxifying DNA enzyme NUDT1 was detected in cells and tissues from PAH patients and animal models (immunoblot and dual immunostaining). *In vitro*, molecular or pharmacological inhibition of NUDT1 in PAH-PASMCs induced accumulation of oxidized nucleotides in the DNA, irresolvable DNA damage (Comet assay), disruption of cellular bioenergetics (Seahorse) and cell death (TUNEL assay). In two animal models with established PAH (i.e. monocrotaline and Sugen/hypoxia-treated rats), pharmacological inhibition of NUDT1 using (S)-Crizotinib significantly decreased pulmonary vascular remodeling and improved hemodynamics and cardiac function. **Conclusions:** Our results indicate that, by overexpressing NUDT1, PAH-PASMCs hijack persistent oxidative stress in preventing incorporation of oxidized nucleotides into DNA, thus allowing the cell to escape apoptosis and proliferate. Given that NUDT1 inhibitors are under clinical investigation for cancer, they may represent a new therapeutic option for PAH.

**Word count:** 236 words

**Key words:** DNA damage, MTH1, oxidative stress, smooth muscle cells, pulmonary hypertension

## Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disorder characterized by progressive vasoconstriction and extensive remodeling of distal pulmonary arteries (PAs) resulting in high pulmonary vascular resistance and right ventricular (RV) failure(1). Although available medications that predominantly target vasoconstriction improve quality of life and slow disease progression(2), there is still no cure for PAH aside lung transplantation. Therefore, research efforts now focused on deciphering the molecular mechanisms driving PA remodeling and identifying new actionable targets.

It is now recognized that development of PAH follows a seemingly opposed two-step sequence(3), perhaps illustrated by studies documenting that drugs able to reverse vascular remodeling in animal models of PAH also predispose to the disease(4, 5). As a key initial event, endothelial dysfunction (i.e. endothelial injury/apoptosis), triggered by chronic hypoxia, viral infection, inflammation, shear stress etc... and predisposed by reduced bone morphogenetic protein receptor 2 (BMPR2) signaling(6), occurs promoting the release of growth and inflammatory mediators. Although exposed to persistent and noxious environmental stresses, apoptosis-resistant PA endothelial cells (PAECs) with greater proliferative capacity progressively emerge, and adjacent PA smooth muscle cells (PASMCs) gradually switch to a more pro-survival, pro-proliferative state that greatly contributes to vascular lumen obliteration(1, 7).

Over the last ten years, major advances have been made in our understanding of the mechanisms progressively developed by PAH cells nurturing their "cancer-like phenotype"(7-9). Among others, alterations of the epigenetic landscape(10), metabolic changes with a shift from oxidative phosphorylation to glycolysis(11), abnormalities in mitochondrial dynamics with excessive mitochondrial fission(12) as well as sustained activation of the DNA damage response(13, 14) and autophagy(15) have been shown to provide survival and proliferative advantages in the harsh conditions. Numerous factors have been identified as key regulators of these cellular dysfunctions showing promising therapeutic effects in preclinical PAH models. Despite this progress, the poor translation of efficacy data derived from animal

models to the clinic remains a central feature in the field of PAH emphasizing the need to deepen our knowledge.

Herein, to reveal new molecules implicated in the abnormal behavior of PAH-PASMCs, an unbiased and quantitative proteomic profile was conducted on isolated PASMCs from control and PAH patients. Using this approach, 58 proteins were found to be up-regulated in PAH-PASMCs including Nudix hydrolase 1 (NUDT1); a major detoxifier of oxidized DNA precursors that complement the function of the base excision repair enzyme 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGG1)(16-18). Subsequent experiments demonstrated that increased NUDT1 represents a novel pro-survival mechanism employed by PAH-PASMCs to clean the nucleotide pool of oxidized purines, thus preventing their incorporation into DNA and DNA damage overload. We also offer evidence that pharmacological inhibition of NUDT1 elicits structural and hemodynamic benefits in two PAH preclinical models.

### **Methods**

For full experimental details, including information on cell culture and treatments, proteomics, real-time quantitative PCR, Western blotting and quantification, modified alkaline comet assay, mitochondrial respiration and glycolysis, *in vitro* proliferation and apoptosis measurements, fluorescence detection of 8-oxoG DNA lesions in cultured cells, *in vivo* assessment of pulmonary hypertension and right ventricular (RV) hypertrophy, and histological and immunofluorescence studies, please see the online supplement.

### ***Human Lung Samples***

Experimental procedures using human tissues or cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and were performed with the approval of Laval University and the IUCPQ (Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec) Biosafety and Ethics Committees (CER #20773). Tissues were obtained from patients who had previously given signed informed consent. Healthy lung tissues (controls) were obtained during lung resection for tumors. Lung samples were taken at distance

from the tumor and demonstrated normal lung parenchyma. All the PAH tissues were from lung explants from transplants or early (“warm”) autopsies. PAH diagnosis was previously confirmed by right heart catheterization. PAH and control tissues were obtained from Respiratory Health Network tissue bank (<https://rsr-qc.ca/en/biobanque/>). Clinical and hemodynamic characteristics of patients are shown in Tables E1 and E2 in the online supplement.

### ***Animal Experiments***

All animal protocols were approved by the IUCPQ–UL Biosafety and Ethics Committees (#2019-018). All experiments were in accordance with recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH(19), including animal randomization, sequence allocation concealment and blinded assessments. Two rat models of PAH were used in this study (i.e. the monocrotaline and the Sugen/hypoxia). Male Sprague-Dawley (SD) rats (weight between 250 and 300g) were purchased from Charles River Laboratories. In the monocrotaline (MCT) model, SD rats were subcutaneously injected with MCT (60mg/kg, Sigma). In the Sugen/hypoxia (Su/Hx) model, SD rats received a single subcutaneous injection of SU5416 (20mg/kg) and were exposed to normobaric hypoxia for 3 weeks before returning to room air for 2 weeks. At 2 or 3 weeks after MCT or Sugen injection (once PAH established), respectively, rats were randomly assigned to receive either intratracheal nebulization of (S)-Crizotinib (100 nmol) or its vehicle (DMSO) thrice a week. Briefly, rats were anesthetized with 3% isoflurane for 15 minutes and placed on an angled platform. The tongue was gently pulled out with forceps to visualize the oropharynx and vocal cords through transillumination. A 16-gauge intravenous catheter was inserted in the lumen of the trachea, and the position was confirmed by visualization of breath on a dental mirror placed at the end of the catheter. A nebulizer (Aeroneb, Aerogen) was plugged into the catheter, and a volume of 50µl was delivered as a mist into trachea with O<sub>2</sub> 0.1 L/min for 7 to 10 seconds. Treatments were maintained for two weeks. A control (no PAH group) was also monitored.

### ***Statistical Analysis***

All analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 (GraphPad). The unpaired Student *t*-test and one-way analysis of variance (ANOVA) test were used for comparisons between 2 and 2 or more normally distributed groups, respectively. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis non-parametric tests were used to compare 2 or more non-normally distributed groups. A significance level inferior to 5% ( $P < 0.05$ ) was considered statistically significant.

For the proteomic study, a statistical test was finally performed using the Limma Bioconductor package(20) to define the probability of variation (*p*-value) of each protein between the two groups. The Benjamini-Hochberg method was used to adjust the *p*-values for multiple testing and thus obtain *q*-values. Proteins with a *q*-value  $< 0.05$  and absolute value of *z*-score  $|z| > 1.96$  were considered as significantly variant between the two conditions.

### **Results**

#### ***Increased expression of NUDT1 in PASMCs from PAH patients and animal models***

Although a number of studies have identified several convincing candidate genes or molecules implicated in PAH initiation and progression, our understanding of the pathophysiology of the disease remains incomplete. To specifically gain insight into the subcellular mechanisms governing the “cancer-like” phenotype of PAH-PASMCs and identify actionable targets with therapeutic potential, the proteomic profiles of cultured PASMCs isolated from 4 PAH patients and 5 controls were compared by quantitative two-dimensional liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). In total, 3636 proteins were detected in all samples. Under the screening criteria of LIMMA *p*-value  $< 0.05$  and *Z*-score  $> 1.96$ , 108 proteins were found to be differentially expressed. Among them, 58 proteins were increased and 50 downregulated in PAH-PASMCs (Figure 1A and 1B). Notably, established markers of cell proliferation such as PCNA and several members of the Mitochondrial Maintenance (MCM) family (MCM-2-7)(21)

were found to be up-regulated in PAH-PASMCs confirming their enhanced proliferative state even if cultured *ex vivo* outside their vascular environment. Moreover, proteins previously implicated in PAH, such as homeobox A5 (HOXA5)(22), thymidine kinase 1 (TK1)(23) and S100A4/Mst1(24) stood out (Figure 1B). The identified differentiated expressed proteins (DEPs) were then uploaded to the online software DAVID for GO and KEGG pathway analyses(25). As expected, the results of the GO analysis revealed that upregulated DEPs in PAH-PASMCs were highly associated with DNA replication initiation, DNA unwinding involved in DNA replication and mitotic spindle organization (data not shown). KEGG pathway analyses showed that upregulated DEPs in PAH-PASMCs were significantly enriched in DNA replication, cell cycle, pyrimidine metabolism, metabolic pathways and nucleotide excision repair (Figure 1C). In terms of biological processes, DEPs found to be downregulated in PAH-PASMCs were mainly involved in lysosome (Figure 1C).

To validate the robustness and sensitivity of the expression changes observed in our proteomic data set, we performed Western blot analysis on 4 selected DEPs using the same samples as in the proteomic experiment as well as additional control and PAH-PASMC cell lines. Cell lysates were subjected to Western blotting against MCM2, PDZ-binding kinase (PBK), Ubiquitin-conjugating enzyme E2 C (UBE2C) and Nudix hydrolase 1 (NUDT1). These proteins were chosen for validation due to their connection with cancer cell proliferation and survival from a literature-based text mining. In agreement with results obtained from proteomic analysis, Western blot analyses demonstrated that PAH-PASMCs exhibit higher protein levels of MCM2, PBK and NUDT1 compared to control cells (Figure 1D). We next paid a particular attention on NUDT1. Indeed, previous studies have shown that this protein acts as a sanitizing enzyme for oxidized nucleotides pools by hydrolyzing oxidized purine nucleotide triphosphate such as 8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-oxo-dGTP) and 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (2-OH-dATP)(16, 18, 26). By doing so, NUDT1 plays a crucial role in cancer cells in preventing the mis-incorporation of oxidized nucleotides into both nuclear and mitochondrial genomes, counteracting excessive oxidative stress-induced DNA damage and resulting cell death(16, 17, 27, 28). Based on published data, including ours(13, 14, 29),

underscoring the development in PAH-PASMCs of an orchestrated DNA damage signaling response in the face of persistent stressing environment allowing cell survival and proliferation, we hypothesized that NUDT1 overexpression may represent a complementary stress-buffering mechanism exploited by PAH-PASMCs to support their survival and proliferation. We first analyze NUDT1 expression levels in PA endothelial cells (PAECs) isolated from control and PAH patients. As observed in Supplemental Figure E1, no difference was found. To determine the relevance to our *in vitro* findings *in vivo*, NUDT1 expression level was next measured in lungs and dissected PAs from control and PAH patients. As assessed by Western blots, enhanced NUDT1 expression was detected in lungs and PAs from PAH patients (Figure 2A). Similarly, expression of NUDT1 was found to be augmented in dissected PAs from three rat models recapitulating the phenotypic manifestations of PAH; i.e. the MCT, Su/Hx and Fawn-Hooded rats (FHR) (Figure 2B). To complement these data, we performed dual labeling experiments with NUDT1 and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, a marker of smooth muscle cells) on human and rat lung tissue sections. As shown in Figure 2C and 2D and Supplemental Figure E1, NUDT1 was more expressed in PAH patients and PAH models and mainly detected within the media of remodeled small PAs. Furthermore, increased expression of NUDT1 was observed in remodeled RV from PAH patients and animal models, whereas no changes in expression was observed in quadriceps muscle or liver biopsies (Supplemental Figure E1 and E2). Taken together, our results provide evidence for a role of NUDT1 in disease pathogenesis.

#### ***FOXM1 positively regulates NUDT1 expression in PAH-PASMCs***

Previous studies have demonstrated that increased expression of forkhead box transcription factor M1 (FOXM1) protects cancer cells to apoptosis by regulating a transcriptional network of genes implicated in anti-oxidative stress response program(30). Because we and other have recently shown that FOXM1 promotes vascular remodeling in PAH(31, 32), we thus hypothesized that up-regulation of FOXM1 in PAH-PASMCs may account for increased NUDT1 expression. To test our hypothesis, we first measured NUDT1 mRNA levels between control and PAH-PASMCs. Increased NUDT1 transcript was noted in PAH-PASMCs compared to their normal counterparts supporting the fact that NUDT1 is regulated

primarily at the level of transcription (Figure 2E). We next exposed PAH-PASMCs to escalating doses of Siomycin A and Thiostrepton, two transcriptional inhibitors of FOXM1(33, 34). As expected, Siomycin A and Thiostrepton dose-dependently reduced FOXM1 expression (Figure 2F and Supplemental Figure E3). Both mRNA and protein levels of NUDT1 were significantly reduced after treatment with FOXM1 inhibitors (Figure 2F and Supplemental Figure E3), indicating that FOXM1 may directly account for the transcriptional activation of NUDT1 in cooperation or not with other transcription factors, such as nuclear factor kappa B (NF- $\kappa$ B) also involved in NUDT1 expression(35) and known to recruit FOXM1 on DNA(36). Based on the literature documenting that FOXM1 directly stimulates expression of S-phase kinase-associated protein 2 (SKP2)(37) implicated in stabilization and up-regulation of NUDT1 in cancer cells(38), we thus hypothesized that the same mechanism also operates in PAH-PASMCs. Consistently, protein levels of SKP2 were up-regulated in PAH-PASMCs (Supplemental Figure E3) and reduced by FOXM1 inhibitors (Figure 2F). Altogether, our findings suggest that FOXM1 contributes directly and indirectly to the up-regulation of NUDT1 in PAH-PASMCs.

***Molecular and pharmacological inhibition of NUDT1 in PAH-PASMCs induces 8-oxodG accumulation and DNA damage.***

By minimizing accumulation of 8-Oxoguanine (8-oxoG) and thus preventing its incorporation within mitochondrial and nuclear DNA, NUDT1 is regarded as a pro-survival factor acting in a complementary way with 8-oxoguanine DNA glycosylase-1 (OGG1) that excises 8-oxoG bases in DNA(39). Before going further, OGG1 levels were measured in PAH-PASMCs transfected with a siRNA against NUDT1 or exposed to (S)-Crizotinib, a selective NUDT1 catalytic inhibitor that has a distinctly different profile from its (R)-enantiomer (also called Xalkori) approved by the Food and Drug administration for the treatment of patients with locally advanced or metastatic non-small cell lung cancer(17). Figure 3A demonstrates successful knockdown of NUDT1 compared to scrambled siRNA control (siSCRM). No change in OGG1 levels was detected following NUDT1 inhibition, suggesting lack of compensatory mechanisms (Figure 3A and 3B). We next investigated whether up-regulation of NUDT1 serves as a major protector against

oxidative DNA damage in PAH-PASMCs. Using the *in-situ* detection method previously described by Ohno(40, 41) coupled to fluorescent probes, we found that both molecular or pharmacological inhibition of NUDT1 in PAH-PASMCs is accompanied by a marked accumulation of 8-oxoG within mitochondrial and nuclear DNA (Figure 3C and 3D), thus suggesting elevated DNA single strand breaks. We therefore examined the extent of nuclear DNA fragmentation after NUDT1 inhibition using an alkaline comet assay. As revealed by measurements of tail moment length as well as total comet score, both NUDT1 knockdown and (S)-Crizotinib induced significant DNA damage (Figure 3E), thus reinforcing the notion that increased NUDT1 expression in PAH-PASMCs provides a line of defense against detrimental stress.

***Inhibition of NUDT1 compromises bioenergetic function and reduces PAH-PASMC survival and proliferation.***

Although, as observed in cancer cells, a metabolic shift toward glycolysis is a hallmark of hyperproliferative PAH-PASMCs, ATP production by remaining mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) is nevertheless required to meet their energetic needs(42). Given the indispensable role of numerous nuclear- and mitochondrial-encoded proteins to maintain OXPHOS activity, we reasoned that accumulation of nuclear and mitochondrial DNA damage in NUDT1-inhibited PAH-PASMCs may collectively compromise bioenergetic function impeding their survival and proliferation. To test our hypothesis, we assessed the effects of NUDT1 inhibition on basal mitochondrial function and mitochondrial stress using a Seahorse extracellular flux analyzer. Regarding extracellular acidification rate (ECAR), we observed a significant decrease in glycolysis upon treatments with siNUDT1 or (S)-Crizotinib (Figure 4A and 4B). Furthermore, basal oxygen consumption rate (OCR), which is indicative of OXPHOS, was dose-dependently decreased by (S)-Crizotinib exposure (Figure 4C). As a result, a concentration-dependent decline of ATP-linked OCR, which reflects ATP production through OXPHOS, was observed (Figure 4D). Importantly, both maximal respiratory capacity and spare respiratory capacity were diminished in cells treated with (S)-crizotinib (Figure 4E and 4F). Similar results were noted in PAH-PASMCs subjected to silencing of NUDT1 expression (Supplemental Figure E4). Based on these data, we next investigated whether inhibition of

NUDT1 restrains the hyper-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMCs. We found that both molecular and pharmacological inhibition of NUDT1 significantly reduced PAH-PASMC survival, as indicated by a marked increase in the proportion of TUNEL-positive cells as well as diminished expression of the anti-apoptotic marker Survivin (Figure 4G, 4I and Supplemental Figure E2). Consistently, NUDT1-inhibited PAH-PASMCs displayed reduced proliferation (as demonstrated by Ki67 labeling and immunoblot of two well-accepted markers of cell proliferation, namely PCNA and PLK1(43)) (Figure 4H, 4I and Supplemental Figure E5). In contrast, cell proliferation and survival of control PASMCs were non-significantly impacted by exposure to (S)-Crizotinib (Supplemental Figure E5), supporting previous findings highlighting the nonessential role of NUDT1 in normal cells(16, 17, 44). To further determine whether forced expression of NUDT1 in control PASMCs is sufficient to induce a PAH-like phenotype or exert a protective effect against hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )-induced oxidative damage, cells were infected with an adenovirus encoding for the human NUDT1 gene. As revealed by TUNEL labeling and immunoblots for PCNA, Survivin and BAX, cell proliferation and survival of control cells were not affected by overexpression of NUDT1 (Supplemental Figure E6). Similarly, overexpression of NUDT1 alone was insufficient to confer a survival advantage to control cells exposed to  $H_2O_2$  (Supplemental Figure E6), probably due to the multitude of molecules (i.e. lipids, proteins and DNA) and signaling pathways damaged by  $H_2O_2$ .

*(S)-Crizotinib interferes with autophagy.*

Because activation of autophagy represents a safeguard mechanism against accumulation of damaged molecules or organelles(45), we investigated the possible impact of NUDT1 inhibition on autophagy in PAH-PASMCs. To this end, we measured by Western blot the conversion of soluble microtubule-associated protein 1 light chain (LC3)-I to lipid bound LC3-II which is associated with the formation of autophagosomes. As shown in Figure 5A, treatment with (S)-Crizotinib markedly increased the amount of LC3-II without significantly impacting expression of PTEN kinase 1 (PINK1) involved in the degradation of damaged mitochondria through a selective form of autophagy called mitophagy. In

accordance with these results, the proportion of cells positive for LC3 was markedly augmented (Figure 5B). The observed (S)-Crizotinib-dependent upregulation in the levels of autophagosomal markers may reflect two opposite effects on the pathway: either induction or blockage of autophagy. Thus, to evaluate whether autophagy functions properly, the levels of the autophagic substrate p62 (also called SQSTM1) was examined. A significant accumulation of p62 was observed following treatment with (S)-Crizotinib (Figure 5B). Taken together, these data suggest that (S)-Crizotinib interferes with autophagic flux in PAH-PASMCs, further impeding their survival.

***Pharmacological inhibition of NUDT1 using (S)-Crizotinib improved established PAH in the monocrotaline rat model.***

Encouraged by our *in vitro* results showing that NUDT1 overexpression exerts pro-survival and pro-proliferative effects on PAH-PASMCs, we sought to explore whether its inhibition could reverse pulmonary vascular remodeling in rats injected with MCT. In a clinically relevant therapeutic perspective, we decided to use the NUDT1-targeted drug (S)-Crizotinib. To limit the anticipated cardiotoxic effect of this anti-cancer agent in the setting of PAH supported by our finding showing up-regulation of NUDT1 in remodeled PAH RV, we employed a lung-targeted approach through intra-tracheal nebulization of the compound. Thus, two weeks after a single injection of MCT, injured rats were randomly allocated into two groups, one of which received (S)-Crizotinib while vehicle was administered to the other group for two additional weeks. At the end of the protocol, hemodynamic parameters were acquired by right-heart catheterization in a closed-chest procedure (Figure 6A). Rats treated with (S)-Crizotinib exhibited significantly lower RV systolic pressure (RVSP) and mean PA pressure (mPAP) levels than vehicle-treated MCT rats (Figure 6B). Cardiac output (CO) was increased and total pulmonary resistance was reduced (Figure 6B). As determined by Fulton index, RV hypertrophy was not different between (S)-Crizotinib and vehicle treated animals (Figure 6B). To determine whether these apparent beneficial effects are associated with improved pulmonary vascular remodeling, lung tissue sections were stained with the Elastica van Gieson before determination of the medial wall thickness of small PAs. (S)-Crizotinib-treated MCT rats demonstrated a

significant reduction in PA wall thickness compared with the vehicle-treated group (Figure 6C). Not surprisingly, this structural improvement was associated with an approximate 2-fold increase in the percentage of cells positive for 8-oxoG (Figure 6C, confirming that NUDT1 was targeted *in vivo*). Accordingly, improvement of vascular remodeling was associated with the promotion of PASMC apoptosis and inhibition of proliferation as indicated by cleaved Caspase-3 and PCNA staining, respectively (Figure 6C and Supplemental Figure E7).

***Pharmacological inhibition of NUDT1 in Sugen/Hypoxia-challenged rats recapitulates the beneficial effects observed in the MCT model.***

Because evaluation of drug efficacy in multiple preclinical models is now a staple of translational research to maximize clinical success(46), the therapeutic potential of NUDT1 inhibition was also tested in Su/Hx-challenged rats (Figure 7A), a model characterized by severe PAH with development of angio-obliterative lesions. As observed in the MCT model, Su/Hx challenged rats treated with (S)-Crizotinib exhibited improvements in pulmonary hemodynamics. Indeed, RV systolic and PA pressures were significantly decreased in (S)-Crizo-treated Su/Hx rats, as compared to the vehicle-treated group (Figure 7B). (S)-Crizo-treated animals exhibited a trend for higher cardiac output resulting in a significant reduction of total pulmonary resistance (Figure 7B). This was accompanied by a diminution of RV hypertrophy (Figure 7B). In addition, reduced PA remodeling, accumulation of 8-oxoG, increased apoptosis and diminished proliferation were found in (S)-Crizotinib-treated Su/Hx rats when compared with vehicle-treated Su/Hx rats (Figure 7C and Supplemental Figure E7).

**Discussion**

Under unfavorable conditions, emergence of PASMCs with increased resistance to cell death and hyperproliferative capacity is a major pathogenic component of pulmonary vascular remodeling in PAH. Although upfront combination therapy with pulmonary vasodilators has been shown to provide significant benefit for patients(2, 47), PAH still remain an incurable disease with an unreasonably high morbidity and

mortality(2). In view of the above, there is a compelling need to develop effective anti-remodeling therapies that could complement existing treatment regimens and result in synergistic effect. In the present study, we carried out a comparative proteomic analysis of isolated PASMCs derived from control and PAH patients. Among the most up-regulated proteins in PAH-PASMCs, we identified NUDT1, an enzyme responsible for hydrolyzing oxidized DNA precursors and per se conferring survival advantage in cancer cells that experience persistent stress(16, 28). Using a molecular and pharmacological approach, we found that *in vitro* inhibition of NUDT1 in PAH-PASMCs leads to increased DNA breaks, leading to compromised bioenergetic efficiency and cell death (Supplemental Figure E8). In a translational effort, we demonstrated that inhibition of NUDT1 using (S)-Crizotinib provides therapeutic benefit in two complementary animal models recapitulating several key pathophysiological aspects of PAH.

NUDT1 belongs to a large family of hydrolytic enzymes with a broad array of unrelated substrates, such as oxidized (d)NTPs, nonnucleoside polyphosphates, and capped mRNAs(48). Due to the diversity of their substrates, NUDIX proteins are suggested to be involved in many biological functions including metabolism and mRNA processing. NUDT1, thus far the best characterized member of this group, is responsible for removal of oxidized purine nucleoside triphosphates [8-oxo-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate (8-Oxo-dGTP) and 2-hydroxy-2'-deoxyadenosine 5'-triphosphate (2-OH-dATP)] as well as methylated nucleotides from the nucleotide pool(28, 49). By doing so, NUDT1 is considered as a pivotal survival factor under stressed conditions(28). As a result, a substantial amount of work has been done reporting that, compared to healthy cells, NUDT1 is overexpressed in cancer cells to mitigate the damaging aspects of elevated oxidative stress(50, 51) and its molecular depletion significantly decreases cancer cell viability(48) and hinders tumor growth *in vivo*(50). For this reason, several NUDT1 inhibitors have been developed showing inherent imperfect specificity(16, 17). Data derived from kinome-wide activity surveys interrogating a panel of 456 kinases revealed no kinase other than NUDT1 was significantly inhibited by (S)-Crizotinib(17). Nevertheless, we cannot totally exclude the possibility that targets other than NUDT1 accounts for the effects of the compound. In line with this, a previous study has found that (S)-Crizotinib

induces lethal endoplasmic reticulum (ER) stress response in cultured lung cancer cells independent of NUDT1(52). However, ER stress pathway was not activated in PAH-PASMCs exposed to (S)-Crizotinib (Figure 5C). Interestingly, proteomic analysis also revealed changes of at least one other NUDIX members between control and PAH-PASMCs. Indeed, NUDT4/10/11, impossible to discriminate due to their almost identical sequences, was found to be overexpressed in PAH-PASMCs. Knockdown of NUDT10 and NUDT11 was also reported to markedly affect viability of cancer cells(48). Although this remains to be demonstrated, it can be presumed that (S)-Crizotinib also impacts other NUDT1 family members that share high degree of structural homology(48). Nevertheless, our results demonstrating that inhibition of NUDT1 led to similar outcomes in PAH-PASMCs; i.e. accumulation of nuclear and mitochondrial 8-oxodG, DNA damage overload, impaired mitochondrial function, altered autophagic flux, reduced cell proliferation and increased apoptosis; suggest that most of the effects elicited by (S)-Crizotinib are NUDT1-mediated.

Taken together, our findings reinforce the notion that PAH-PASMCs have developed a network of highly effective and complementary mechanisms devoted to overcome the antiproliferative and lethal effects of DNA damage, including sanitation of the oxidized nucleotide pool (result of the present study), DNA damage sensing(14, 31) and repair(13, 29, 42). In conjunction with this, we documented in a previous study that OGG1, that works in concert with and downstream of NUDT1, was also overexpressed in PAH-PASMCs compared to control cells(42). This indicates that the base excision repair (BER) is an important genome defense pathway used by PAH-PASMCs which counteracts environmental oxidative stress and contributes, at least in part, to maintain strand breaks at a sublethal level in face of the various potential causes of DNA damage. Although our findings support a role for base oxidation regulatory network in DNA damage signaling in PAH we cannot presently estimate the importance of this damage subtype compare to the other from of DNA damage seen in PAH. The Comet assay used in our study measured the global DNA strand breaks and was not associated with a digestion step with OGG1 to estimate further, the level of oxidized DNA bases in the cell(53). Specific quantification oxidized DNA bases will require

complex additional measurements using gas-chromatography coupled with mass spectrometry or HPLC techniques.

In conclusion, our study shows that PAH-PASMCs display increased dependence on NUDT1 for their survival and consequently, that its inhibition may represent a promising new therapeutic avenue in PAH.

### Figure legends

#### Figure 1. Proteomic analysis of PASMCs from control and PAH patients

**A.** Volcano plot comparing control and PAH-PASMC proteomes. Vertical lines: fold-changes of  $\pm 2$ . The horizontal line is indicative of a  $q$ -value threshold of 0.05. Blue (down-regulated) and red (up-regulated) points: proteins that meet both criteria for significant change between control and PAH-PASMCs (i.e.  $q$ -value  $< 0.05$  and absolute value of  $z$ -score  $|z| > 1.96$ ). Black points represent proteins that do not meet both of these criteria. **B.** Two-way, unsupervised hierarchical clustering of control and PAH-PASMC proteomes. Overview of significantly up-regulated and down-regulated proteins between four different PAH-PASMC cell lines as compared to five control PASMC cell lines. The color key from blue to red represents protein abundance from low to high. **C.** KEGG pathway analysis of up-regulated (red) and down-regulated (blue) proteins in PAH-PASMCs. The vertical axis represents the pathway category and the horizontal axis represents the enrichment score of the pathway. The top 5 significantly enriched KEGG pathways ( $P < 0.05$ ) are presented. The data were analyzed by DAVID bioinformatics tools. **D.** Representative western blots and corresponding densitometric analysis of selected differentially expressed proteins (up-regulated in PAH-PASMCs). Protein expression was normalized to Amido black (AB).  $n=5-8$  PASMC cell lines/group. Data are presented as mean  $\pm$  SEM; \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$ .

#### Figure 2. Expression of NUDT1 in PAH patients and animal models

**A.** Representative western blots and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in dissected PAs and lungs from control ( $n=9-12$ ) and PAH ( $n=11-12$ ) patients. **B.** Western blots and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in distal PAs of control rats ( $n=7$ ) as well as rats exhibiting PAH (i.e. Fawn-Hooded rats (FHR), monocrotaline (MCT)- and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-challenged rats,  $n=5-9$  rats per group). **C.** Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA (green) and NUDT1 (red) in lungs from control donors ( $n=9$ ) and PAH patients ( $n=11$ ), confirming the overexpression of NUDT1 in remodeled PAs. The overlay of the two fluorescent images indicate that

NUDT1 is mostly expressed by PAH-PASMCs **D**. Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA (green) and NUDT1 (red) showing increased expression of NUDT1 in remodeled distal PAs of MCT, Su/Hx and FHR rats compared to non-treated animals (n = 7 per group). **E**. Relative NUDT1 mRNA level in control (n=10) and PAH-PASMCs (n=10) determined by quantitative real-time PCR. **F**. Representative Western blots showing dose-dependent diminution of FOXM1, SKP2 and NUDT1 protein expression in PAH-PASMCs (n=3) exposed or not to escalating doses of FOXM1 inhibitors (Siomycin A and Thiostrepton), for 48 hours. Quantification of NUDT1 expression following exposure to Siomycin A and Thiostrepton. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001.

**Figure 3. Effect of pharmacological or molecular inhibition of NUDT1 on 8-oxodG levels and DNA damage.**

**A**. Representative western blots and corresponding densitometric analysis of NUDT1 and OGG1 expression in PAH-PASMCs (n=6) transfected or not with siNUDT1 (20nM) or siRNA negative control (siSCRM) for 48 hours. **B**. Representative western blot and corresponding densitometric analysis of OGG1 expression in PAH-PASMCs (n=6) exposed to escalating concentrations of (S)-Crizotinib. **C and D**. Oxidized DNA was evaluated separately with cytoplasmic and nuclear staining protocol. Representative images of immunofluorescent detection of oxidized DNA with 8-oxoguanine (8-oxoG, green) in mitochondria (labeled with MitoTracker red) and nuclei (DAPI, blue) of PAH-PASMCs exposed or not to (S)-Crizotinib (10 $\mu$ M, C) or siNUDT1 (20nM, D) for 48 hours. The proportion of cells with detectable 8-oxoG in mitochondria and nucleus are presented. **E**. Evaluation of DNA damage by the alkaline comet assay in PAH-PASMCs (n=4) exposed or not to (S)-Crizotinib (10 $\mu$ M, C) or siNUDT1 (20nM, D) for 48 hours. On the left, representative comet assay results are shown. On the right, quantitative relative comparisons of DNA damage as expressed by tail moment and total score are presented. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

**Figure 4. Effect of escalating doses of NUDT1 inhibition on mitochondrial respiratory function, cell proliferation and apoptosis in PAH-PASMCs.**

A-F. Extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) in basal and after treatment with (S)-Crizotinib for 48 hours were examined by the Seahorse XF96 analyzer in PAH-PASMCs (n=3) following indicated injection into media of the specific stressors oligomycin (1 $\mu$ M), FCCP (5 $\mu$ M) and rotenone (1 $\mu$ M) (A). Effects of (S)-Crizotinib on basal ECAR (B), basal OCR (C), ATP production (D), maximal OCR (E) and spare respiratory capacity (F). Seahorse data were normalized using total protein amount. G. Quantitative analysis of TUNEL-positive PAH-PASMCs (n=3) treated or not with (S)-Crizotinib (2,5 to 10 $\mu$ M) or siNUDT1 (20nM) or their respective controls for 48 hours. Data are normalized to the non-treated (NT) group. H. Quantitative analysis of proliferative Ki67-positive PAH-PASMCs (n=4) treated or not with (S)-Crizotinib (2,5 to 10 $\mu$ M) or siNUDT1 (20nM) or their respective controls for 48 hours. Data are normalized to the non-treated (NT) group. I. Representative Western blots and corresponding densitometric analysis of PCNA, PLK1 and Survivin expression in PAH-PASMCs (n=3-6) treated or not with (S)-Crizotinib (2,5 to 10 $\mu$ M) or siNUDT1 (20nM) or their respective controls for 48 hours. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001.

**Figure 5. Effect of (S)-Crizotinib on autophagy.**

A. Representative western blots and corresponding densitometric analysis of LC3B, p62 and PINK1 in PAH-PASMCs (n=6) treated with (S)-Crizotinib or its vehicle for 48h. B. Representative images of immunofluorescent detection of LC3B in PAH-PASMCs (n=3) exposed to (S)-Crizotinib or its vehicle for 48h and corresponding quantification of the percentage of LC3-positive PAH-PASMCs. C. Representative western blots and corresponding densitometric analysis of Calnexin and GRP78 in PAH-PASMCs (n=4) treated with (S)-Crizotinib or its vehicle for 48h. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001.

**Figure 6. Effects of nebulized (S)-Crizotinib treatment on monocrotaline (MCT)-induced PAH in rats.** **A.** Schematic representation of the experimental design and schedule of the protocol. **B.** Right ventricular systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), stroke volume (SV), heart rate, cardiac output (CO), total pulmonary resistance (TPR), and Fulton index were measured in control (CTRL), MCT + vehicle (Veh), and MCT + (S)-Crizotinib; n= 4 to 16 rats/group. **C.** Representative images of distal pulmonary arteries (PAs) stained with Elastica von Gieson (EVG) or labeled with 8-oxoG and cleaved Caspase-3 in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ -smooth muscle actin (green). Graphs on the right represent the degree of medial wall thickness as well as the percentage of PASMCs positive for 8-oxoG and cleaved Caspase-3 in distal PAs. Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001.

**Figure 7. Effects of nebulized (S)-Crizotinib treatment on Sugen-Hypoxia (Su/Hx)-induced PAH in rats.** **A.** Schematic representation of the experimental design and schedule of the protocol. **B.** Right ventricular systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), stroke volume (SV), heart rate, cardiac output (CO), total pulmonary resistance (TPR), and Fulton index were measured in control (CTRL), Su/Hx + vehicle (Veh), and Su/Hx + (S)-Crizotinib; n= 4 to 9 rats/group. **C.** Representative images of distal pulmonary arteries (PAs) stained with Elastica von Gieson (EVG) or labeled with 8-oxoG and cleaved Caspase-3 in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ -smooth muscle actin (green). Graphs on the right represent the degree of medial wall thickness as well as the percentage of PASMCs positive for 8-oxoG and cleaved Caspase-3 in distal PAs. Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001; \*\*\*\*P < 0.0001.

## References

1. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmüller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *The European respiratory journal* 2019; 53.
2. Lajoie AC, Lauziere G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 291-305.
3. Michelakis ED. Spatio-temporal diversity of apoptosis within the vascular wall in pulmonary arterial hypertension: heterogeneous BMP signaling may have therapeutic implications. *Circ Res* 2006; 98: 172-175.
4. Guignabert C, Phan C, Seferian A, Huertas A, Tu L, Thuillet R, Sattler C, Le Hirss M, Tamura Y, Jutant EM, Chaumais MC, Bouchet S, Maneglier B, Molimard M, Rousselot P, Sitbon O, Simonneau G, Montani D, Humbert M. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2016; 126: 3207-3218.
5. Pullamsetti SS, Berghausen EM, Dabral S, Tretyn A, Butrous E, Savai R, Butrous G, Dahal BK, Brandes RP, Ghofrani HA, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Rosenkranz S, Schermuly RT. Role of Src tyrosine kinases in experimental pulmonary hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1354-1365.
6. Budhiraja R, Tuder RM, Hassoun PM. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109: 159-165.

7. Boucherat O, Vitry G, Trinh I, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2017; 7: 285-299.
8. Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, Goncharova EA. Translational Advances in the Field of Pulmonary Hypertension. From Cancer Biology to New Pulmonary Arterial Hypertension Therapeutics. Targeting Cell Growth and Proliferation Signaling Hubs. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 425-437.
9. Guignabert C, Tu L, Le Hir M, Ricard N, Sattler C, Seferian A, Huertas A, Humbert M, Montani D. Pathogenesis of pulmonary arterial hypertension: lessons from cancer. *Eur Respir Rev* 2013; 22: 543-551.
10. Gamen E, Seeger W, Pullamsetti SS. The emerging role of epigenetics in pulmonary hypertension. *The European respiratory journal* 2016; 48: 903-917.
11. Sutendra G, Michelakis ED. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell metabolism* 2014; 19: 558-573.
12. Ryan JJ, Archer SL. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension (PAH): Part I: Metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in PAH. *Circulation* 2015; 131: 1691-1702.
13. 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, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014; 129: 786-797.

14. Bourgeois A, Bonnet S, Breuils-Bonnet S, Habbout K, Paradis R, Tremblay E, Lampron MC, Orcholski ME, Potus F, Bertero T, Peterlini T, Chan SY, Norris KA, Paulin R, Provencher S, Boucherat O. Inhibition of CHK 1 (Checkpoint Kinase 1) Elicits Therapeutic Effects in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39: 1667-1681.
15. Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW. Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res* 2013; 112: 1159-1170.
16. Gad H, Koolmeister T, Jemth AS, Eshtad S, Jacques SA, Strom CE, Svensson LM, Schultz N, Lundback T, Einarsdottir BO, Saleh A, Gokturk C, Baranczewski P, Svensson R, Bernthsson RP, Gustafsson R, Stromberg K, Sanjiv K, Jacques-Cordonnier MC, Desroses M, Gustavsson AL, Olofsson R, Johansson F, Homan EJ, Loseva O, Brautigam L, Johansson L, Hoglund A, Hagenkort A, Pham T, Altun M, Gaugaz FZ, Vikingsson S, Evers B, Henriksson M, Vallin KS, Wallner OA, Hammarstrom LG, Wiita E, Almlof I, Kalderen C, Axelsson H, Djureinovic T, Puigvert JC, Haggblad M, Jeppsson F, Martens U, Lundin C, Lundgren B, Granelli I, Jensen AJ, Artursson P, Nilsson JA, Stenmark P, Scobie M, Berglund UW, Helleday T. MTH1 inhibition eradicates cancer by preventing sanitation of the dNTP pool. *Nature* 2014; 508: 215-221.
17. Huber KV, Salah E, Radic B, Gridling M, Elkins JM, Stukalov A, Jemth AS, Gokturk C, Sanjiv K, Stromberg K, Pham T, Berglund UW, Colinge J, Bennett KL, Loizou JI,

- Helleday T, Knapp S, Superti-Furga G. Stereospecific targeting of MTH1 by (S)-crizotinib as an anticancer strategy. *Nature* 2014; 508: 222-227.
18. Nakabeppu Y, Ohta E, Abolhassani N. MTH1 as a nucleotide pool sanitizing enzyme: Friend or foe? *Free Radic Biol Med* 2017; 107: 151-158.
19. Provencher S, Archer SL, Ramirez FD, Hibbert B, Paulin R, Boucherat O, Lacasse Y, Bonnet S. Standards and Methodological Rigor in Pulmonary Arterial Hypertension Preclinical and Translational Research. *Circ Res* 2018; 122: 1021-1032.
20. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e47.
21. Guzinska-Ustymowicz K, Pryczynicz A, Kemon A, Czyzewska J. Correlation between proliferation markers: PCNA, Ki-67, MCM-2 and antiapoptotic protein Bcl-2 in colorectal cancer. *Anticancer Res* 2009; 29: 3049-3052.
22. Golpon HA, Geraci MW, Moore MD, Miller HL, Miller GJ, Tudor RM, Voelkel NF. HOX genes in human lung: altered expression in primary pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Pathol* 2001; 158: 955-966.
23. Ashek A, Spruijt OA, Harms HJ, Lammertsma AA, Cupitt J, Dubois O, Wharton J, Dabral S, Pullamsetti SS, Huisman MC, Frings V, Boellaard R, de Man FS, Botros L, Jansen S, Vonk Noordegraaf A, Wilkins MR, Bogaard HJ, Zhao L. 3'-Deoxy-3'-[18F]Fluorothymidine Positron Emission Tomography Depicts Heterogeneous

- Proliferation Pathology in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension Patient Lung. *Circ Cardiovasc Imaging* 2018; 11: e007402.
24. Greenway S, van Suylen RJ, Du Marchie Sarvaas G, Kwan E, Ambartsumian N, Lukanidin E, Rabinovitch M. S100A4/Mts1 produces murine pulmonary artery changes resembling plexogenic arteriopathy and is increased in human plexogenic arteriopathy. *Am J Pathol* 2004; 164: 253-262.
25. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature protocols* 2009; 4: 44-57.
26. Sakai Y, Furuichi M, Takahashi M, Mishima M, Iwai S, Shirakawa M, Nakabeppu Y. A molecular basis for the selective recognition of 2-hydroxy-dATP and 8-oxo-dGTP by human MTH1. *J Biol Chem* 2002; 277: 8579-8587.
27. Nakabeppu Y, Oka S, Sheng Z, Tsuchimoto D, Sakumi K. Programmed cell death triggered by nucleotide pool damage and its prevention by MutT homolog-1 (MTH1) with oxidized purine nucleoside triphosphatase. *Mutat Res* 2010; 703: 51-58.
28. Yoshimura D, Sakumi K, Ohno M, Sakai Y, Furuichi M, Iwai S, Nakabeppu Y. An oxidized purine nucleoside triphosphatase, MTH1, suppresses cell death caused by oxidative stress. *J Biol Chem* 2003; 278: 37965-37973.
29. Lampron MC, Vitry G, Nadeau V, Grobs Y, Paradis R, Samson N, Tremblay E, Boucherat O, Meloche J, Bonnet S, Provencher S, Potus F, Paulin R. PIM1 (Moloney Murine Leukemia Provirus Integration Site) Inhibition Decreases the Nonhomologous End-

- Joining DNA Damage Repair Signaling Pathway in Pulmonary Hypertension.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40: 783-801.
30. Park HJ, Carr JR, Wang Z, Nogueira V, Hay N, Tyner AL, Lau LF, Costa RH, Raychaudhuri P. FoxM1, a critical regulator of oxidative stress during oncogenesis. *The EMBO journal* 2009; 28: 2908-2918.
31. Bourgeois A, Lambert C, Habbout K, Ranchoux B, Paquet-Marceau S, Trinh I, Breuils-Bonnet S, Paradis R, Nadeau V, Paulin R, Provencher S, Bonnet S, Boucherat O. FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2018; 96: 223-235.
32. Dai Z, Zhu MM, Peng Y, Jin H, Machireddy N, Qian Z, Zhang X, Zhao YY. Endothelial and Smooth Muscle Cell Interaction via FoxM1 Signaling Mediates Vascular Remodeling and Pulmonary Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198: 788-802.
33. Hegde NS, Sanders DA, Rodriguez R, Balasubramanian S. The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thioestrepton. *Nat Chem* 2011; 3: 725-731.
34. Bhat UG, Halasi M, Gartel AL. Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* 2009; 4: e5592.
35. Magkouta SF, Pappas AG, Vaitsi PC, Agioutantis PC, Pateras IS, Moschos CA, Iliopoulou MP, Kosti CN, Loutrari HV, Gorgoulis VG, Kalomenidis IT. MTH1 favors mesothelioma progression and mediates paracrine rescue of bystander endothelium from oxidative damage. *JCI Insight* 2020; 5.

36. Zhao B, Barrera LA, Ersing I, Willox B, Schmidt SC, Greenfeld H, Zhou H, Mollo SB, Shi TT, Takasaki K, Jiang S, Cahir-McFarland E, Kellis M, Bulyk ML, Kieff E, Gewurz BE. The NF-kappaB genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep* 2014; 8: 1595-1606.
37. Wang IC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, Tan Y, Ackerson T, Costa RH. Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 10875-10894.
38. Wang JY, Liu GZ, Wilmott JS, La T, Feng YC, Yari H, Yan XG, Thorne RF, Scolyer RA, Zhang XD, Jin L. Skp2-Mediated Stabilization of MTH1 Promotes Survival of Melanoma Cells upon Oxidative Stress. *Cancer Res* 2017; 77: 6226-6239.
39. Arai K, Morishita K, Shinmura K, Kohno T, Kim SR, Nohmi T, Taniwaki M, Ohwada S, Yokota J. Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage. *Oncogene* 1997; 14: 2857-2861.
40. Ohno M, Oka S, Nakabeppu Y. Quantitative analysis of oxidized guanine, 8-oxoguanine, in mitochondrial DNA by immunofluorescence method. *Methods Mol Biol* 2009; 554: 199-212.
41. Soultanakis RP, Melamede RJ, Bespalov IA, Wallace SS, Beckman KB, Ames BN, Taatjes DJ, Janssen-Heininger YM. Fluorescence detection of 8-oxoguanine in nuclear and mitochondrial DNA of cultured cells using a recombinant Fab and confocal scanning laser microscopy. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 987-998.

42. Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, Nadeau V, Breuils-Bonnet S, Boilet-Molez S, Potus F, Meloche J, Chabot S, Lambert C, Tremblay E, Chae YC, Altieri DC, Sutendra G, Michelakis ED, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198: 90-103.
43. Liu X, Lei M, Erikson RL. Normal cells, but not cancer cells, survive severe Plk1 depletion. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 2093-2108.
44. Tsuzuki T, Egashira A, Kura S. Analysis of MTH1 gene function in mice with targeted mutagenesis. *Mutat Res* 2001; 477: 71-78.
45. Dikic I, Elazar Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature reviews Molecular cell biology* 2018; 19: 349-364.
46. Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, Hassoun PM, Rabinovitch M, Nicolls MR, Humbert M. Translating Research into Improved Patient Care in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2017; 195: 583-595.
47. Hoeper MM, McLaughlin VV, Barbera JA, Frost AE, Ghofrani HA, Peacock AJ, Simonneau G, Rosenkranz S, Oudiz RJ, White RJ, Miller KL, Langley J, Harris JHN, Blair C, Rubin LJ, Vachiery JL. Initial combination therapy with ambrisentan and tadalafil and mortality in patients with pulmonary arterial hypertension: a secondary analysis of the results from the randomised, controlled AMBITION study. *The Lancet Respiratory medicine* 2016; 4: 894-901.

48. Carreras-Puigvert J, Zitnik M, Jemth AS, Carter M, Unterlass JE, Hallstrom B, Loseva O, Karem Z, Calderon-Montano JM, Lindskog C, Edqvist PH, Matuszewski DJ, Ait Blal H, Berntsson RPA, Haggblad M, Martens U, Studham M, Lundgren B, Wahlby C, Sonnhammer ELL, Lundberg E, Stenmark P, Zupan B, Helleday T. A comprehensive structural, biochemical and biological profiling of the human NUDIX hydrolase family. *Nat Commun* 2017; 8: 1541.
49. Jemth AS, Gustafsson R, Brautigam L, Henriksson L, Vallin KSA, Sarno A, Almlof I, Homan E, Rasti A, Warpman Berglund U, Stenmark P, Helleday T. MutT homologue 1 (MTH1) catalyzes the hydrolysis of mutagenic O6-methyl-dGTP. *Nucleic Acids Res* 2018; 46: 10888-10904.
50. Patel A, Burton DG, Halvorsen K, Balkan W, Reiner T, Perez-Stable C, Cohen A, Munoz A, Giribaldi MG, Singh S, Robbins DJ, Nguyen DM, Rai P. MutT Homolog 1 (MTH1) maintains multiple KRAS-driven pro-malignant pathways. *Oncogene* 2015; 34: 2586-2596.
51. McPherson LA, Troccoli CI, Ji D, Bowles AE, Gardiner ML, Mohsen MG, Nagathihalli NS, Nguyen DM, Robbins DJ, Merchant NB, Kool ET, Rai P, Ford JM. Increased MTH1-specific 8-oxodGTPase activity is a hallmark of cancer in colon, lung and pancreatic tissue. *DNA Repair (Amst)* 2019; 83: 102644.
52. Dai X, Guo G, Zou P, Cui R, Chen W, Chen X, Yin C, He W, Vinothkumar R, Yang F, Zhang X, Liang G. (S)-crizotinib induces apoptosis in human non-small cell lung cancer cells by activating ROS independent of MTH1. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36: 120.

53. Azqueta A, Slysikova J, Langie SA, O'Neill Gaivao I, Collins A. Comet assay to measure DNA repair: approach and applications. *Front Genet* 2014; 5: 288.

Figure 1

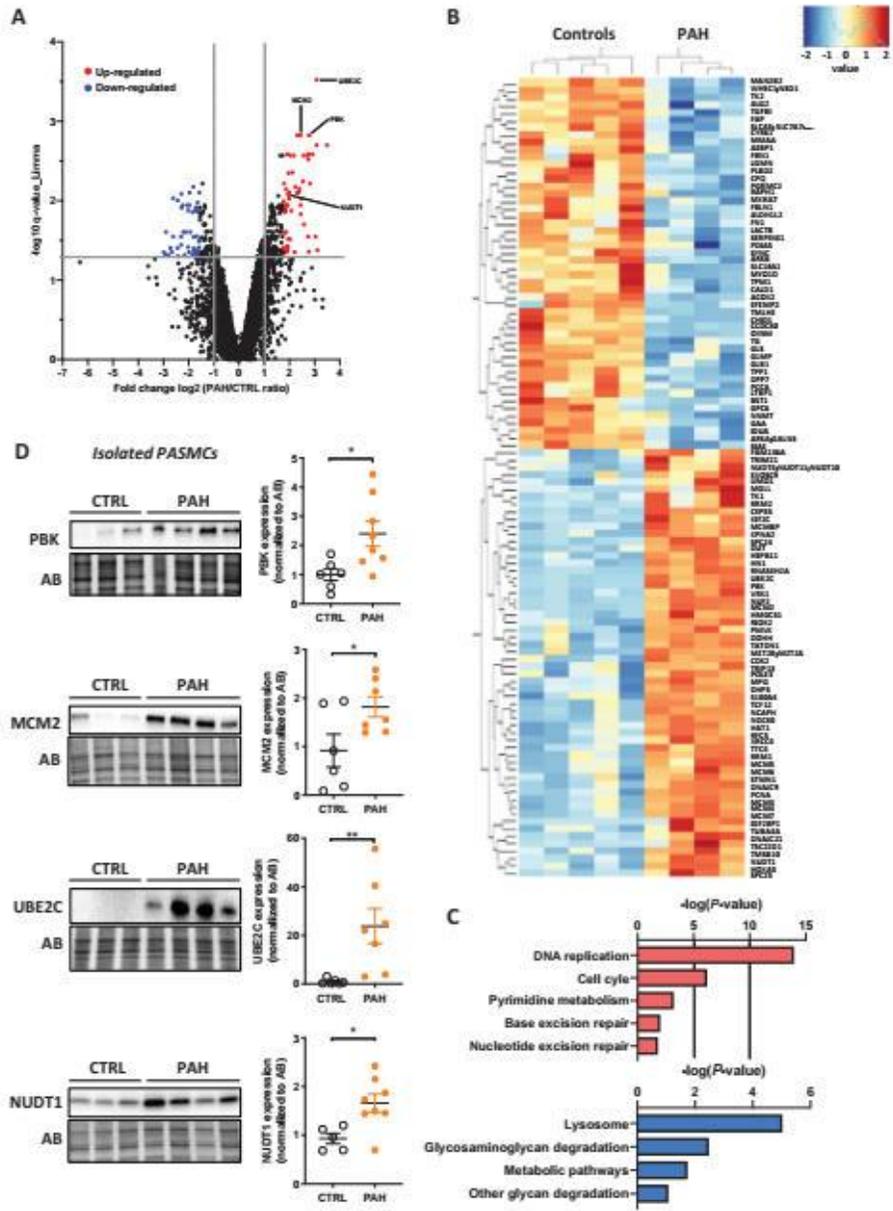


Figure 2

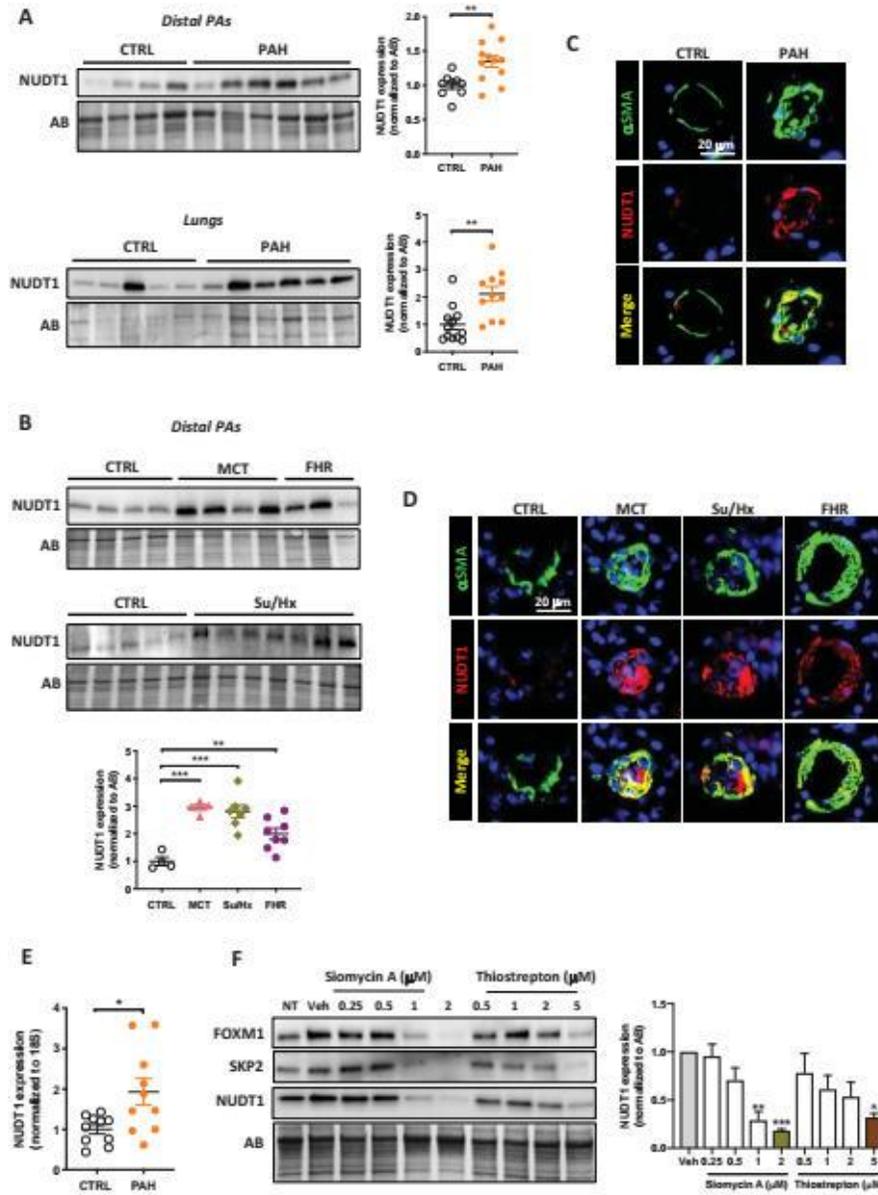


Figure 3

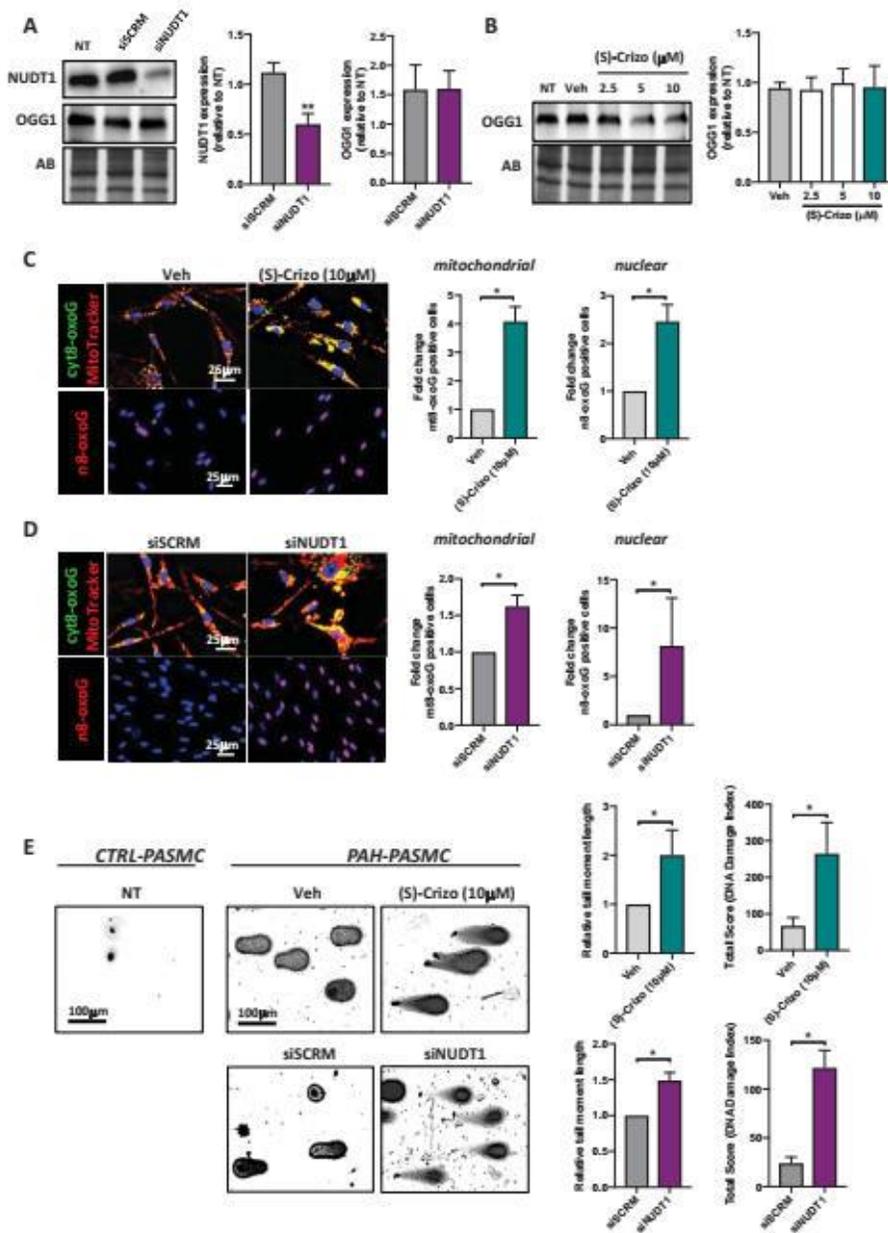


Figure 4

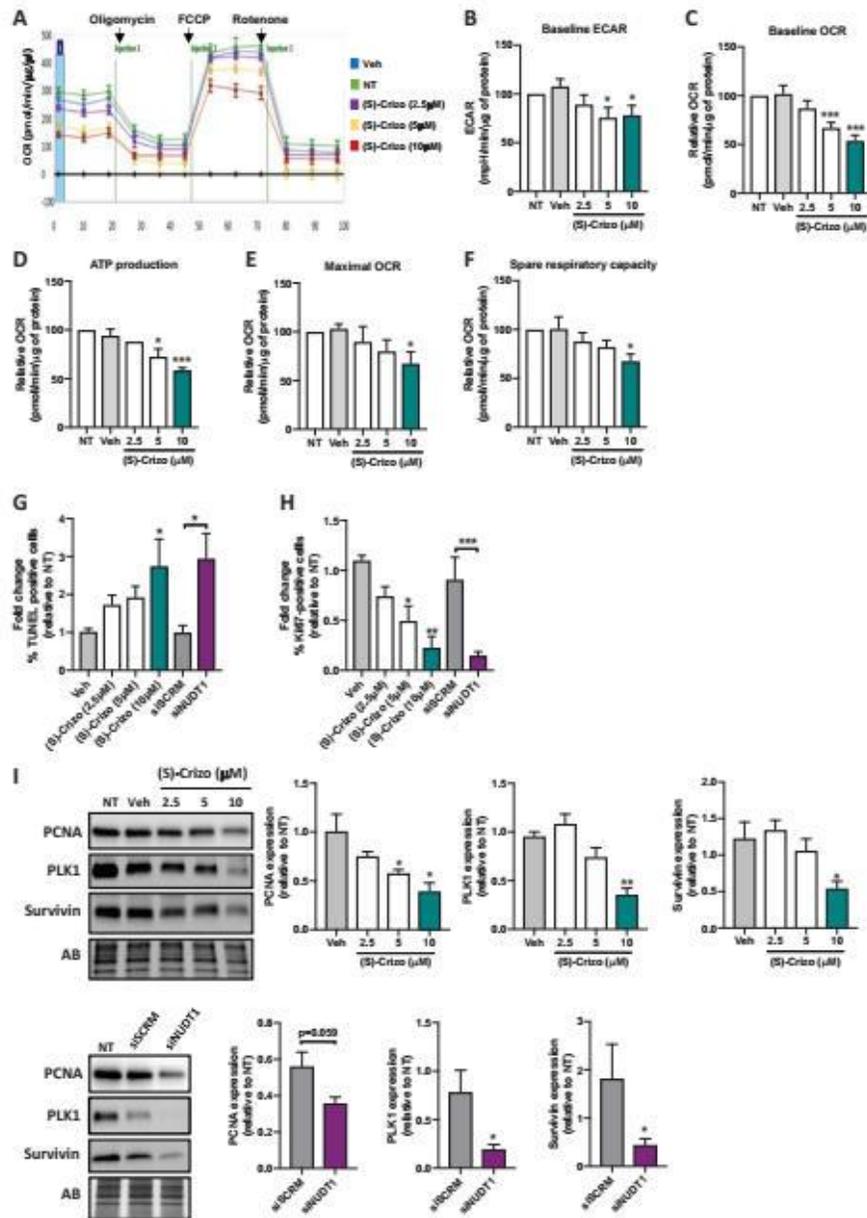


Figure 5

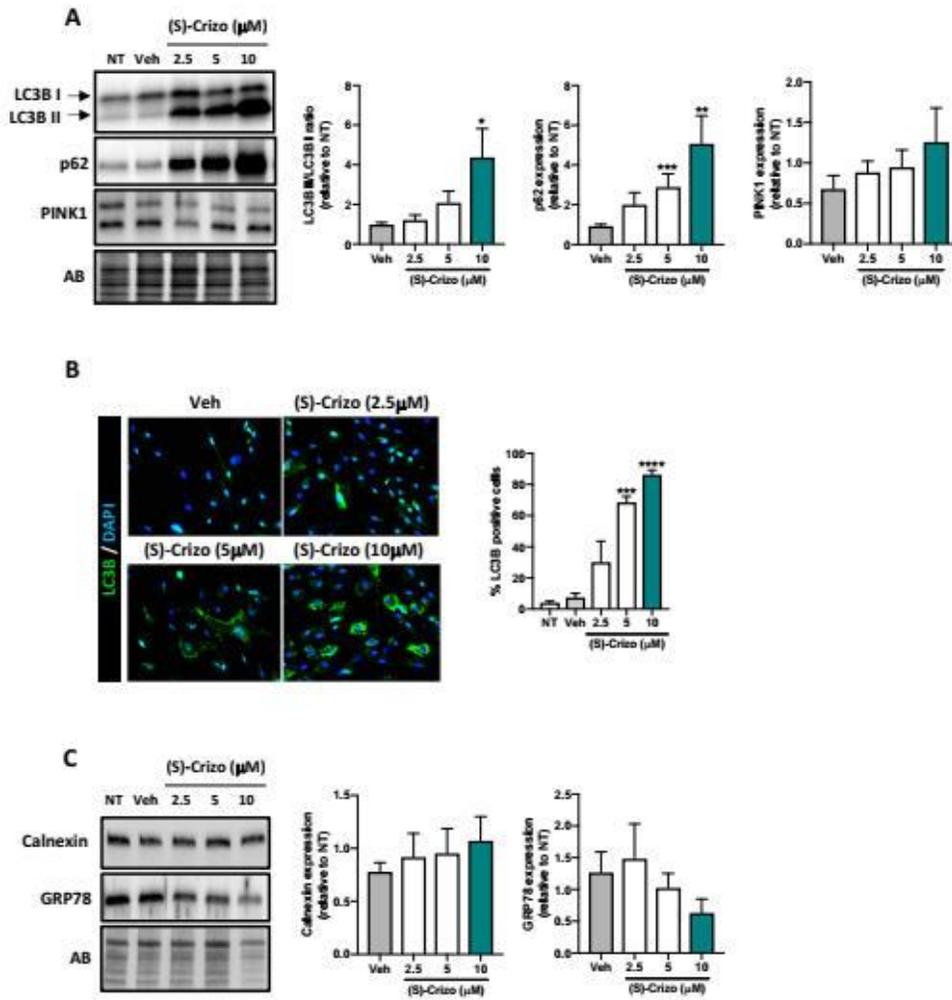


Figure 6

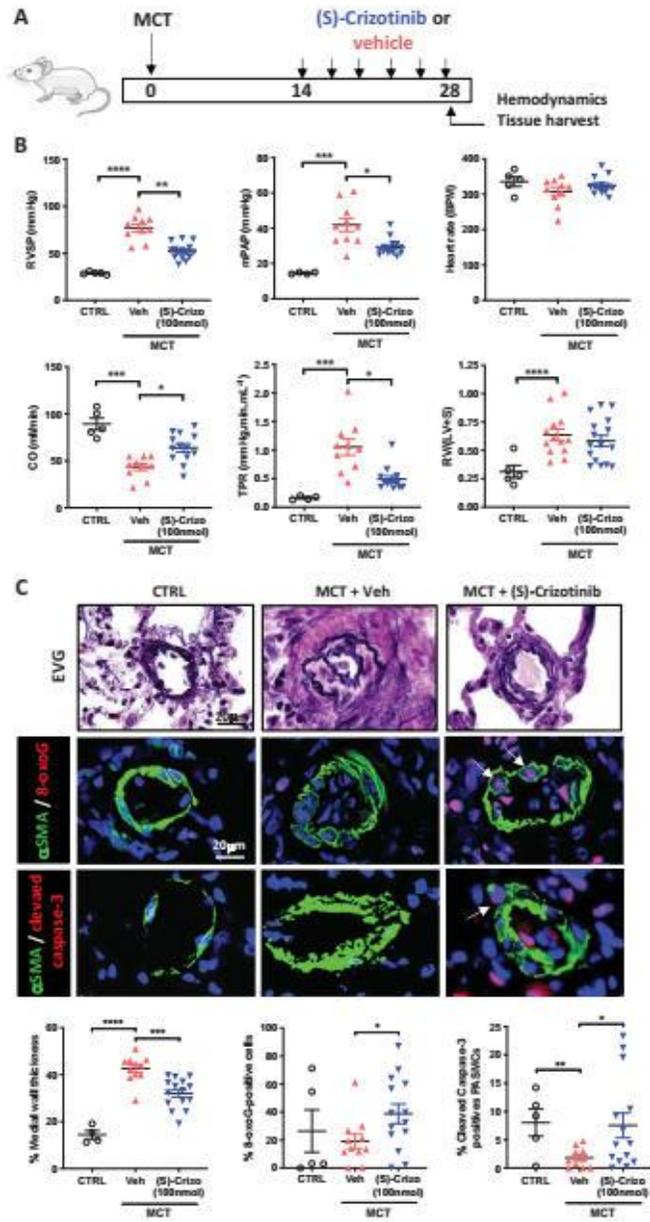
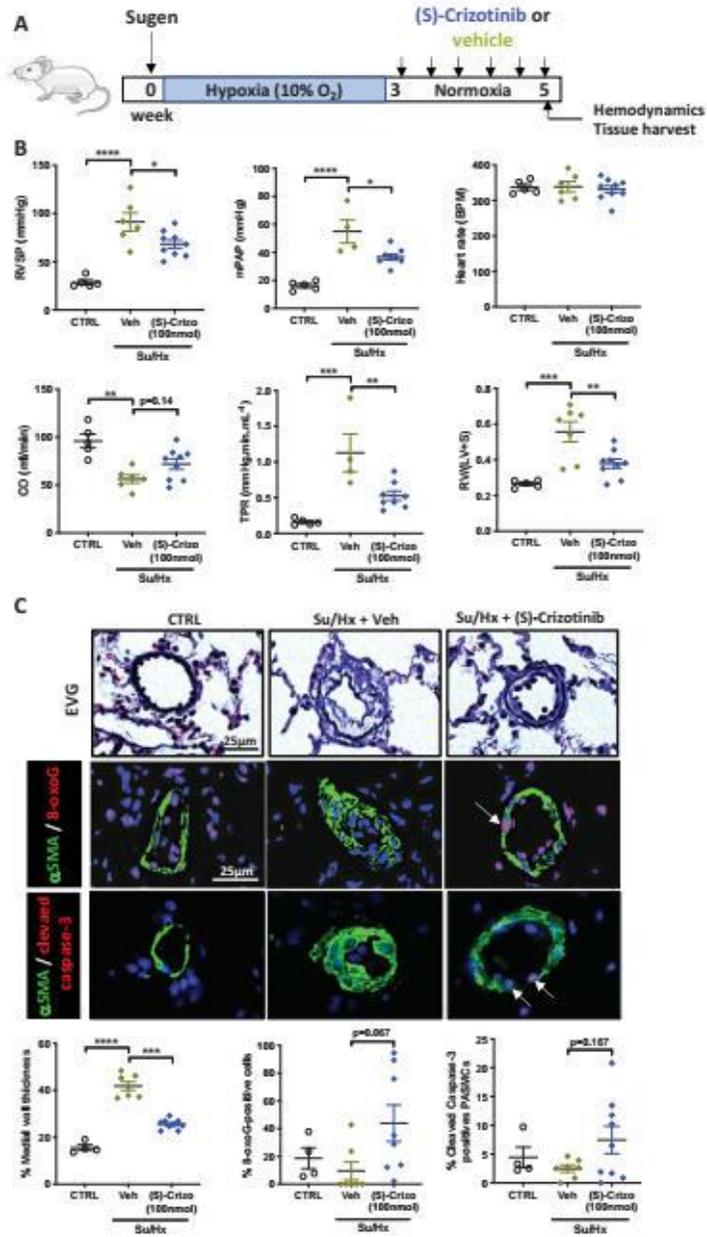


Figure 7



**Oxidized DNA Precursors Cleanup by NUDT1 Contributes to Vascular Remodeling in PAH**

Géraldine Vitry, Roxane Paulin, Yann Grobs, Marie-Claude Lampron, Tsukasa Shimauchi, Sarah-Eve Lemay, Eve Tremblay, Karima Habbout, Charifa Awada, Alice Bourgeois, Valérie Nadeau, Renée Paradis, Sandra Breuils-Bonnet, Florence Roux-Dalvai, Mark Orcholski, François Potus, Steeve Provencher, Olivier Boucherat, and Sébastien Bonnet

**Online Data Supplement**

## **Supplemental Methods**

### ***Cell Culture and Treatments***

PAH-PASMCs ( $n = 13$  cell lines) were isolated from small PAs (<1 mm diameter) from patients with PAH. Control PASMCs ( $n = 12$  cell lines) were either purchased from Cell Application or isolated from patients without PAH at autopsy, as previously described(1, 2). Cells were used at passages four to nine for experiments. PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic/antimycotic (Thermo Fisher Scientific). (S)-Crizotinib (Selleckchem), Thiostrepton (Santa Cruz Biotechnologies), and Siomycin A (Cayman Chemical) were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), at a stock solution of 100mM, 2mM, and 2mM, respectively, and then added to the culture medium at the indicated concentration immediately before use. siNUDT1 (#HSS142985, Thermo Fisher Scientific) and scrambled control siRNA (#AM4637, Thermo Fisher Scientific) were transfected at a final concentration of 20nM with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. For gain-of-function experiments, control PASMCs were infected with an adenoviral vector expressing the human NUDT1 gene (SignaGen laboratories) at a multiplicity of infection (MOI) of 50 for 48h. Cells infected with an empty vector (AdNull) were used as control. To evaluate the effects of NUDT1 overexpression against oxidative damage, control cells were infected with recombinant adenovirus, grown for 24h and then treated with 500 $\mu$ M hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) for 24h before experiments.

### ***Proteomics***

#### **Protein in-gel digestion**

Bands of interest were cut out from the gel, placed in 96-well plate and then washed with water. Tryptic digestion was performed on a MassPrep liquid handling robot (Waters, Milford, USA) according to the manufacturer's specifications and to the protocol of Shevchenko *et al*(3) with the modifications suggested

by Havlis *et al*(4). Briefly, proteins were reduced with 10mM DTT and alkylated with 55mM iodoacetamide. Trypsin digestion was performed using 126nM of modified porcine trypsin (Sequencing grade, Promega, Madison, WI) at 37°C overnight. Digestion products were extracted using 1% formic acid, 2% acetonitrile followed by 1% formic acid, 50% acetonitrile. The recovered extracts were pooled, vacuum centrifuge dried and then resuspended at 0.4 µg/µL with 2% acetonitrile, 0.05% trifluoroacetic acid.

#### NanoLC/MSMS analysis

For each sample, 5 µL of resuspended peptide digestion (equivalent to 2µg peptides) were injected and separated by online reversed-phase (RP) nanoscale capillary liquid chromatography (nanoLC) and analyzed by electrospray mass spectrometry (ESI MS/MS). The experiments were performed with a Dionex UltiMate 3000 nanoRSLC chromatography system (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) connected to an Orbitrap Fusion Tribrid ETD mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nanoelectrospray ion source. Peptides were trapped at 20 µL/min in loading solvent (2% acetonitrile, 0.05% TFA) on a 5mm length 300 µm I.D., 5µm particles Acclaim™ PepMap™ 100 pre-column cartridge (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) during 5 minutes. Then, the pre-column was switched online with 500mm length, 75 µm I.D., 3µm particles, Acclaim™ PepMap™ 100 C18 analytical column (Thermo Fisher Scientific / Dionex Softron GmbH, Germering, Germany) and the peptides were eluted with a linear gradient from 5-40% solvent B (A: 0.1% formic acid, B: 80% acetonitrile, 0.1% formic acid) in 270 minutes, at 300 nL/min. Mass spectra were acquired using a Data Dependent Acquisition mode using Thermo XCalibur software version 3.0.63. Full scan mass spectra (350 to 1800m/z) were acquired in the orbitrap using an AGC target of 4e5, a maximum injection time of 50 ms and a resolution of 120 000. Internal calibration using lock mass on the m/z 445.12003 siloxane ion was used. Each MS scan was followed by acquisition of fragmentation MSMS spectra of the most intense ions for a total cycle time of 3 seconds (top speed mode). The selected ions were isolated using the quadrupole analyzer in a window of 1.6 m/z and fragmented by Higher energy Collision-induced Dissociation (HCD) with 35% of collision energy. The resulting fragments were detected by the

linear ion trap in Rapid scan rate with an AGC target of  $1e4$  and a maximum injection time of 50ms. Dynamic exclusion of previously fragmented peptides was set for a period of 20 sec and a tolerance of 10 ppm.

#### **Database searching and Label Free Quantification**

Spectra were searched against a human proteins database (Uniprot Complete Proteome – taxonomy Homo Sapiens – 29.03.2017) using the Andromeda module of MaxQuant software v. 1.5.5.1(5). Trypsin/P enzyme parameter was selected with two possible missed cleavages. Carbamidomethylation of cysteins was set as fixed modification, methionine oxidation and acetylation of protein N-terminus as variable modifications. Mass search tolerance were 5ppm and 0.6Da for MS and MS/MS respectively. For protein validation, a maximum False Discovery Rate of 1% at peptide and protein level was used based on a target/decoy search. MaxQuant was also used for Label Free Quantification. The 'match between runs' option was used with 20 min as alignment time window and 3 min as match time window values. Only unique and razor peptides were used for quantification. All other parameters were set at default values.

#### **Data treatment and statistical analysis related to proteomics**

The peptides.txt file generated by MaxQuant was used in R software v 3.4. The intensity values of each peptide in each sample were normalized using the median of all intensity values in each sample (normalization by column). Only peptides having at least two values in one of the two conditions to compare were considered as quantified. Other missing values were imputed using a noise value calculated as the first centile of all intensity values per sample. Quantifiable peptides were then aggregated into proteins using the *Leading Razor Protein* accession number given by MaxQuant and the intensity values of their corresponding peptides were summed for each sample. Only proteins with at least 2 quantified peptides were kept for further analysis. For each protein, a ratio between the two conditions to compare was calculated using the average of protein intensities in all samples of the same group. These ratios were then converted into z-score ( $z = (x-\mu)/\sigma$ ) where ( $x = \log_2(\text{ratio})$ ;  $\mu = \text{average of all } \log_2(\text{ratios})$ ;  $\sigma = \text{standard deviation}$ )

of all  $\log_2(\text{ratios})$ ) for data centering. A statistical test was finally performed using the Limma Bioconductor package(6) to define the probability of variation ( $p$ -value) of each protein between the two groups. The Benjamini-Hochberg method was used to adjust the  $p$ -values for multiple testing and thus obtain  $q$ -values. Proteins with a  $q$ -value  $< 0.05$  and absolute value of  $z$ -score  $|z| > 1.96$  were considered as significantly variant between the two conditions.

#### ***Real-time quantitative PCR***

Total RNA was isolated from human PSMCs using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The quality and concentration of total RNA were then determined with a spectrophotometer (NanoDrop 2000, Thermo Scientific, USA). RNA integrity was confirmed by electrophoresis on a denaturing agarose gel. Complementary DNA (cDNA) was synthesized using the qScript Flex cDNA Synthesis Kit (Quanta bio). The expression levels of NUDT1 was carried out in a QuantStudio 7 Flex real-time PCR system (Applied Biosystems) using SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories). Each sample was analyzed in triplicate. NUDT1 expression was normalized to the housekeeping gene 18S. Relative expression levels were calculated using the  $\Delta\Delta Ct$  method. The primers (forward and reverse, 5'-3') for amplification of NUDT1 and 18S were as follows: NUDT1: GGGCAAAGTGCAAGAAGGAG and CCCACGAACTCAAACACGAT; 18S: CGC ACG GCC GGT ACA GTG AAand GGG AGA GGA GCG AGC GAC CA

#### ***Western Blotting and Quantification***

Total protein was extracted from liver, quadriceps muscles, right ventricles, lungs, dissected distal PA and cultured cells using a 2% Chaps protein extraction buffer supplemented with a protease-inhibitor cocktail (Roche). Total protein concentration was determined by the Bradford method. Equal amounts of total proteins were electrophoresed on reducing sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels and transferred to PVDF membranes. After blocking with either 5% non-fat dry milk or 10% goat serum in TBS-T buffer, membranes were incubated with primary antibodies in 3% BSA overnight at 4°C. Following this,

membranes were rinsed 3 times with TBS-T buffer and then incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody for 1 hour at RT in 5% non-fat milk or in 3% BSA. The antibody complexes were detected using enhanced chemiluminescence reagents (Perkin-Elmer) and labeled proteins were detected with the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to Amido black as previously described(7, 8). The sources and working dilutions of primary and secondary antibodies are listed in Table E3.

#### ***Modified alkaline comet assay***

The alkaline comet assay was performed using CometAssay Reagent kit for Single Cell Gel Electrophoresis Assay (Trevigen, USA) according to the manufacturer's protocol. The tail moment length (defined as the distance between the center of the head and the center of the tail) of each cell was measured manually using ImageJ. Comet tail lengths (consisting of the nuclear region and tail) were scored visually into five classes: 0 (no damage) to 4 (maximum damaged), as described by Collins et al.(9, 10). For each experiment, 50 cells were scored from replicate slides (100 cells total per cell line) and subsequently pooled.

#### ***Mitochondrial respiration and glycolysis***

Mitochondrial respiration and aerobic glycolysis were monitored in real time with the Seahorse Bioscience Extracellular Flux Analyzer (XF96; Seahorse Bioscience) by measuring the OCR (oxygen consumption rate; indicative of respiration) and ECAR (extracellular acidification rate; indicative of glycolysis), as previously done(7). Values were normalized to the total protein concentration per well assessed by a Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories) after completion of the XF assay.

#### ***In vitro proliferation and apoptosis measurements***

Control and PAH-PASMCs were cultured for 48 hours in presence or absence of (S)-Crizotinib, siNUDT1, AdNUDT1 or their respective controls. After treatments, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in

PBS at room temperature for 15 minutes. Cell proliferation was determined by Ki67 labeling, as previously done(2, 7). Cell apoptosis was detected using the *in situ* DeadEnd fluorometric terminal transferase dUTP nick end-labeling assay (Promega), as per the manufacturer's instructions. The proliferative and apoptosis indices were calculated as the ratio of Ki67- or TUNEL-positive cells to the total number of DAPI-stained cells per field, respectively. For each cell line, experiments were performed in triplicate and at least 750 cells per condition were counted.

***Fluorescence imaging of 8-oxoG DNA lesions in cultured cells.***

Detection of 8-oxoG in DNA was performed as described by Ohno et al.(11) with slight modifications. For cytosolic detection and localization of 8-oxoG in mitochondrial DNA, live cells were incubated with MitoTracker Red (ThermoFisher Scientific) for 40 min at 37°C. Next, cells were fixed in 2% paraformaldehyde (PFA) for 15 min at room temperature (RT), washed with cold PBS and then fixed in cold methanol 10 min at room temperature (RT). Cells were then rinsed with PBS and treated with RNase A at 37°C for 1h to eliminate RNA. After rinsing in PBS + 0.1% Triton-X 100, cells were re-fixed by incubation with 4% PFA for 10 min at RT and then mitochondrial DNA was denatured with 50mM NaOH in 50% ethanol for 5 minutes. For nuclear 8-oxoG detection, nuclear DNA was denatured in 2N HCl solution for 20 min. Once mitochondrial or nuclear DNA denatured, cells were washed in PBS, followed by 1 hour blocking step with PBS supplemented with 10% goat serum. Next, cells were incubated overnight at 4°C with a mouse monoclonal antibody against 8-oxodG diluted in 2% goat serum. After 3 washes with PBS, appropriate fluorescent secondary antibodies were applied for 1 hour at RT. Sections were mounted onto coverslips using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) Fluoromount G mounting medium. Sections were examined by confocal microscopy using an Axio Observer microscope (Zeiss), and images were acquired using Zen system (Zeiss).

### ***In Vivo Assessment of Pulmonary Hypertension and RV Hypertrophy***

Before sacrifice, rats were anesthetized with 3%–4% isoflurane and underwent right heart catheterization. Briefly, a polyethylene catheter connected to a pressure transducer (SciSense catheters, Dover) was inserted into the right external jugular vein of closed-chest rats, and threaded into the RV and the PA to obtain RV systolic pressure (RVSP), mean PA pressure (mPAP), and RV cardiac output, as previously described(2, 7, 12). All measurements and analyses were performed blinded to the condition. Once hemodynamic data collected, rats were euthanized and the hearts excised and dissected to determine the RV/(left ventricle + septum) ratio (Fulton Index) as a parameter of RV hypertrophy. Heart and lung tissues were harvested for molecular, biochemical, and histological analyses.

### ***Histological and immunofluorescence Studies***

Collected lungs were fixed with 4% paraformaldehyde for 24h, paraffin embedded, sectioned at 5  $\mu$ m and processed for Elastica van Gieson (EVG) or immunofluorescence (IF) stainings. For IF stainings, lung sections were deparaffinized and rehydrated in graded ethanol solutions. Once rehydrated, slides were subjected to antigen retrieval in either sodium citrate (pH 6.0) or Tris-EDTA (pH 9.0) buffers in a microwaveable pressure cooker for 20 minutes. Sections were blocked with 10% goat serum for 2 hours and then incubated with indicated primary antibodies (summarized in Table E3) in a humidified chamber overnight at 4°C. After washes, sections were further incubated for 1 hour at room temperature with appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies. Sections were mounted onto coverslips using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) Fluoromount G mounting medium. Sections were examined by

confocal microscopy using an Axio Observer microscope (Zeiss), and images were acquired using Zen system (Zeiss). The mean fluorescence intensity of NUDT1 within  $\alpha$ SMA-positive areas of distal PAs was quantified using Zeiss Zen software by dividing the intensity of NUDT1 fluorescence in the manually selected area per the surface of the selected area. The mean fluorescence intensity of NUDT1 was calculated in at least 15 distal PAs per specimen.

EVG stained lung sections were used to measure PA wall thickness, as previously done(2, 7). For each rat, at least 15 PAs (<75 $\mu$ m in diameter) were randomly outlined by an observer blinded to treatment. The degree of medial wall thickness was quantified and expressed as follows:  $([\text{medial thickness} \times 2] / \text{external diameter}) \times 100$ .

### Supplemental references

1. Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, Courboulain 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, Bonnet S. Role for Runx2-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2016; 194: 1273-1285.
2. Bourgeois A, Bonnet S, Breuils-Bonnet S, Habbout K, Paradis R, Tremblay E, Lampron MC, Orcholowski ME, Potus F, Bertero T, Peterlini T, Chan SY, Norris KA, Paulin R, Provencher S, Boucherat O. Inhibition of CHK 1 (Checkpoint Kinase 1) Elicits Therapeutic Effects in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2019; 39: 1667-1681.
3. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996; 68: 850-858.
4. Havlis J, Thomas H, Sebela M, Shevchenko A. Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins. *Anal Chem* 2003; 75: 1300-1306.
5. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; 26: 1367-1372.
6. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: e47.
7. Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, Nadeau V, Breuils-Bonnet S, Boilet-Molez S, Potus F, Meloche J, Chabot S, Lambert C, Tremblay E, Chae YC, Altieri DC, Sutendra G, Michelakis ED, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. Mitochondrial HSP90 Accumulation Promotes Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018; 198: 90-103.

8. 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, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014; 129: 786-797.
9. Collins AR. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications, and limitations. *Mol Biotechnol* 2004; 26: 249-261.
10. Lampron MC, Vitry G, Nadeau V, Grobs Y, Paradis R, Samson N, Tremblay E, Boucherat O, Meloche J, Bonnet S, Provencher S, Potus F, Paulin R. PIM1 (Moloney Murine Leukemia Provirus Integration Site) Inhibition Decreases the Nonhomologous End-Joining DNA Damage Repair Signaling Pathway in Pulmonary Hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2020; 40: 783-801.
11. Ohno M, Oka S, Nakabeppu Y. Quantitative analysis of oxidized guanine, 8-oxoguanine, in mitochondrial DNA by immunofluorescence method. *Methods Mol Biol* 2009; 554: 199-212.
12. 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: 4546.

### Supplemental Figure Legends

#### Supplemental Figure E1.

**A.** Western blot and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in PAECs isolated from control (n=3) and PAH (n=3) patients. **B.** Bar graphs showing the quantitative measurement of NUDT1 mean fluorescence intensity in distal pulmonary arteries of control (n=7) and PAH patients (n=7) as well as control and PAH rats (i.e. monocrotaline (MCT)- and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-challenged rats, as well as Fawn-Hooded rats (FHR); n=5-9 rats per group). **C.** Western blot and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in right ventricles obtained from control (n=6) and PAH patients (n=6). **D.** Western blot and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in quadriceps muscle biopsies obtained from control (n=5) and PAH patients (n=6). **E.** Western blot and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in liver biopsies obtained from control (n=5) and PAH patients (n=3). Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean±SEM; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

#### Supplemental Figure E2.

Western blots and corresponding densitometric analysis of NUDT1 expression in right ventricles of control rats (n = 3-5) as well as rats exhibiting PAH (i.e. monocrotaline (MCT)- and Sugen/hypoxia (Su/Hx)-challenged rats, as well as Fawn-Hooded rats (FHR); n=4-5 rats per group). Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean±SEM; \*\*P < 0.01.

#### Supplemental Figure E3.

**A.** Densitometric analysis of FOXM1 protein expression in PAH-PASMCs (n=3) exposed or not to escalating doses of FOXM1 inhibitors (Siomycin A and Thiostrepton) for 48 hours. **B.** Relative NUDT1 mRNA level in PAH-PASMCs (n=3) exposed or not to escalating concentrations of FOXM1 inhibitors (Siomycin A and Thiostrepton) for 48 hours. **C.** Western blot and corresponding densitometric analysis of

SKP2 protein expression in PASMCs isolated from control (n=3) and PAH (n=5) patients. **D.** Densitometric analysis of SKP2 protein expression in PAH-PASMCs (n=3) exposed or not to escalating doses of FOXM1 inhibitors (Siomycin A and Thiostrepton) for 48 hours. Protein and mRNA expression levels were normalized to Amido black (AB) and 18S rRNA, respectively. Data are presented as mean±SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

#### **Supplemental Figure E4.**

Extracellular acidification rate (ECAR) and oxygen consumption rate (OCR) were measured by the Seahorse XF96 analyzer in PAH-PASMCs (n=3) transfected with siNUDT1 or siSCRM for 48 hours. Effects of NUDT1 knockdown on basal ECAR, basal OCR, ATP production, maximal OCR and spare respiratory capacity are shown. Seahorse data were normalized using total protein amount. Data are presented as mean±SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

#### **Supplemental Figure E5.**

Proliferation (Ki67 labeling) and apoptosis (TUNEL labeling) were measured in serum-stimulated (10% FBS) control and PAH-PASMCs treated or not with (S)-Crizotinib, siNUDT1 (20nM) or their corresponding controls for 48 hours. Representative immunofluorescence images and corresponding quantifications are presented. Experiments were performed in three control and four PAH-PASMC cell lines. Data are expressed as fold change relative to untreated PAH-PASMCs; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01; \*\*\*P < 0.001.

#### **Supplemental Figure E6.**

**A.** Western blots and corresponding densitometric analysis of NUDT1, PCNA, Survivin and BAX in control PASMCs (n=4) infected or not with an adenovirus coding for human NUDT1 (AdNUDT1) or a control backbone adenovirus (AdNull) for 48h. **B.** Apoptosis (TUNEL labeling) was measured in control PASMCs infected or not with AdNUDT1 or its corresponding control (AdNull) for 48 hours.

Representative immunofluorescence images and corresponding quantification are presented. **B.** Apoptosis (TUNEL labeling) and proliferation (Ki67 labeling) were measured in control PASMCs infected or not with AdNUDT1 or AdNull and exposed to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24h. Representative immunofluorescence images and corresponding quantifications are presented. Experiments were performed in four control PASMC cell lines. Data are expressed as fold change relative to untreated PASMCs; \*P < 0.05.

**Supplemental Figure E7.**

**A.** Effects of (S)-Crizotinib on PASMC proliferation in the MCT rat model. Representative images of distal pulmonary arteries (PAs) labeled with PCNA in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ -smooth muscle actin (green). Graph on the right represents the percentage of PASMCs positive for PCNA in distal PAs. **B.** Representative western blot and corresponding densitometric analysis of PCNA in dissected PAs from Su/Hx rats treated with (S)-Crizotinib or its vehicle. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM; \*P < 0.05; \*\*P < 0.01.

**Supplemental Figure E8.**

Proposed model depicting the molecular mechanism by which overexpression of NUDT1 exerts cytoprotective effects in PAH-PASMCs, enhancing their survival and proliferation.

## Supplemental Tables

	CTRL (n=25)	PAH (n=23)
Age (years)	45.8±16.2	50.9±15.2
Gender (female (%))	10 (40%)	15 (65.2%)
PAH group		
- HPAH		4 (17.4%)
- IPAH		12 (52.2%)
-SSc-PAH		6 (26.1%)
-Other		1 (4.3%)
Autopsy (n (%))	-	11 (47.8%)
Transplantation (n (%))	-	12 (52.2%)
Pulmonary hemodynamics		
mPAP (mmHg)	-	52.5±12
CO (L.min <sup>-1</sup> )	-	4.9±1.2
PVR (dyne.sec <sup>-1</sup> .cm <sup>-5</sup> )	-	727±216
Medication		
Endothelin receptor antagonist	-	11 (47.8%)
PDE5 inhibitor	-	13 (56.5%)
Prostacyclin analog	-	6 (26.1%)
Unknown	-	4 (17.4%)

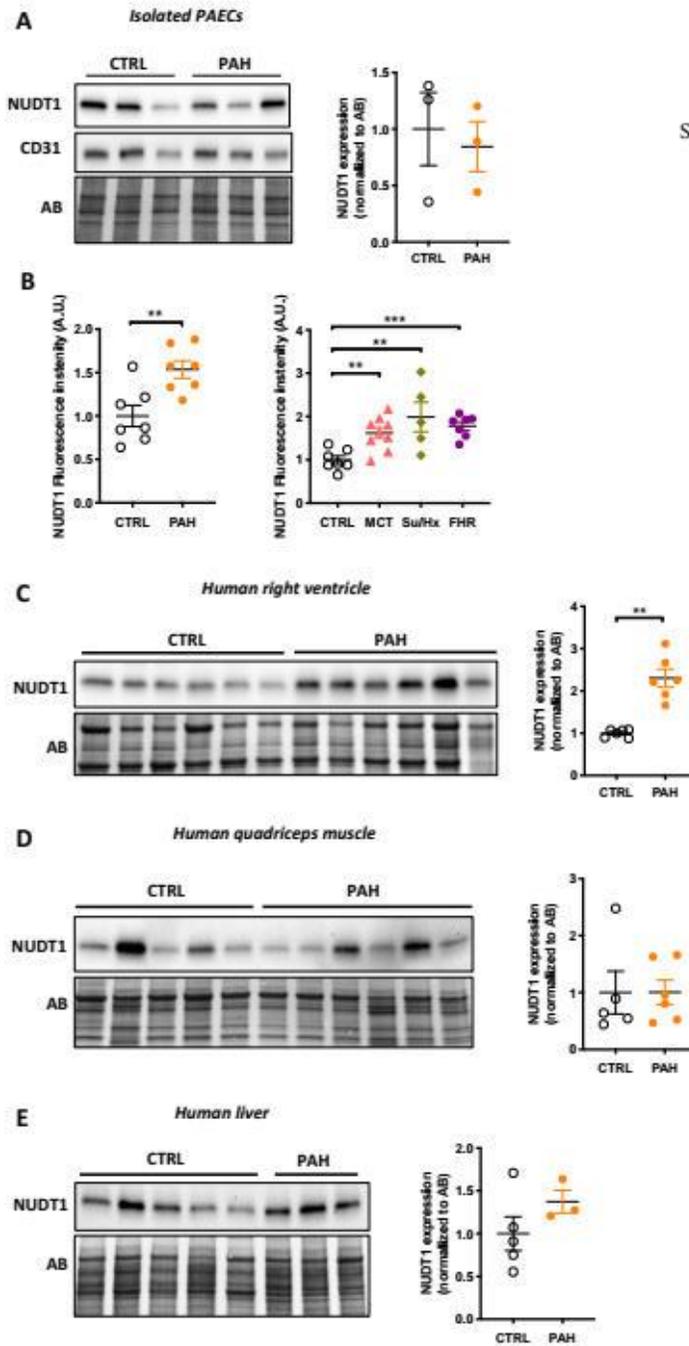
**Supplemental Table E1. Clinical characteristics of PAH patients and controls.** Values are means ± SD. HPAH: heritable PAH; IPAH: idiopathic PAH; SSc-PAH: Systemic sclerosis-associated PAH; mPAP: mean pulmonary arterial pressure; CO: cardiac output; PVR: pulmonary vascular resistance; PDE5: phosphodiesterase-5. Note that some patients take more than one type of medication.

	Sex	Age	PAH subtype	Tissues / cells used	
Target Antigen	Vendor	Catalog #	Concentration	Dilution	
#1	F	43	-		PA/Lung
#2	M	52	-		PA/Lung
#3	M	29	-		Lung
#4	M	65	-		PA/Lung
#5	M	31	-		Lung
#6	F	74	-		Lung
#7	M	78	-		PA/Lung
#8	F	48	-		PA/Lung
#9	F	49	-		PA/Lung
#10	M	28	-		PA/Lung
#11	M	56	-		PA/Lung
#12	M	68	-		PA/Lung
#13	M	43	-		PASMC
#14	F	17	-		PASMC
#15	F	54	-		PASMC
#16	F	35	-		PASMC
#17	F	56	-		PASMC/PAEC
#18	M	21	-		PASMC/PAEC
#19	M	22	-		PAEC
#20	M	45	-		PASMC
#21	M	53	-		PASMC
#22	M	53	-		PASMC
#23	F	32	-		PASMC
#24	M	43	-		PASMC
#25	F	50	-		PASMC
#1	F	36	IPAH		Lung
#2	F	54	SSc-PAH		PA/Lung
#3	M	52	IPAH		PA/Lung/PASMC
#4	M	77	SSc-PAH		PA/Lung
#5	F	47	SSc-PAH		PA/Lung
#6	F	74	IPAH		PA
#7	F	72	SSc-PAH		PA /Lung
#8	F	57	IPAH		PA/Lung
#9	F	46	PPHTN		PA/Lung
#10	F	53	SSc-PAH		PA/Lung
#11	F	23	IPAH		PA/Lung/PASMC
#12	F	76	IPAH		PA/Lung
#13	F	61	HPAH		PA/Lung/PASMC/PAEC
#14	M	59	IPAH		PASMC
#15	M	65	IPAH		PASMC
#16	F	45	SSc-PAH		PASMC
#17	M	52	IPAH		PASMC
#18	F	35	HPAH		PASMC/PAEC
#19	M	39	IPAH		PASMC
#20	F	32	HPAH		PASMC/PAEC
#21	M	45	IPAH		PASMC
#22	F	40	IPAH		PASMC
#23	M	31	HPAH		PASMC

**Supplemental Table E2.** Detailed tissue characteristics used in this study. PA: Pulmonary artery; HPAH: heritable PAH; IPAH: idiopathic PAH; SSc-PAH: Systemic sclerosis-associated PAH; PPHTN: Portopulmonary hypertension; PAEC: Pulmonary artery endothelial cell; PASMC: Pulmonary artery smooth muscle cell.

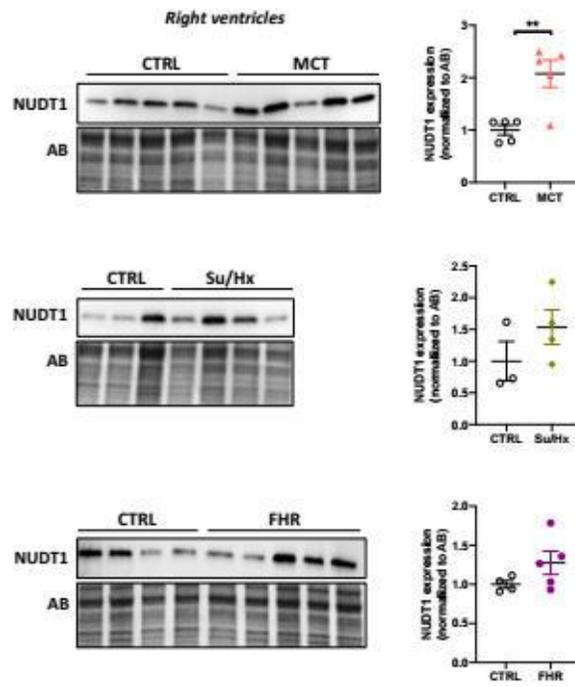
<b>Immunofluorescence</b>				
NUDT1 (IHC)	Cell Signaling	43918	Not specified	1:100
8-oxo-dG (ICC)	Abcam	AB48508	Not specified	1:50
8-oxo-dG (IHC)	Trevigen	4354-MC-050	Not specified	1:200
LC3B (ICC)	Cell Signaling	3868	Not specified	1:800
Ki67 (ICC)	Millipore	AB9260	Not specified	1:300
$\alpha$ SMA (IHC)	Sigma	A2547	Not specified	1:300
PCNA (IHC)	Santa Cruz Biotechnology	sc25280	200 $\mu$ g/ml	1:100
<b>Western blotting</b>				
NUDT1	Cell Signaling	43918	Not specified	1:1000
PBK	Cell Signaling	4942	Not specified	1:1000
MCM2	Bethyl Laboratories	A300-191A	1000 $\mu$ g/ml	1:1000
UBE2C	Cell Signaling	14234	Not specified	1:1000
FOXMI	Santa Cruz Biotechnology	sc376471	200 $\mu$ g/ml	
CD31	Abcam	AB28364	Not specified	1:1000
GRP78	Santa Cruz Biotechnology	Sc13968	200 $\mu$ g/ml	1:100
CALNEXIN	Abcam	AB75801	Not specified	1:1000
OGG1	Novus Biologicals	NB100-106	1000 $\mu$ g/ml	1:1000
PCNA	Santa Cruz Biotechnology	sc25280	200 $\mu$ g/ml	1:500
BAX	Abcam	AB32503	Not specified	1:1000
PINK1	Abcam	AB23707	Not specified	1:1000
PLK1	Abcam	AB17056	Not specified	1:1000
SURVIVIN	Cell Signaling	2808	Not specified	1:1000
LC3B	Cell Signaling	3868	Not specified	1:1000
P62	Cell Signaling	5114	Not specified	1:1000

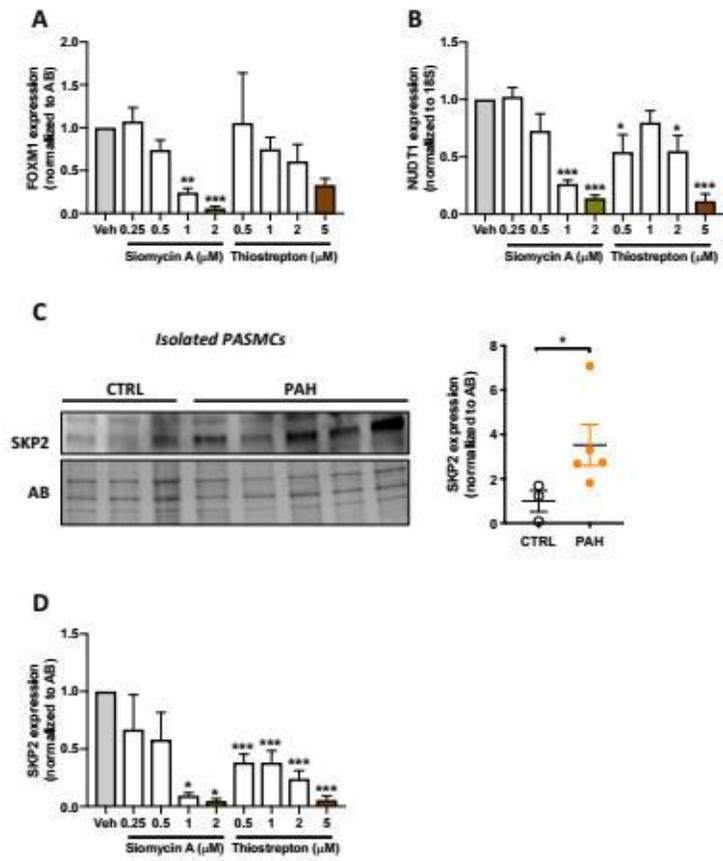
**Supplemental Table E3. Primary antibodies used for immunofluorescence and Western blotting analysis.** ICC: immunocytochemistry; IHC: immunohistochemistry



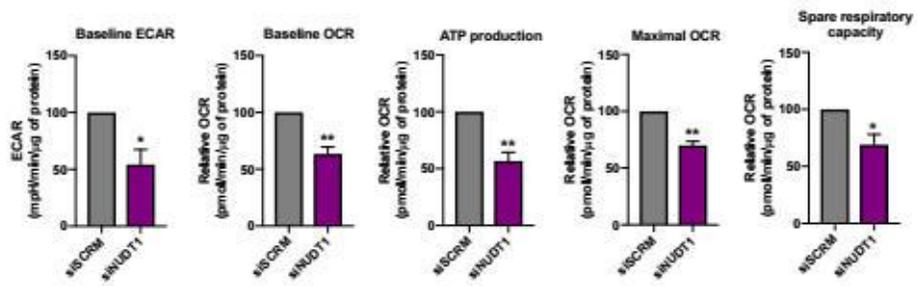
Supplementary Figure 1

Supplementary Figure 2



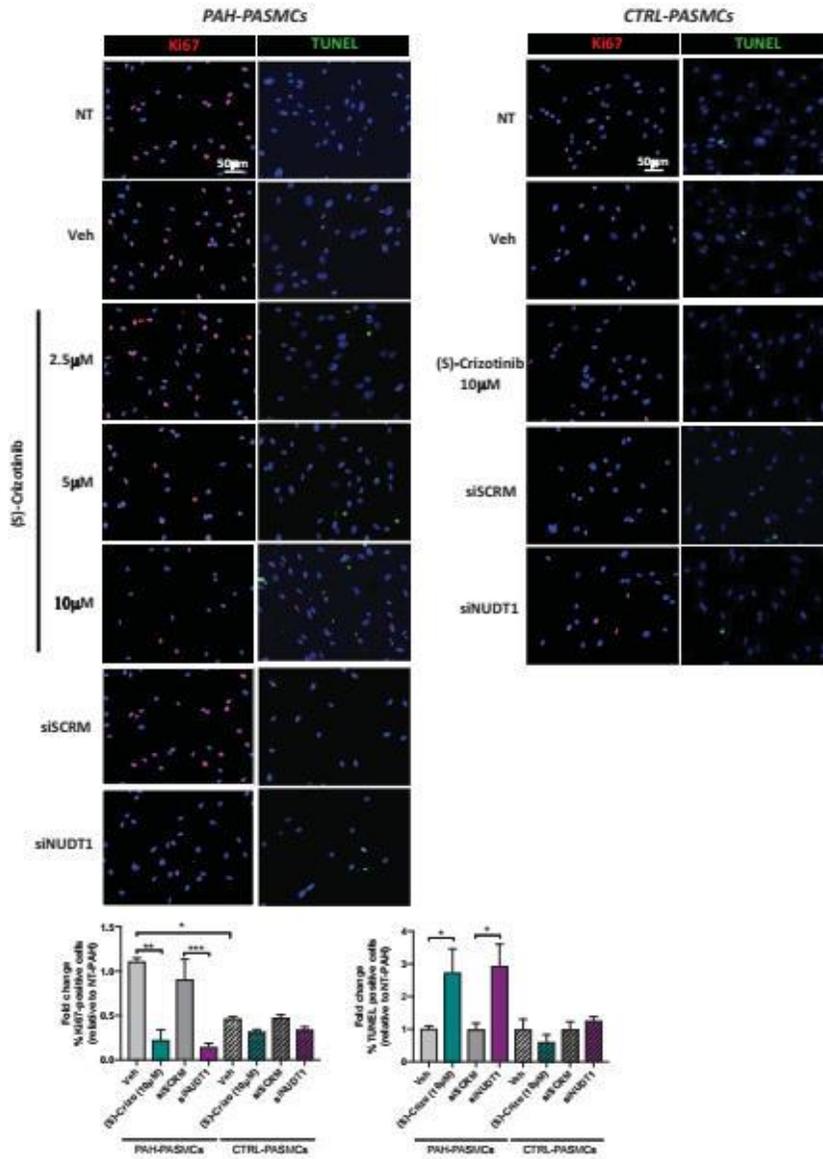


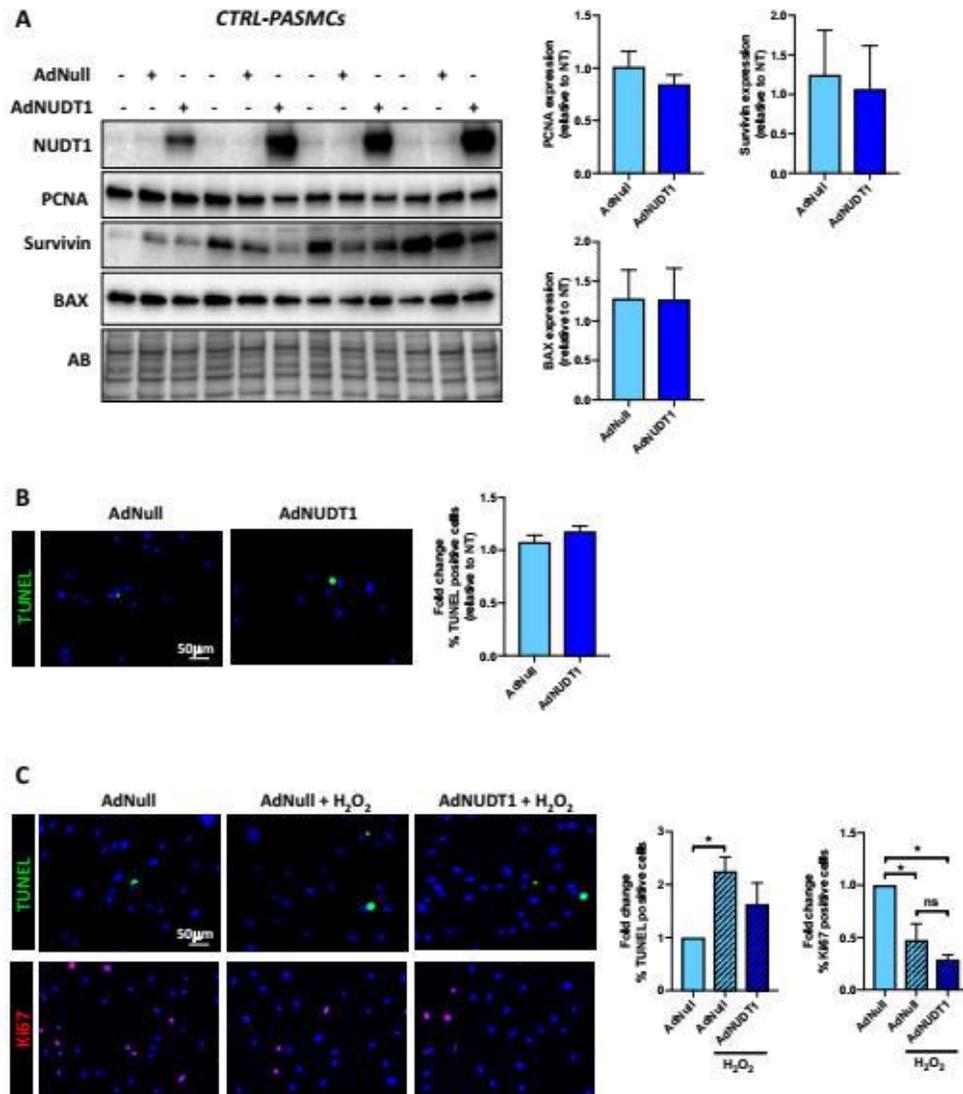
Supplementary Figure 3



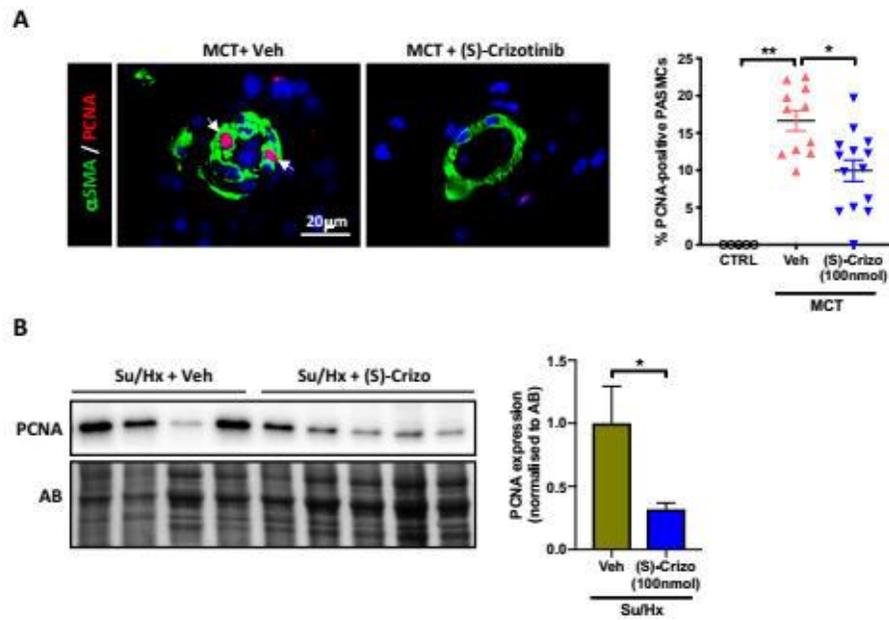
Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 5



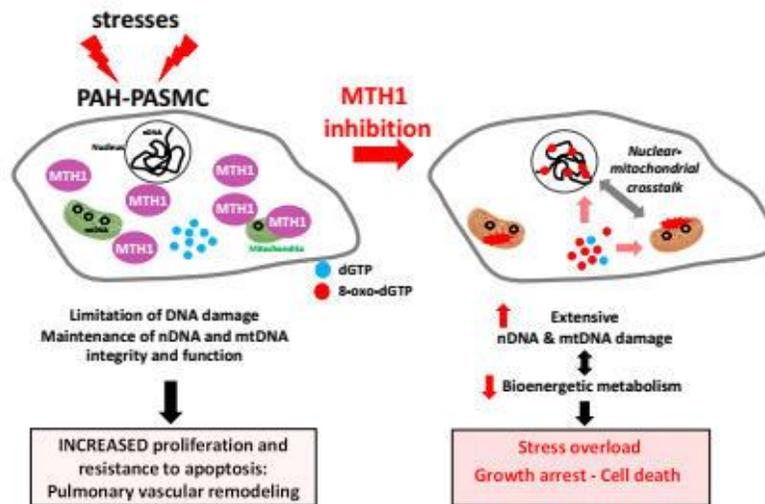


Supplementary Figure 6



Supplementary Figure 7

Supplementary Figure 8



## **Annexe IV.**

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

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

Alice Bourgeois, Sébastien Bonnet, Sandra Breuils-Bonnet, **Karima Habbout**, Renée Paradis, Eve Tremblay, Marie-Claude Lampron, Mark E Orcholski, Francois Potus, Thomas Bertero, Thibaut Peterlini, Stephen Y Chan, Karen A Norris, Roxane Paulin, Steeve Provencher, Olivier Boucherat.



## HHS Public Access

Author manuscript

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* Author manuscript; available in PMC 2019 September 05.

Published in final edited form as:

*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2019 August ; 39(8): 1667–1681. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312537.

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

Alice Bourgeois<sup>1</sup>,

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

Sébastien Bonnet<sup>1</sup>,

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

Sandra Breuils-Bonnet,

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

Karima Habbout,

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

Renée Paradis,

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

Eve Tremblay,

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

Marie-Claude Lampron,

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

Mark E. Orcholski,

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

Francois Potus,

Correspondence to: Olivier Boucherat, PhD, Pulmonary Hypertension research Group, IUCPQ Research Centre, 2725, Chemin Sainte-Foy, QC, Canada G1V 4G5. [olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca).

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this article.

**VISUAL OVERVIEW:** An online visual overview is available for this article.

The online-only Data Supplement is available with this article at <https://www.ahajournals.org/doi/suppl/10.1161/ATVBAHA.119.312537>

#### Disclosures

S.Y. Chan has served as a consultant for Zogenix (Significant) and Virus (Modest) and holds research grants for Pfizer and Actelion. The other authors report no conflicts.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

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

**Thomas Bertero,**

University Côte d'Azur, CNRS UMR7284, INSERM U1081, Institute for Research on Cancer and Aging Nice (IRCAN), University Côte d'Azur, France

**Thibaut Peterlini,**

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

**Stephen Y. Chan,**

Center for Pulmonary Vascular Biology and Medicine, Pittsburgh Heart, Lung, Blood, and Vascular Medicine Institute, Division of Cardiology, Department of Medicine, University of Pittsburgh School of Medicine and University of Pittsburgh Medical Center, PA

**Karen A Norris.,**

Center for Vaccines and Immunology, University of Georgia, Athens

**Roxane Paulin,**

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

**Steeve Provencher,**

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

**Olivier Boucherat**

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

## Abstract

**OBJECTIVE:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a debilitating disease associated with progressive vascular remodeling of distal pulmonary arteries leading to elevation of pulmonary artery pressure, right ventricular hypertrophy, and death. Although presenting high levels of DNA damage that normally jeopardize their viability, pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from patients with PAH exhibit a cancer-like proliferative and apoptosis-resistant phenotype accounting for vascular lumen obliteration. In cancer cells, overexpression of the serine/threonine-protein kinase CHK1 (checkpoint kinase 1) is exploited to counteract the excess of DNA damage insults they are exposed to. This study aimed to determine whether PAH-PASMCs have developed an orchestrated response mediated by CHK1 to overcome DNA damage, allowing cell survival and proliferation.

**APPROACH AND RESULTS:** We demonstrated that CHK1 expression is markedly increased in isolated PASMCs and distal PAs from patients with PAH compared with controls, as well as in multiple complementary animal models recapitulating the disease, including monocrotaline rats and the simian immunodeficiency virus-infected macaques. Using a pharmacological and

molecular loss of function approach, we showed that CHK1 promotes PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis. In addition, we found that inhibition of CHK1 induces downregulation of the DNA repair protein RAD 51 and severe DNA damage. In vivo, we provided evidence that pharmacological inhibition of CHK1 significantly reduces vascular remodeling and improves hemodynamic parameters in 2 experimental rat models of PAH.

**CONCLUSIONS:** Our results show that CHK1 exerts a proproliferative function in PAH-PASMCs by mitigating DNA damage and suggest that CHK1 inhibition may, therefore, represent an attractive therapeutic option for patients with PAH.

#### Keywords

apoptosis; DNA damage; DNA repair; Hypertension; vascular remodeling

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a vascular remodeling disease characterized by vasoconstriction and progressive obliteration of distal pulmonary arteries (PA) leading to elevation of PA pressure, right ventricular (RV) failure, and death.<sup>1</sup> Although extensive proliferation and resistance to apoptosis of PA smooth muscle cells (PASMCs) has become increasingly acknowledged to play an important role in PAH, current therapies are mainly dedicated to counteract vasoconstriction and do not reverse disease progression.<sup>2</sup> This underlines a pressing need to improve our understanding of the disease and identify new therapeutic targets that directly contribute to vascular remodeling.<sup>3</sup>

The accumulating evidence that PAH and cancer cells share a certain degree of similarity in terms of cellular and molecular mechanisms driving their survival and excessive proliferation may provide clues to treat the disease.<sup>4,5</sup> We previously demonstrated that to combat threats posed by DNA damage, sustained activation of DNA damage response associated with overexpression of the Mre11-Rad50-Nbs1 DNA damage sensor complex and members of the DNA repair machinery, such as PARP-1 (poly[ADP-ribose] polymerase 1) and OGG1 (8-oxoguanine DNA glycosylase), occurs in PAH-PASMCs allowing efficient DNA repair and thus cell survival and proliferation.<sup>6-8</sup> Although prevention of DNA damage-induced cell death seems to be an adaptive mechanism used by PAH-PASMCs to expand, the source of DNA damage, as well as the molecular players engaged to orchestrate the repair of DNA lesion remain largely unknown. As observed in cancer cells, PAH-PASMCs experience numerous stresses, such as oxidative and shear stress, inflammation, and pseudo-hypoxia, which are major sources of DNA damage.<sup>4</sup> In addition, active proliferation of PAH-PASMCs is expected to generate significant levels of replication stress (RS)-associated DNA damage, commonly defined as slowing or stalling in replication fork progression and characterized by the generation of single-strand DNA coated by RPA (replication protein A) proteins.<sup>9,10</sup> In the face of persistent DNA damage or RS, activation of the DNA damage checkpoints is necessary to ensure cell survival.<sup>11</sup>

Although structurally unrelated, CHK1 (checkpoint kinase 1) and CHK2 are serine/threonine kinases that serve as nexus between DNA damage sensors and components of the cell cycle machinery.<sup>12</sup> Despite their quite overlapping functions, CHK1 plays a predominant role compared with CHK2 in cell survival and cell response to DNA damaging agents.<sup>13,14</sup> In response to DNA damage and DNA RS, CHK1 is phosphorylated on serines

317 and 345 by the ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) kinase, an activation process facilitated by adaptor proteins DNA TopBP1 (topoisomerase 2-binding protein 1) and CLSPN (Claspin).<sup>13,15</sup> Once activated, CHK1, in turn, phosphorylates multiple proteins to temporarily halting the progression of cell replication and division, initiating DNA repair and triggering apoptosis in response to irreversible DNA damage.<sup>13</sup> In this regard, overexpression/hyperactivation of CHK1 is a hallmark of many cancer types,<sup>16,17</sup> enhancing cancer cell survival by preventing the accumulation of DNA damage.<sup>18</sup> In keeping with this, targeted CHK1 inhibition alone or combined with DNA damaging agents have been shown to exert antitumor activity in preclinical studies by exacerbating DNA breaks and inducing apoptosis.<sup>16,17</sup> Various CHK1 inhibitors have also been developed and tested in clinical trials<sup>19</sup> as anticancer drugs either alone or in combination with chemotherapy.

In the present study, we documented that DNA damage checkpoint signaling is aberrantly and constitutively activated in PASMCs from patients with PAH. We demonstrated that PAH-PASMCs rely on efficient-CHK1 DNA damage stress response for survival and proliferation. Moreover, pharmacological inhibition of CHK1 provides therapeutic benefit in 2 experimental rat models of PAH.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Tissue Samples and Pulmonary Vascular Smooth Muscle Cell Isolation

Experimental procedures using human cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki and were performed with the approval of Laval University and the IUCPQ (Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec) Biosafety and Ethics Committees. Tissues were obtained from patients who had previously given written informed consent. Healthy lung tissues (controls) were obtained during lung resection for tumors. Lung samples were taken at distance from the tumor and demonstrated normal lung parenchyma. PAH diagnosis was previously confirmed by right heart catheterization. PAH and control tissues were obtained from Respiratory Health Network tissue bank (Major Resources Table in the online-only Data Supplement). PAH-PASMCs (n=10 cell lines) were isolated from small PAs (<1000 µm diameter) from patients with PAH. αSMA (α smooth muscle actin) staining was used to confirm the smooth muscle phenotype of the cells in culture. Controls PASMCs (n=10 cell lines) were either purchased from Cell Application or isolated from non-PAH patients as previously described.<sup>6,8</sup> Cells were used at passages 4 to 8 for experiments.

### Animal Models

Experiments were performed according to the guidelines of the Canadian Council on Animal Care and approved by the institutional animal care and use committees of University Laval and University of Pittsburgh. Tissue samples from simian immunodeficiency virus-infected rhesus macaques (12 months postinfection) were collected from the same animals as in the previous report.<sup>20</sup> Because male rats develop more severe monocrotaline-induced PAH than females,<sup>21,22</sup> the therapeutic potential of MK-8776 in the monocrotaline model was only investigated in males. Male Sprague-Dawley rats (250–300 g body weight) were purchased from Charles River. Monocrotaline-induced PAH was developed by a single

subcutaneous injection of monocrotaline (60 mg/kg; Sigma, St Louis, MO), as previously described.<sup>8</sup> Control rats received saline. Two weeks post monocrotaline injection or in 1-year-old male and female Fawn-Hooded Rats (FHR), rats were randomly divided into 2 groups to receive MK-8776 (1 mmol/L thrice a week) or its vehicle (4% DMSO in PBS) by intratracheal nebulization for 2 additional weeks. Briefly, rats were anesthetized with 3% isoflurane for 15 minutes and placed on an angled platform. The tongue was gently pulled out with forceps to visualize the oropharynx and vocal cords through transillumination. A 16-gauge intravenous catheter was inserted in the lumen of the trachea, and the position was confirmed by visualization of breath on a dental mirror placed at the end of the catheter. A nebulizer (Aeroneb, Aerogen) was plugged into the catheter, and a volume of 50  $\mu$ L of vehicle or MK-8776 was delivered as a mist into trachea with O<sub>2</sub> 0.1 L/min for 7 to 10 seconds. At the end of protocol, all rats were anesthetized with 2% to 3% isoflurane and underwent closed-chest right heart catheterization. A polyethylene catheter connected to a pressure transducer (SciSense catheters) was inserted into the right external jugular vein and threaded into the RV and the PA to obtain RV systolic pressure, mean PA pressure (mPAP), and RV cardiac output, as previously described.<sup>7,8</sup> Total pulmonary resistance was calculated by dividing mPAP by cardiac output. All hemodynamic measurements and analyses were performed blinded to the condition.<sup>23</sup> Following the measurements, heart, lungs, and other major organs were harvested. The RV was dissected from the left ventricle and the septum and weighted to quantify the extent of hypertrophy by the Fulton index as follow:  $RV/(left\ ventricle+septum)$ .

#### Morphometric Analysis of PA and In Situ Immunofluorescence

Lungs were collected, fixed with 4% paraformaldehyde for 24 hours, paraffin embedded, sectioned at 5  $\mu$ m and processed for Elastica van Gieson or immunohistochemical stainings. The medial wall thickness of distal PA (<75  $\mu$ m) was quantified and expressed as follows:  $(\text{medial thickness} \times 2) / \text{external diameter} \times 100$ . For immunofluorescence staining, tissue sections were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded ethanol-water series. Sections were subjected to antigen retrieval in citrate buffer (0.01 M, pH 6.0) in a microwaveable pressure cooker for 20 minutes. Sections were blocked with 5% goat serum for 2 hours and then incubated with indicated primary antibodies in a humidified chamber overnight at 4°C (Major Resources Table in the online-only Data Supplement). After washes, sections were further incubated for 1 hour at room temperature with appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies. Sections were mounted onto coverslips using DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindol) Fluoromount G mounting medium. Sections were examined by confocal microscopy using an Axio Observer microscope (Zeiss), and images were acquired using Zen system (Zeiss). At least 15 randomly selected arteries per animal were measured in a blinded fashion to assess vascular remodeling, proliferation, and apoptosis. Intensity of CHK1 staining was quantified via the integrated density function found in Image J software (National Institutes of Health).

#### Cell Culture and Treatments

PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% FBS (Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic/antimycotic (Thermo Fisher Scientific). MK-8776 was purchased from ApexBio and dissolved in DMSO. Small interfering RNA targeting CHK1,

and its scrambled control small interfering RNA were synthesized by Life Technologies. PAH-PASMCs were transfected with either siCHK1 (small interfering RNA for CHK1) or control small interfering RNA using Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA) at a final concentration of 20 nM according to the manufacturer's instructions. To assess the effects of CHK1 overexpression in control PASMCs, cells were infected with adenoviruses expressing human *CHK1* gene (Vector Biolabs) at the multiplicity of infection of 50 and used for experiments 16 hours postinfection. Cells receiving empty vector adenovirus and untreated cells were used as control groups. To supplement miR (microRNA)-424 activity in PAH-PASMCs, cells were transfected with hsa-miR-424-5p mimics or scramble mimics (Life Technologies) at a final concentration of 50 nM. Upregulation of miR-424 after transfection was validated by real-time polymerase chain reaction (PCR). To induce DNA damage, cells were treated with hydroxyurea (1 and 2 mmol/L) for 24 hours or Etoposide (10 and 100  $\mu$ M) for 6 hours.

#### In Vitro Analysis of Cell Proliferation, Resistance to Apoptosis and DNA Damage

Cells were used at passages 4 to 9 for experiments. PASMCs were cultured for 48 hours in 10% FBS (a condition that is known to promote proliferation) or 0.1% FBS (a starvation condition that promotes apoptosis) in presence or absence of MK-8776, siCHK1 or their respective controls. Cell proliferation and resistance to apoptosis were quantified by Ki67 and transferase-mediated dUTP nick-end labeling (DeadEnd Fluorometric TUNEL system, Promega), respectively. To assess DNA damage, cells, treated as indicated, were stained with  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX) and p(S4/SS)-RPA32. Nuclei were stained with DAPI. The percentages of Ki67, TUNEL,  $\gamma$ H2AX, and pRPA 32 (phosphorylated replication protein A2)-positive cells were calculated. At least 300 cells were counted for each cell line. The sources and working dilutions of primary antibodies are listed in the Major Resources Table in the online-only Data Supplement.

#### Western Blotting Analyses

Total proteins were extracted from either PASMC or distal PAs using a 2% Chaps protein extraction buffer supplemented with a protease-inhibitor cocktail (Roche). Protein concentration was determined using the Bradford method. Equal amounts of protein were loaded on SDS PAGE, electrophoresed, and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes using a liquid blotting system (Bio-Rad). After blocking with either 5% nonfat dry milk or 5% goat serum in TBS-T buffer for 1 hour, membranes were incubated overnight at 4°C with indicated primary antibodies. The sources and working dilutions of primary antibodies are listed in the Major Resources Table in the online-only Data Supplement. Membranes were then incubated with appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies for 2 hours. 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 Amido black, as previously reported.<sup>8</sup>

#### Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from cells or lungs using TRIzol Reagent following the manufacturer's instructions. RNA quality was checked, and RNA was quantified using a

NanoDrop spectrophotometer. Reverse transcription and amplification of miR-424 was performed using the TaqMan MicroRNA Assay miR-424 (ThermoFisher Scientific). Real-time PCR was performed using the QuantStudio 7 Flex real-time PCR system (Applied Biosystems). The expression levels of miR-424 were normalized against U6 small nuclear RNA using the 2- $\Delta$ CT method. Each sample was analyzed in triplicate.

#### Statistical Analysis

One-way ANOVA was performed for data with comparisons among groups. Linear mixed model was performed for repeated measures from the same subjects. For 1-way ANOVA, statistical models were investigated for heterogeneous variances and tested whether models could be reduced to the same variance among groups. When effect that specifies heterogeneity in the covariance structure was significant (heteroscedasticity) compared with the same variance, the statistical analysis was performed using separate residual variance per group. The Satterthwaite degree of freedom statement was added for unequal variance structures. For linear mixed models, a heterogeneous covariance structure with the same correlation among conditions was used. The normality assumption was verified with the Shapiro-Wilk tests, after a Cholesky factorization on residuals from the statistical model. The Brown and Forsythe variation of Levene test statistic was used to verify the homogeneity of variances. Posteriori comparisons were performed using the Tukey comparison. The Nelson-Aalen estimate was used for the overall survival at follow-up, and the log-rank tests were performed to compare groups. The results were considered significant with  $P \leq 0.05$ . All analyses were conducted using the statistical package SAS, version 9.4 (SAS Institute Inc, Cary, NC) and R (R Core Team [2018], Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

## RESULTS

### PAH-PASMCs Display Elevated Levels of DNA Damage/RS and Exhibit Constitutive Activation of the ATR/CHK1 Pathway

Given that PAH and cancer cells display similarities<sup>4,5</sup> and CHK1 overexpression confers survival advantage in cancer cells experiencing DNA damage/RS,<sup>13,14,16</sup> we hypothesized that increased levels of CHK1 and markers of DNA damage/RS are also features of hyperproliferating PAH-PASMCs. We first compared levels of CHK1 expression and activity in isolated PASMCs from control and patients with PAH. We found that hyperproliferating PAH-PASMCs, but not PAH-PAECs, exhibit significantly increased CHK1 protein expression compared with their normal counterparts (Figure 1A and Figure I in the online-only Data Supplement). In addition, CHK1 auto-phosphorylation (S296), a marker of CHK1 kinase activity, was increased in isolated PAH-PASMCs (Figure 1A). To further demonstrate that PAH-PASMCs experience endogenous DNA damage/RS, phosphorylation levels of H2AX and RPA32, 2 markers of DNA damage and RS,<sup>24</sup> were measured. Consistent with above findings showing elevated CHK1 expression and activity in PAH-PASMCs compared with control cells, phospho-RPA32 (S4/S8) and H2AX (S139) were increased in PAH-PASMCs (Figure 1A). Since numerous studies implicate ATR as a major kinase mediating DNA damage/RS and a direct upstream activator of CHK1,<sup>13,25</sup> we next measured expression of total ATR, ATR autophosphorylation at Thr 1989 (a marker for

ATR activation<sup>26</sup>), CHK1 phosphorylation at S345 (an ATR phosphorylation site<sup>25</sup>), as well as CLSPN (known to mediate ATR-CHK1 physical interaction<sup>27</sup>) and BLM (Bloom's syndrome protein helicase; a responder to RS regulated by CHK1<sup>28</sup>). Whereas no significant difference was observed for ATR, PAH-PASMCs exhibited increased expression of phospho-ATR, phospho-CHK1, CLSPN, and BLM compared with control cells (Figure 1B and Figure IIA in the online-only Data Supplement). Additionally, along with CHK2, activity of DNA-PK (DNA-dependent protein kinase), required to maintain CHK1-CLSPN complex stability for optimal RS response,<sup>29</sup> was increased (Figure IIB in the online-only Data Supplement). Collectively, our results demonstrate that constitutive ATR-CHK1 signaling is a hallmark of PAH-PASMCs. To complement our analysis and confirm that overexpression of CHK1 is not simply an artifact of in vitro cell culture, CHK1 expression level was assessed by immunofluorescence in distal PAs from control and patients with PAH, as well as in 3 complementary animal models of PAH, namely the monocrotaline rat, the FHR, and the simian simian immunodeficiency virus-infected macaque models. In keeping with in vitro findings, fluorescence intensity of CHK1 was increased in distal PAs from patients with PAH and mainly detected in  $\alpha$ SMA-positive cells (Figure 2A and Figure III in the online-only Data Supplement); a feature recapitulated in rats (monocrotaline and FHR), as well as simian immunodeficiency virus-infected macaques exhibiting hemodynamic and structural manifestations of PAH (Figure 2B and 2C and Figure III in the online-only Data Supplement).

#### Decreased miR-424 Expression Accounts for Increased CHK1 Upregulation in PAH-PASMCs

Although numerous studies have located ATR as the main activator of CHK1,<sup>13</sup> little is known about the mechanisms responsible for increased CHK1 abundance in diseased cells. Interestingly, CHK1 was identified as a direct target of miR-424,<sup>30</sup> which acts as a sensitizer of DNA damage inducers in cancer cells.<sup>31</sup> In addition, miR-424 was identified as a master regulator of PAH progression, diminished in PAECs isolated from patients with PAH, and exerting antiproliferative effects.<sup>32</sup> Based on these published results, we reasoned that diminished miR-424 expression might occur in PAH-PASMCs favoring CHK1 upregulation. As assessed by real-time quantitative PCR, we demonstrated that, as previously observed for PAH-PAECs,<sup>32</sup> miR-424 was significantly decreased in PAH-PASMCs compared with control cells (Figure 3A). Decreased miR-424 expression was also detected in lungs from PAH rat models (Figure IV in the online-only Data Supplement). To determine whether miR-424 contributes to the regulation of CHK1, we transfected PAH-PASMCs with scrambled control oligo or miR-424 mimics. We found that miR-424 supplementation in PAH-PASMCs substantially reduces CHK1 expression (Figure 3B) indicating that downregulation of miR-424 accounts at least in part for the upregulation of CHK1 in PAH-PASMCs. Next, to demonstrate that CHK1 is activated in response to DNA damage, we tested the effects of well-known inducers of DNA damage, namely hydroxyurea (an antimetabolite that depletes nucleotide pools) and etoposide (an inhibitor of DNA topoisomerases required for releasing torsional stress accumulating during replication). Both treatments resulted in increased levels of markers for DNA damage, that is, pRPA32 and  $\gamma$ H2AX, as well as increased activity of CHK1 (phospho S296; Figure 3 and Figure V in the online-only Data Supplement).

### Inhibition of CHK1 Exacerbates DNA Damage and Reduces PAH-PASMC Proliferation and Resistance to Apoptosis

Because CHK1 activation is known to mitigate DNA damage and RS, we tested whether inhibition of CHK1 diminishes sustained PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis. To this end, the selective CHK1 kinase inhibitor MK-8776 (also called SCH 900776) tested in clinical trials in patients with cancer<sup>33,34</sup> was used to treat PAH-PASMCs. As previously reported,<sup>16,35</sup> pharmacological inhibition of CHK1 resulted in diminished CHK1 protein levels and hyperphosphorylation of CHK1 on S317 and S345 (because of the loss of CHK1-mediated feedback inhibition of ATR), validating the inhibitory effects of MK-8776 on CHK1 (Figure VI in the online-only Data Supplement). Because MK-8776 produced a more robust response at the dose of 1  $\mu$ M, subsequent experiments were performed at this dose. As assessed by Ki67 and TUNEL labeling, we found that MK-8776 significantly reduced PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis (Figure 4A and 4B). To strengthen our results, we checked the expression levels of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(Cip1/Waf1) known to respond to CHK1 inhibition.<sup>36</sup> As expected, pharmacological inhibition of CHK1 resulted in increased expression of p21 (Figure VI in the online-only Data Supplement). To validate our findings and safeguard against potential MK-8776 off target effects, small interfering RNA-mediated CHK1 silencing was performed in PAH-PASMCs. Western blot analysis revealed that efficient knockdown of CHK1 in PAH-PASMCs (Figure VI in the online-only Data Supplement). Consistent with the effects seen with MK-8776, PAH-PASMC proliferation and survival were impeded after molecular CHK1 inhibition (Figure 4A and 4B and Figure VI in the online-only Data Supplement). As a corollary experiment, we wondered whether CHK1 overexpression using adenoviral infection was sufficient to establish a proproliferative and apoptosis-resistant phenotype in control PASMCs. We found that increased expression of CHK1 did not increase the proliferative ability of control PASMCs challenged or not with hydroxyurea. In contrast, overexpression of CHK1 led to a decrease in apoptosis in control cells exposed to hydroxyurea, thus reinforcing the notion that CHK1 is protective under stress conditions.

We next examined whether accumulation of DNA lesions occurs in PAH-PASMCs treated with CHK1 inhibitors. To this end, expression levels of 2 different markers for DNA damage, that is, phospho-RPA32 (S4/ S8) and  $\gamma$ H2AX, were assessed by immunofluorescence (Figure 4C) in PAH-PASMCs exposed or not to MK-8776 or siCHK1. As expected, CHK1 inhibition resulted in an increased proportion of PAH-PASMCs positive for pRPA32 or with >10  $\gamma$ H2AX foci, a feature of RS,<sup>18</sup> indicative of increased amounts of DNA damage.

These results prompted us to investigate the effects of CHK1 inhibition on DNA repair factors. Previous studies have demonstrated that CHK1 phosphorylates and inhibits E2F,<sup>37</sup> a repressor of E2F-dependent transcription known to cope with high levels of DNA damage by activating genes involved in DNA damage repair and cell cycle progression.<sup>38</sup> Thus, we assessed the protein level of the E2F target gene RAD51 in PAH-PASMCs challenged or not with MK-8776 for 48 hours. We observed that RAD51 is upregulated in PAH-PASMCs compared with control cells (Figure VIII in the online-only Data Supplement) and that treatment with MK-8776 diminished its expression level (Figure 4D). Taken together, these

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

findings indicate that CHK1 overexpression in PAH-PASMCs represents a mechanism in place to cope with RS/DNA damage and thus providing a proliferative advantage.

#### Pharmacological Inhibition of CHK1 Improves PAH in Rodent Models

As most patients with PAH are diagnosed at an advanced stage of the disease, we next investigated whether pharmacological inhibition of CHK1 improved established PAH in the FHR model that spontaneously develops PH.<sup>39</sup> We initially performed a pilot dose-response study of MK-8776 as a nebulized solution in FHR rats. Three doses of MK-8776 from 0.5 to 1 mmol/L and vehicle were given 2× a week (Figure 5A). In this dose-response study, hemodynamic improvement was greatest in the group receiving 1 mmol/L (data not shown). This correlates with increased pRPA32 and  $\gamma$ H2AX expression, as well as enhanced phosphorylation of CHK1 on S345, as assessed by WB on dissected PAs (Figure 5B) indicative of accumulation of DNA damage. In view of these data, a new experiment on a larger sample size was conducted at a dose of 1 mmol/L. As measured by right heart catheterization, pharmacological inhibition of CHK1 in FHR significantly reduced RV systolic pressure (56±9 versus 40±4 mm Hg) and mPAP (41±7 versus 23±9 mm Hg) as compared to vehicle-treated FHR (Figure 5C and 5D). There were no differences in hemodynamic improvement according to sex. RV hypertrophy, assessed by the Fulton index, remained unchanged in MK-8776-treated rats (Figure 5E). Cardiac output was increased after treatment with MK-8776, although the difference did not reach statistical significance (Figure 5F), and total pulmonary resistance was significantly reduced after CHK1 inhibition (Figure 5G). To determine whether MK-8776 exerts beneficial effects on pulmonary vascular remodeling, medial wall thickness of small PAs was measured. As shown in Figure 5H, the percentage of medial wall thickness was significantly decreased in MK-8776-treated rats as compared to the FHR vehicle group. In agreement with this, PASMC proliferation within distal PAs tends to reduce in MK-8776-treated rats, as evaluated by Ki67 and  $\alpha$ SMA double immunostaining on lung tissue, as well as P21 immunoblot (Figure 5I and Figure IX in the online-only Data Supplement).

Considering that no animal model fully mimics human PAH and in accordance with recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH,<sup>40</sup> we thus decided to test the therapeutic potential of MK-8776 in a second animal model. To this end, we used the monocrotaline rat model, for which increased CHK1 expression was noticed (Figure 2B). Two weeks after monocrotaline injection, male rats were randomly allocated to receive nebulized MK-8776 or its vehicle for 2 weeks. A third group consisted of control rats without monocrotaline injection (Figure 6A). As expected, vehicle-treated monocrotaline rats exhibited elevated RV systolic pressure and mPAP compared with control rats. As observed in the FHR model, inhibition of CHK1 using MK-8776 was associated with increased expression of pRPA32,  $\gamma$ H2AX, and phosphorylated CHK1 (S345; Figure 6B) and resulted in a significant reduction in RV systolic pressure, mPAP, and total pulmonary resistance (Figure 6). MK-8776-treated rats presented diminished RV hypertrophy (Figure 6E) and increased cardiac output as compared to vehicle-treated monocrotaline rats (Figure 6F). Regarding pulmonary vascular remodeling, vehicle-treated monocrotaline rats showed an increase in vessel wall thickness, which was significantly reduced by treatment with MK-8776 (Figure 6H). This histological improvement was accompanied by a decreased

trend in PASMC proliferation within distal PAs (Figure 6H), as assessed by quantifying the proportion of Ki67-positive-PASMCs and p21 expression levels in PAs by immunofluorescence and immunoblot, respectively (Figure IX in the online-only Data Supplement). Despite this hemodynamic improvement, no significant difference in survival was observed between the groups (Figure IX in the online-only Data Supplement).

## DISCUSSION

Primary activated by ATR in response to a broad spectrum of DNA insults interfering with DNA replication, CHK1 is essential for cancer cell viability by coordinating DNA repair, DNA replication, and subsequent cell cycle progression. Indeed, substantial works have shown that CHK1 levels could be used to identify tumors with high levels of RS and that CHK1 inhibitors selectively kill cancer cells exhibiting elevated levels of RS<sup>16,41</sup> whereas healthy tissues or tumors exhibiting low levels of RS are largely nonresponsive to ATR/CHK1 inhibitors. In the present study, we demonstrated that hyperproliferating PAH-PASMCs exhibit increased levels of  $\gamma$ H2AX and pRPA32, 2 markers of DNA damage/RS. We demonstrated that PAH-PASMCs display enhanced expression and activation of CHK1 and that its pharmacological or molecular inhibition induced further accumulation of DNA damage. Our results are consistent with recent studies demonstrating that, as observed in cancer cells, PAH cells progressively develop coping mechanisms to chronically stressful conditions allowing their survival and proliferation.<sup>4,7,8</sup> More importantly, we showed that pharmacological inhibition of CHK1 improves established PAH in 2 clinically relevant PAH rat models.

In the present study, we provide evidence that decreased expression levels of miR-424 accounts for elevated CHK1 expression in PAH-PASMCs. Interestingly, although downregulation of miR-424 was originally documented in PAH-PAECs promoting their proliferation,<sup>32</sup> CHK1 protein expression did not differ between control and PAH-PAECs, indicating cell-type-specific regulation of CHK1 expression in PAH. In addition, we cannot exclude the fact that other factors also contribute to increased CHK1 expression in PAH-PASMCs. Prior studies have demonstrated that treatment of cancer cells with the pan-HDAC (histone deacetylase) inhibitor vorinostat substantially reduced CHK1 mRNA expression,<sup>42</sup> and a similar effect was observed following inhibition of mTOR (mammalian target of rapamycin) signaling.<sup>43</sup> Given that pulmonary vascular remodeling in PAH is associated with increased expression of HDAC and activation of mTOR signaling,<sup>44,45</sup> these factors may also be involved in the regulation of CHK1 in PAH-PASMCs.

In cancer, 2 approaches have been developed to kill unwanted cells.<sup>46</sup> The first approach, stress overload, aims to intensify existing stress to surpass the buffer capacities of the cells. The second approach, called stress sensitization, aims to inhibit stress coping mechanisms and thus reach an amount of stress incompatible with cell viability. Targeting stress support pathways and, specifically, the DNA damage response network was proven successful in combating a variety of cancers. Although we found that pharmacological or molecular inhibition of CHK1 led to a pronounced accumulation of DNA damage and an antiproliferative effect in all PAH-PASMC cell lines examined, effect on resistance to apoptosis was more heterogeneous. Because, persistent and massive DNA damage has been

documented to trigger permanent cell cycle arrest, a state known as senescence,<sup>47</sup> it can be speculated that some PAH-PASMC cell lines may become senescent rather than apoptotic. The identification of the molecular mechanisms underlying the divergent sensitivity of MK-8776 in terms of cell death is an important subject for a future study and for potential clinical implication. In addition, although MK-8776 is considered as an inhibitor highly specific for CHK1, we cannot rule out that it may have little impact on CHK2 activity, which could explain the greater antisurvival effect observed with this drug compared with treatment with siCHK1.

Inhibition of CHK1 alone has demonstrated beneficial effects in multiple preclinical models of cancer<sup>48-50</sup> and many studies have documented robust cytotoxicity in cells lacking p53<sup>51</sup> as well as synergistic antitumor effects with different drugs, such as PARP-1, HDAC, and BRD4 (bromodomain-containing protein 4) inhibitors.<sup>52-54</sup> Interestingly, inhibition of PARP-1, HDACs, and BRD4 was reported to improve vascular remodeling in PAH animal models,<sup>7,55</sup> leading to the assumption that combined inhibition of DNA damage response pathways may achieve a more robust response. Consistent with our observation that activated CHK1 is a hallmark of isolated PAH-PASMCs, activation of ATR was also detected, supporting the view that ATR and CHK1 function as a kinase cascade. Besides ATR-CHK1 activation, augmented activation of CHK2 and DNA-PK was noted in PAH-PASMCs emphasizing a coordinated ATR- and ATM (ataxia-telangiectasia mutated)-dependent DNA damage response. Because CHK1 and CHK2 exert partly redundant function, it will be interesting to determine whether CHK1/CHK2 dual inhibitors may provide a therapeutic advantage over single CHK1 inhibitors. Given that PAH is a heterogeneous disorder and ATR/CHK1 inhibitors have been documented to achieve maximal efficacy in cancer studies based on the abundance of diverse factors, identification of potential predictive biomarker of CHK1 inhibitor sensitivity seems mandatory to define their potential use for PAH patient stratification and maximize their impact in the clinic.

Antineoplastic drugs are often associated with cardiotoxicity suggesting that inhibition of CHK1 may negatively impact the already weakened heart in PAH. To this end, intratracheal nebulization of MK-8776 was used in the present study to preferentially target its effect on the lungs with minimal cardiac exposure. We did not observe any macroscopic and functional difference between vehicle and MK-8776-treated rats confirming early clinical trials data.<sup>33</sup> Nevertheless, further studies are warranted to test putative toxicity effects.

In summary, our results demonstrate that the ATR-CHK1 signaling is activated in PAH-PASMCs and that inhibition of this axis provides significant therapeutic effects in 2 complementary animal models mimicking PAH. This indicates that inhibition of CHK1 may represent a new therapeutic avenue for patients with PAH by blocking or reversing pulmonary vascular remodeling, a key pathological feature of PAH for which current approved therapies have limited efficacy. Our findings set the ground for future studies deciphering the molecular mechanisms underlying MK-8776 action and exploring its ability to potentiate the effects of antiremodeling drugs in preclinical models of PAH. Finally, our data provide the rationale to investigate the implication of CHK1 in other proliferative cardiovascular diseases characterized by DNA damage, such as carotid artery restenosis.

## Supplementary Material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

## Acknowledgments

We thank members of the Pulmonary Hypertension and Vascular Biology Research Group for their help and advice throughout the project. We also acknowledge the advice of Serge Simard, biostatistician from the IUCPQ (Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec) Research Centre.

### Sources of Funding

This work was supported by grants from the Cardiovascular Medical Research and Education Fund (to O. Boucharat), the Canadian Institutes for Health Research (to S. Bonnet), National Institutes of Health grants R01 HL124021, HL 122596, HL 138437, and UH2 TR002073, as well as the American Heart Association Established Investigator Award 18EIA33900027 (to S.Y. Chan) and the French National Research Agency grant ANR-18-CE14-0025 (to T. Barter). S. Bonnet also holds a Canada Research Chair.

## Nonstandard Abbreviations and Acronyms

<b>αSMAα</b>	smooth muscle actin
<b>ATR</b>	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
<b>CHK1</b>	checkpoint kinase 1
<b>CLSPN</b>	Claspin
<b>FHR</b>	Fawn-hooded rat
<b>mPAP</b>	mean pulmonary artery pressure
<b>mTOR</b>	mammalian target of rapamycin
<b>PA</b>	pulmonary artery
<b>PAH</b>	pulmonary arterial hypertension
<b>PASMC</b>	pulmonary artery smooth muscle cells
<b>RS</b>	replication stress
<b>RV</b>	right ventricle
<b>TopBP1</b>	topoisomerase 2-binding protein 1

## REFERENCES

1. Lau EMT, Giannoulatou E, Celermajer DS, Humbert M. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 2017;14:603–614. doi: 10.1038/nrcardio.2017.84 [PubMed: 28593996]
2. Lajoie AC, Lauzière G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir Med* 2016;4:291–305. doi: 10.1016/S2213-2600(16)00027-8 [PubMed: 26935844]
3. Humbert M, Guignabert C, Bonnet S, Dorfmueller P, Klinger JR, Nicolls MR, Olschewski AJ, Pullamsetti SS, Schermuly RT, Stenmark KR, Rabinovitch M. Pathology and pathobiology of pulmonary hypertension: state of the art and research perspectives. *Eur Respir J* 2019;53:1801887.

4. Boucherat O, Vitry G, Trinh I, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 2017;7:285–299. doi: 10.1177/2045893217701438 [PubMed: 28597757]
5. Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, Goncharova EA. Translational advances in the field of pulmonary hypertension. From cancer biology to new pulmonary arterial hypertension therapeutics. Targeting cell growth and proliferation signaling hubs. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:425–437. doi: 10.1164/rccm.201606-1226PP [PubMed: 27627135]
6. Bourgeois A, Lambert C, Habbout K, Ranchoux B, Paquet-Marceau S, Trinh I, Breuils-Bonnet S, Paradis R, Nadeau V, Paulin R, Provencher S, Bonnet S, Boucherat O. FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2018;96:223–235. doi: 10.1007/s00109-017-1619-0 [PubMed: 29290032]
7. 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, Bonnet S. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014;129:786–797. [PubMed: 24270264]
8. Boucherat O, Peterlini T, Bourgeois A, et al. Mitochondrial hsp90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:90–103 [PubMed: 29394093]
9. Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 2015;10:425–448. doi: 10.1146/annurevpathol-012414-040424 [PubMed: 25621662]
10. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014;16:2–9. doi: 10.1038/ncb2897 [PubMed: 24366029]
11. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996;274:1664–1672. [PubMed: 8939848]
12. Pilié PG, Tang C, Mills GB, Yap TA. State-of-the-art strategies for targeting the DNA damage response in cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 2019;16:81–104. doi: 10.1038/s41571-018-0114-z [PubMed: 30356138]
13. Liu Q, Guntuku S, Cui XS, Matsuoaka S, Cortez D, Tamai K, Luo G, Carattini-Rivera S, DeMayo F, Bradley A, Donehower LA, Elledge SJ. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev* 2000;14:1448–1459. [PubMed: 10859164]
14. Carrassa L, Brogini M, Erba E, Damia G. Chk1, but not Chk2, is involved in the cellular response to DNA damaging agents: differential activity in cells expressing or not p53. *Cell Cycle* 2004;3:1177–1181. [PubMed: 15326376]
15. Liu S, Bekker-Jensen S, Mailand N, Lukas C, Bartek J, Lukas J. Claspin operates downstream of TopBP1 to direct ATR signaling towards Chk1 activation. *Mol Cell Biol* 2006;26:6056–6064. doi: 10.1128/MCB.00492-06 [PubMed: 16880517]
16. Sarmiento LM, Póvoa V, Nascimento R, Real G, Antunes I, Martins LR, Moita C, Alves PM, Abecasis M, Moita LF, Parikh RM, Meijerink JP, Barata JT. CHK1 overexpression in T-cell acute lymphoblastic leukemia is essential for proliferation and survival by preventing excessive replication stress. *Oncogene* 2015;34:2978–2990. doi: 10.1038/onc.2014.248 [PubMed: 25132270]
17. Davies KD, Humphries MJ, Sullivan FX, von Carlowitz I, Le Huerou Y, Mohr PJ, Wang B, Blake JF, Lyon MA, Gunawardana I, Chicarelli M, Wallace E, Gross S. Single-agent inhibition of Chk1 is antiproliferative in human cancer cell lines in vitro and inhibits tumor xenograft growth in vivo. *Oncol Res* 2011;19:349–363. [PubMed: 21936404]
18. Gagou ME, Zuazua-Villar P, Meuth M. Enhanced H2AX phosphorylation, DNA replication fork arrest, and cell death in the absence of Chk1. *Mol Biol Cell* 2010;21:739–752. doi: 10.1091/mbc.e09-07-0618 [PubMed: 20053681]
19. O'Connor MJ. Targeting the DNA damage response in cancer. *Mol Cell* 2015;60:547–560. doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.040 [PubMed: 26590714]
20. Bertero T, Oldham WM, Cottrill KA, et al. Vascular stiffness mechanoactivates YAP/TAZ-dependent glutaminolysis to drive pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2016;126:3313–3335. doi: 10.1172/JCI86387. [PubMed: 27548520]

21. Bnl E, Igin S, Atli O, Ergun B, Sirmagal B. The effects of gender difference on monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Hum Exp Toxicol* 2013;32:766–774. doi: 10.1177/0960327113477874 [PubMed: 23821593]
22. Farhat MY, Chen MF, Bhatti T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW. Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hypertension in rats. *Br J Pharmacol* 1993;110:719–723. [PubMed: 8242243]
23. Provencher S, Archer SL, Ramirez FD, Hibbert B, Paulin R, Boucherat O, Lacasse Y, Bonnet S. Standards and methodological rigor in pulmonary arterial hypertension preclinical and translational research. *Circ Res* 2018;122:1021–1032. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.312579 [PubMed: 29599278]
24. Zou L, Elledge SJ. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science* 2003;300:1542–1548. doi: 10.1126/science.1083430 [PubMed: 12791985]
25. Zhao H, Piwnicka-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2001;21:4129–4139. doi: 10.1128/MCB.21.13.4129-4139.2001 [PubMed: 11390642]
26. Nam EA, Zhao R, Glick GG, Bamsbach CE, Friedman DB, Cortez D. Thr-1989 phosphorylation is a marker of active ataxia telangiectasia-mutated and Rad3-related (ATR) kinase. *J Biol Chem* 2011;286:28707–28714. doi: 10.1074/jbc.M111.248914 [PubMed: 21705319]
27. Chini CC, Chen J. Claspin, a regulator of Chk1 in DNA replication stress pathway. *DNA Repair (Amst)* 2004;3:1033–1037. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.001 [PubMed: 15279790]
28. Sengupta S, Robles AI, Linke SP, Sinogeeva NI, Zhang R, Pedeux R, Ward IM, Celeste A, Nussenzweig A, Chen J, Halazonens TD, Harris CC. Functional interaction between BLM helicase and 53BP1 in a Chk1-mediated pathway during S-phase arrest. *J Cell Biol* 2004;166:801–813. doi: 10.1083/jcb.200405128 [PubMed: 15364958]
29. Lin YF, Shih HY, Shang Z, Matsunaga S, Chen BP. DNA-PKcs is required to maintain stability of Chk1 and Claspin for optimal replication stress response. *Nucleic Acids Res* 2014;42:4463–4473. doi: 10.1093/nar/gku116 [PubMed: 24500207]
30. Xu J, Li Y, Wang F, Wang X, Cheng B, Ye F, Xie X, Zhou C, Lu W. Suppressed miR-424 expression via upregulation of target gene Chk1 contributes to the progression of cervical cancer. *Oncogene* 2013;32:976–987. doi: 10.1038/onc.2012.121 [PubMed: 22469983]
31. Wang X, Li Q, Jin H, Zou H, Xia W, Dai N, Dai XY, Wang D, Xu CX, Qing Y. miR-424 acts as a tumor radiosensitizer by targeting aprataxin in cervical cancer. *Oncotarget* 2016;7:77508–77515. doi: 10.18632/oncotarget.12716 [PubMed: 27769049]
32. Kim J, Kang Y, Kojima Y, Lighthouse JK, Hu X, Aldred MA, McLean DL, Park H, Comhair SA, Greif DM, Erzurum SC, Chun HJ. An endothelial apelin-FGF link mediated by miR-424 and miR-503 is disrupted in pulmonary arterial hypertension. *Nat Med* 2013;19:74–82. doi: 10.1038/nm.3040 [PubMed: 23263626]
33. Daud AI, Ashworth MT, Strosberg J, et al. Phase I dose-escalation trial of checkpoint kinase 1 inhibitor MK-8776 as monotherapy and in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2015;33:1060–1066. doi: 10.1200/JCO.2014.57.5027. [PubMed: 25605849]
34. Webster JA, Tibes R, Morris L, et al. Randomized phase II trial of cytosine arabinoside with and without the CHEK1 inhibitor MK-8776 in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2017;61:108–116. doi: 10.1016/j.leukres.2017.09.005 [PubMed: 28957699]
35. Syljuksen RG, Sorensen CS, Hansen LT, Fugger K, Lundin C, Johansson F, Helleday T, Sehested M, Lukas J, Bartek J. Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage. *Mol Cell Biol* 2005;25:3553–3562. doi: 10.1128/MCB.25.9.3553-3562.2005 [PubMed: 15831461]
36. Kim MK, Min DJ, Wright G, Goldlust I, Annunziata CM. Loss of compensatory pro-survival and anti-apoptotic modulator, IKKε, sensitizes ovarian cancer cells to CHEK1 loss through an increased level of p21. *Oncotarget* 2014;5:12788–12802. doi: 10.18632/oncotarget.2665 [PubMed: 25474241]

37. Bertoli C, Klier S, McGowan C, Wittenberg C, de Bruin RA. Chk1 inhibits E2F6 repressor function in response to replication stress to maintain cell-cycle transcription. *Curr Biol* 2013;23:1629–1637. doi: 10.1016/j.cub.2013.06.063 [PubMed: 23954429]
38. Bertoli C, Herlihy AE, Pennycook BR, Kriston-Vizi J, de Bruin RAM. Sustained E2F-dependent transcription is a key mechanism to prevent replication-stress-induced DNA damage. *Cell Rep* 2016;15:1412–1422. doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.036 [PubMed: 27160911]
39. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ -kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: Similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006;113:2630–2641 [PubMed: 16735674]
40. Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, Hassoun PM, Rabinovitch M, Nicolls MR, Humbert M. Translating research into improved patient care in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2017;195:583–595. doi: 10.1164/rccm.201607-1515PP [PubMed: 27649290]
41. Gupta D, Lin B, Cowan A, Heinen CD. ATR-Chk1 activation mitigates replication stress caused by mismatch repair-dependent processing of DNA damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018;115:1523–1528. doi: 10.1073/pnas.1720355115 [PubMed: 29378956]
42. Dai Y, Chen S, Kmiecik M, Zhou L, Lin H, Pei XY, Grant S. The novel Chk1 inhibitor MK-8776 sensitizes human leukemia cells to HDAC inhibitors by targeting the intra-S checkpoint and DNA replication and repair. *Mol Cancer Ther* 2013;12:878–889. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0902 [PubMed: 23536721]
43. Zhou X, Liu W, Hu X, Dorrance A, Garzon R, Houghton PJ, Shen C. Regulation of CHK1 by mTOR contributes to the evasion of DNA damage barrier of cancer cells. *Sci Rep* 2017;7:1535. doi: 10.1038/s41598-017-01729-w [PubMed: 28484242]
44. Zhao L, Chen CN, Hajji N, Oliver E, Coroneo E, Wharton J, Wang D, Li M, McKinsey TA, Stenmark KR, Wilkins MR. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylamide hydroxamic acid. *Circulation* 2012;126:455–467. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103176 [PubMed: 22711276]
45. Goncharov DA, Kudryashova TV, Zhai H, Ihida-Stansbury K, DeLisser H, Krymskaya VP, Tuder RM, Kavrut SM, Goncharova EA. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) coordinates pulmonary artery smooth muscle cell metabolism, proliferation, and survival in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014;129:864–874. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.004581 [PubMed: 24270265]
46. Luo J, Solimini NL, Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 2009;136:823–837. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.024 [PubMed: 19269363]
47. d'Adda di Fagagna F. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer* 2008;8:512–522. [PubMed: 18574463]
48. Brooks K, Oakes V, Edwards B, Ramall M, Leo P, Pavey S, Pinder A, Beamish H, Mukhopadhyay P, Lambie D, Gabrielli B. A potent Chk1 inhibitor is selectively cytotoxic in melanomas with high levels of replicative stress. *Oncogene* 2013;32:788–796. doi: 10.1038/onc.2012.72 [PubMed: 22391562]
49. Cole KA, Huggins J, Laquaglia M, et al. RNAi screen of the protein kinome identifies checkpoint kinase 1 (CHK1) as a therapeutic target in neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108:3336–3341. doi: 10.1073/pnas.1012351108 [PubMed: 21289283]
50. Bryant C, Scriven K, Massey AJ. Inhibition of the checkpoint kinase Chk1 induces DNA damage and cell death in human Leukemia and Lymphoma cells. *Mol Cancer* 2014;13:147. doi: 10.1186/1476-4598-13-147 [PubMed: 24913641]
51. Wang Q, Fan S, Eastman A, Worland PJ, Sausville EA, O'Connor PM. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:956–965. [PubMed: 8667426]
52. Tang Y, Hamed HA, Poklepovic A, Dai Y, Grant S, Dent P. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 modulates the lethality of CHK1 inhibitors in mammary tumors. *Mol Pharmacol* 2012;82:322–332. doi: 10.1124/mol.112.078907 [PubMed: 22596349]

53. Yin Y, Shen Q, Zhang P, et al. Chk1 inhibition potentiates the therapeutic efficacy of PARP inhibitor BMN673 in gastric cancer. *Am J Cancer Res* 2017;7:473–483. [PubMed: 28401005]
54. Pongas G, Kim MK, Min DJ, House CD, Jordan E, Caplen N, Chalka S, Ohiri J, Kruhlak MJ, Annunziata CM. BRD4 facilitates DNA damage response and represses CBX5/Heterochromatin protein 1 (HP1). *Oncotarget* 2017;8:51402–51415. doi: 10.18632/oncotarget.17572 [PubMed: 28881656]
55. Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, et al. Bromodomain-containing protein 4: the epigenetic origin of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2015;117:525–535. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.115.307004 [PubMed: 26224795]

Author Manuscript

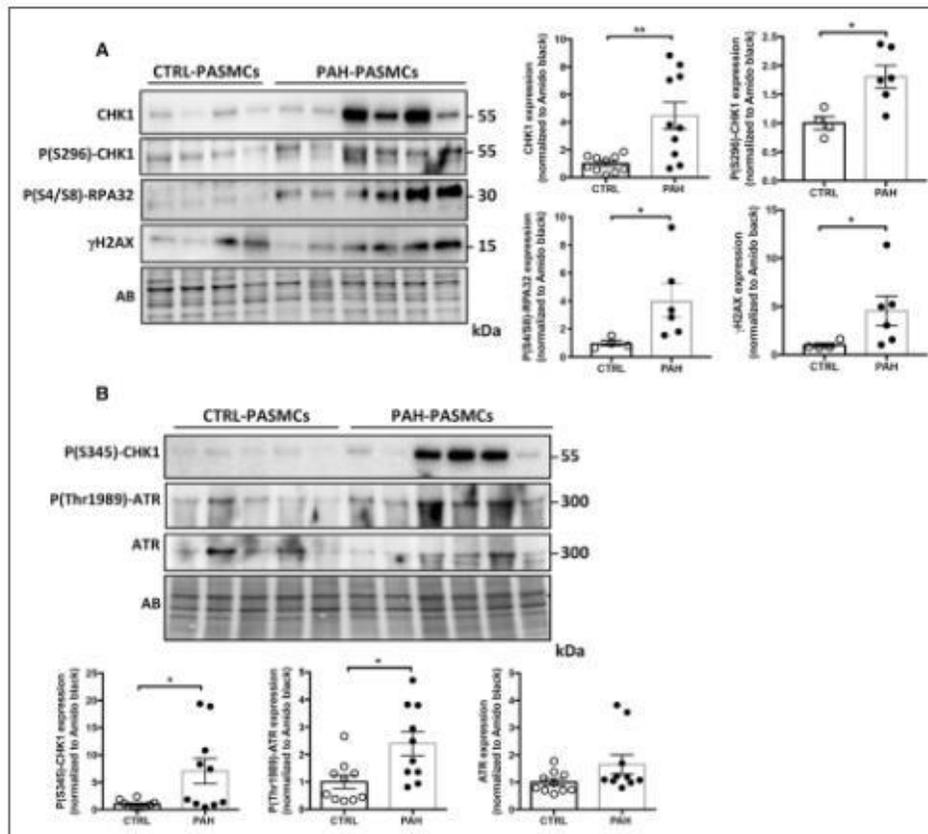
Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

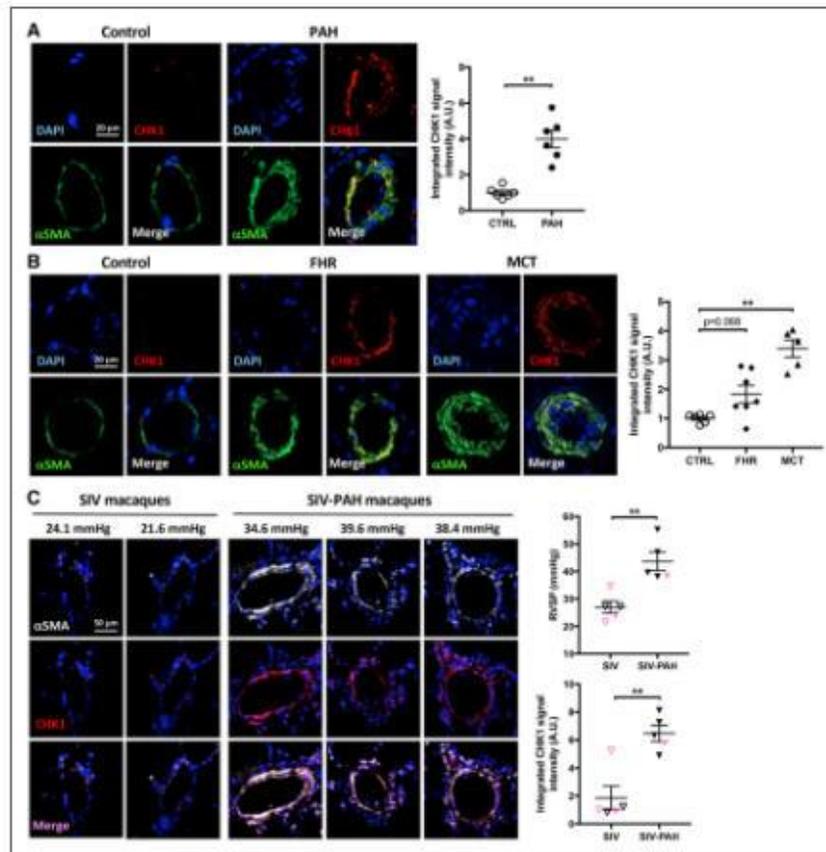
#### Highlights

- Hyperproliferative pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension and animal models display elevated levels of DNA damage and exhibit constitutive activation of the ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related)/CHK1 (checkpoint kinase 1) pathway.
- In vitro, pharmacological or molecular inhibition of CHK1 exacerbates DNA damage and reduces pulmonary arterial hypertension–pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and resistance to apoptosis.
- Lung-specific targeting of CHK1 is associated with histological and hemodynamic improvement in 2 rat models of pulmonary arterial hypertension.



**Figure 1. Pulmonary arterial hypertension (PAH)-pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCS) display elevated levels of DNA damage/replication stress and exhibit constitutive activation of the ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related)/CHK1 (checkpoint kinase 1) pathway.**

**A.** Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of CHK1, p(S296)-CHK1, p(S4/S8)-RPA32 and  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX) in isolated PASMCS from control (Ctrl; n=4-10) and PAH (n=5-10) patients. **B.** Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of p(S345)-CHK1, p(Thr1989)-ATR and ATR in isolated PASMCS from Ctrl (n=10) and PAH (n=10) patients. Protein expression was normalized to Amido black (AB). Data are presented as mean $\pm$ SEM. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01.



**Figure 2. CHK1 (checkpoint kinase 1) is overexpressed in distal pulmonary arteries (PAs) from pulmonary arterial hypertension (PAH) patients and animal models.**  
**A,** Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin; green) and CHK1 (red) in lungs from control donors ( $n=6$ ) and patients with PAH ( $n=6$ ) and corresponding quantification of CHK1 signal intensity, demonstrating overexpression of CHK1 in remodeled PAs. **B,** Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA (green) and CHK1 (red) and corresponding quantification of integrated CHK1 signal intensity showing increased expression of CHK1 in remodeled distal PAs from Fawn-Hooded rats (FHR) and monocrotaline (MCT)-treated rats compared with control rats ( $n=5-7$  rats per group). **C,** Double immunofluorescence staining for  $\alpha$ SMA (white) and CHK1 (red) and corresponding quantification of integrated CHK1 signal intensity showing increased expression of CHK1 in PAs from simian immunodeficiency virus (SIV)-infected macaques suffering PAH ( $n=5$  macaques per group). Pink dots symbolize females. Scale bars: 20  $\mu$ m in **A** and **B**; 50  $\mu$ m in **C**.

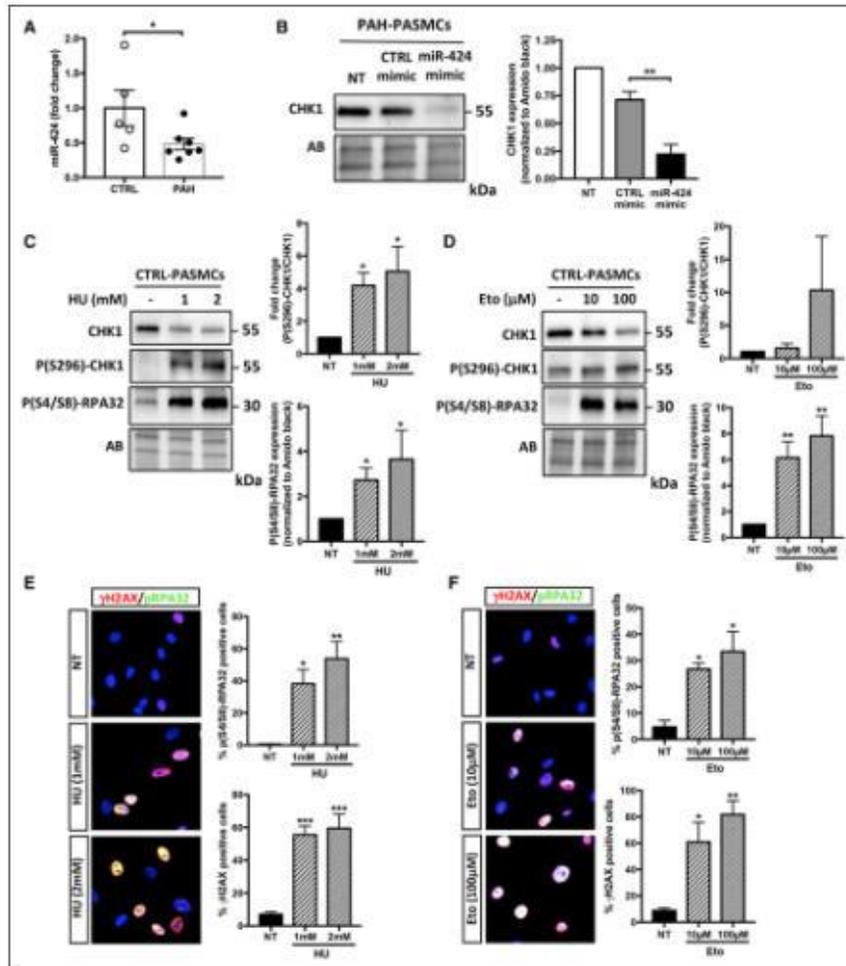
C. \*\* $P < 0.01$ . AU indicates arbitrary unit; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindol; and RVSP, right ventricular systolic pressure.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript



**Figure 3. Regulation of CHK1 (checkpoint kinase 1) expression and activity by miR (microRNA)-424 and DNA damage inducers, respectively.**

**A**, Expression of miR-424 in isolated pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from control (Ctrl; n=5) and pulmonary arterial hypertension (PAH; n=7) patients. **B**, Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating reduced expression of CHK1 in PAH-PASMCs (n=3) transfected with miR-424 mimics (50 nM) for 48 h. **C** and **D**, Representative Western blots and corresponding quantifications showing increased activity of CHK1 in Ctrl PASMCs (n=4) after treatment or not with

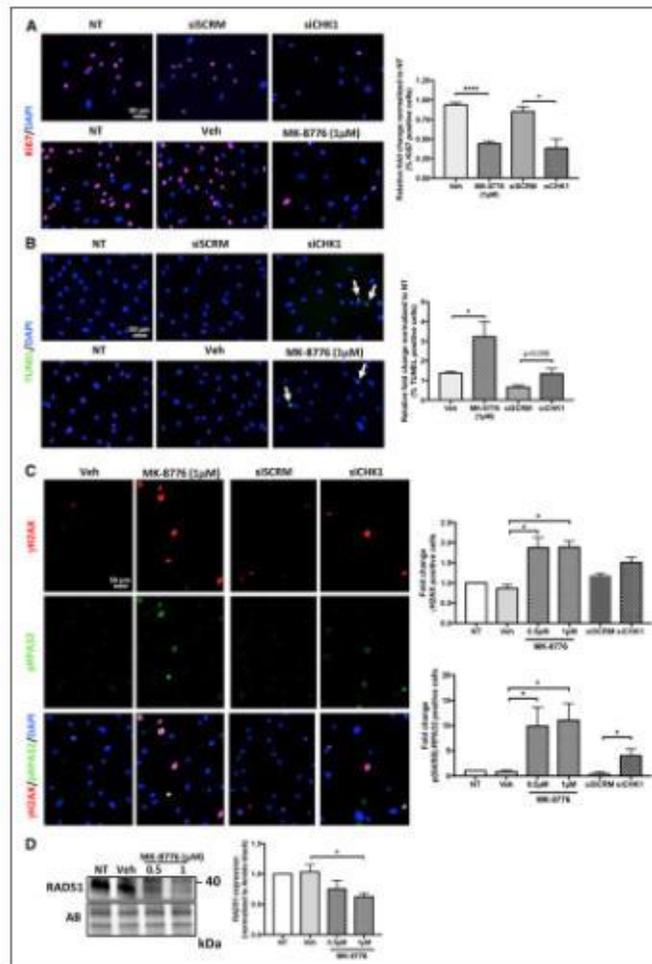
hydroxyurea (HU, **C**), Etoposide (Eto, **D**) or their corresponding Ctrl for 48 h. **E** and **F**, Representative immunofluorescence images and corresponding quantifications of p(S4/S8)-RPA32- and  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX)-positives PAH-PASMCs after treatment or not with HU (**E**) or Eto (**F**) for 48 h. mRNA and protein expressions were normalized to U6 and Amido black (AB), respectively. Data are presented as mean $\pm$ SEM; \* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01 and \*\*\* $P$ <0.001. NT indicates non treated; and pRPA32, phosphorylated replication protein A2.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript



**Figure 4. Inhibition of CHK1 (checkpoint kinase 1) reduces pulmonary arterial hypertension (PAH)-pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) proliferation and resistance to apoptosis and exacerbates DNA damage.**

**A**, Proliferation (Ki67) and **(B)** apoptosis (TUNEL [terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling]) were measured after treatments of PAH-PASMCs with the CHK1 pharmacological inhibitor MK-8776 (1  $\mu$ M) or vehicle (Veh, DMSO), as well as siCHK1 (small interfering RNA for CHK1) or siCRM (scrambled small interfering RNA; 20 nM) for 48 h. Representative immunofluorescence images of Ki67 and TUNEL-positive cells as well as corresponding quantifications are shown. **C**, Representative immunofluorescence

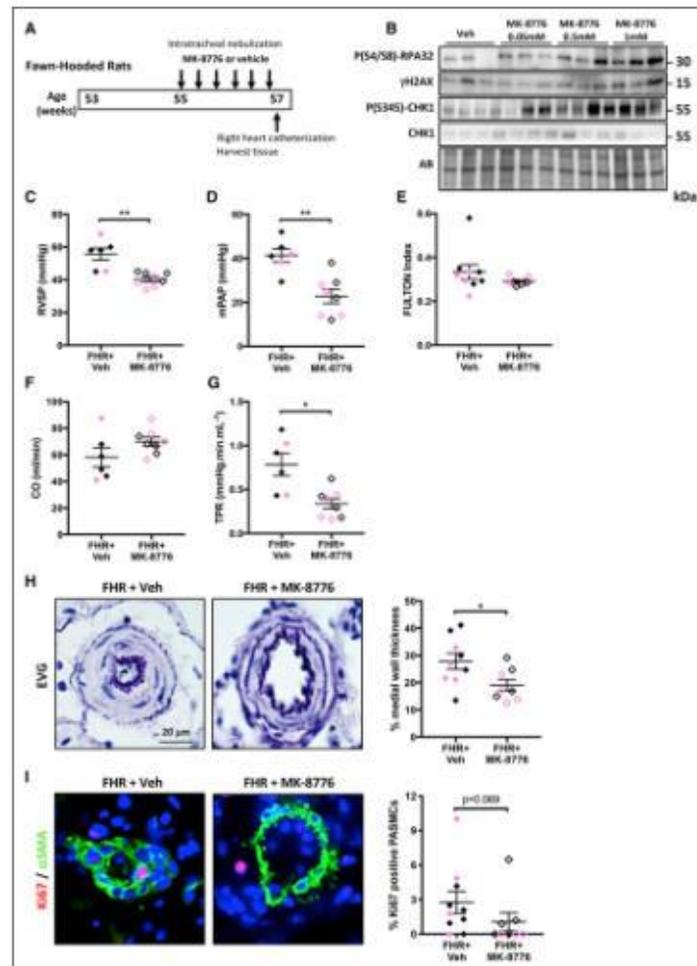
images and corresponding quantifications of p(S4/S8)-RPA32- and  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX)-positives PAH-PASMCs after treatment or not with MK-8776 (1  $\mu$ M), siCHK1 (20 nM) or their corresponding controls for 48 h. **D**, Representative Western blot and corresponding densitometric analyses of RAD51 in PAH-PASMCs (n=4) exposed to MK-8776 for 48 h. Scale bar=50  $\mu$ m. Data are expressed as fold change relative to untreated cells; protein expression was normalized to Amido black (AB). Experiments were performed in triplicate in at least 4 PAH-PASMC cell lines. \* $P$ <0.05 and \*\*\*\* $P$ <0.0001. DAPI indicates 4',6-diamidino-2-phenylindol; NT, non treated; and pRPA32, phosphorylated replication protein A2.

Author Manuscript

Author Manuscript

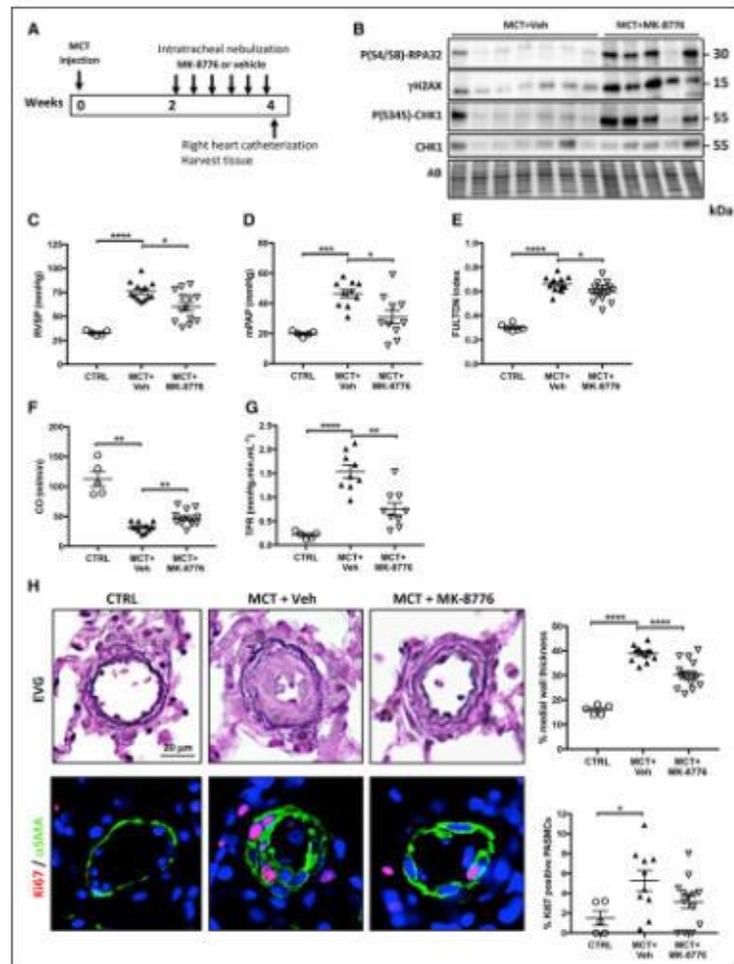
Author Manuscript

Author Manuscript



**Figure 5. MK-8776 improves pulmonary hypertension in the Fawn-Hooded rat (FHR) model.** **A.** Schematic representation of the experimental design. **(B)** Expression of p(S4/S8)-RPA32,  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX), p(S345)-CHK1 (checkpoint kinase 1) and CHK1 were assessed by Western blot in dissected distal pulmonary arteries (PAs) from FHR treated or not with increasing doses of MK-8776 for 2 wk. **C–G,** Right ventricular systolic pressure (RVSP, **C**), mean PA pressure (mPAP, **D**), cardiac output (CO, **E**), total pulmonary vascular resistance (TPR, **F**) and right ventricular hypertrophy (Fulton index, **G**) were measured in FHR+vehicle (Veh) and FHR+MK-8776 (1 mmol/L thrice a

week for 2 wk). **H**, Representative images of distal PAs and corresponding quantification of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness by using Elastica van Gieson (EVG) staining. **I**, Representative images of distal PAs labeled with Ki67 in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ SMA staining ( $\alpha$  smooth muscle actin, green). The graph on the right represents the percentage of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) positive for Ki67 in distal PAs. Scale bar=20 $\mu$ m; n=6–10 rats/group (mean of 15 vessels/rat). Pink dots correspond to females. AB indicates Amido black. \* $P$ <0.05 and \*\* $P$ <0.01.



**Figure 6. Pharmacological inhibition of CHK1 (checkpoint kinase 1) using MK-8776 improves hemodynamic parameters and vascular remodeling in the monocrotaline (MCT) rat model.** **A**, Schematic representation of the experimental design. **B**, Expression of p(S4/S8)-RPA32,  $\gamma$ H2AX (H2A histone family member X and gamma-H2AX), p(S345)-CHK1 and CHK1 was assessed by Western blot in dissected distal pulmonary arteries (Pas) from MCT treated or not with MK-8776 1 mmol/L thrice a week for 2 wk. **C–G**, Right ventricular systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), cardiac output (CO), total pulmonary resistance (TPR) and right ventricular hypertrophy were measured in control

(Ctrl), MCT+vehicle (Veh) and MCT+MK-8776 (1 mmol/L thrice a week for 2 wk) rats. **H**, Representative images of distal PAs stained with Elastica van Gieson (EVG) or labeled with Ki67 (proliferation, red). Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ SMA ( $\alpha$  smooth muscle actin, green). Graphs on the **right** represent the degree of vascular remodeling (as determined by the measure of the medial wall thickness) and the percentage of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) positive for Ki67 in distal PAs. Scale bar=20 $\mu$ m; n=5–15 rats/group (mean of 15 vessels/rat). AB indicates Amido black. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, \*\*\* $P$ <0.001 and \*\*\*\* $P$ <0.0001.

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

Author Manuscript

## **Annexe V.**

Publié dans Int J Biochem Cell Biol. 2018 Nov;104:9-13.

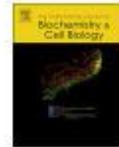
**Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets.**

Alice Bourgeois, Junichi Omura, **Karima Habbout**, Sebastien Bonnet, Olivier Boucherat.



Contents lists available at ScienceDirect

# International Journal of Biochemistry and Cell Biology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biociel](http://www.elsevier.com/locate/biociel)

Medicine in focus

## Pulmonary arterial hypertension: New pathophysiological insights and emerging therapeutic targets

Alice Bourgeois<sup>a</sup>, Junichi Omura<sup>a</sup>, Karima Habbout<sup>a</sup>, Sebastien Bonnet<sup>a</sup>, Olivier Boucherat<sup>a,b,\*</sup><sup>a</sup> Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Québec, QC, Canada<sup>b</sup> Department of Medicine, Université Laval, Québec, QC, Canada

## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Vascular remodeling  
Metabolism  
Epigenetic  
DNA damage

## ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) encompasses a group of clinical entities characterized by sustained vasoconstriction and progressive vascular remodeling that act in concert to elevate pulmonary vascular resistance. The current treatments for PAH are mainly dedicated to target the process of vasoconstriction and do not offer a cure. There is now accumulating evidence that expansion of pulmonary artery cells due to increased proliferation and apoptotic evasion is a key pathological component of vascular remodeling that occurs in PAH. Thus, vascular lesions seen in advanced PAH patients present some cancer-like characteristics offering important avenues for exploration and expanding treatment options. In this review article, we will discuss recent advances into mechanisms underlying disease progression, with a focus on pulmonary artery smooth muscle cells.

## 1. Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease characterized by vasoconstriction and vascular remodeling of distal pulmonary arteries (PAs), resulting in a persistent elevation of the mean PA pressure above 25 mmHg at rest, and ultimately in right heart failure (Lau et al., 2017). PAH is classified into subgroups based on etiology, including idiopathic, heritable (corresponding mostly with heterozygous germline Bone morphogenetic protein receptor-type 2, BMPR2 mutations), drug-induced (e.g. appetite suppressants, methamphetamine, etc.) and associated with other conditions (e.g. scleroderma, HIV, etc.) (Lau et al., 2017). Regardless of their etiology, all forms of PAH exhibit similar pulmonary vascular lesions suggesting shared pathological mechanisms. Mounting evidence supports the concept that development of PAH follows a biphasic pattern; a model supported by studies showing that apoptotic drugs able to reverse advanced PAH (Schermler et al., 2005), at the expense of severe side effects (Hoepfer et al., 2013), also predispose to development of the disease (Guignabert et al., 2016). Indeed, due to genetic predisposition and exposition to numerous insults (e.g. oxidative and shear stresses, inflammation), PA endothelial cell (PAEC) dysfunction is recognized as the primary event that causes PAH. In this model, PAECs that undergo apoptosis liberate a variety of cytokines and growth factors creating conditions that subsequently stimulate vessel constriction along with favoring the emergence of highly proliferative and apoptosis-resistant

PA vascular cells, including PA smooth muscle cells (PASMCs), adventitial fibroblasts, but also PAECs themselves (Figs. 1 and 2). These alterations lead to a gradual narrowing of the vascular luminal and possibly to complete occlusion. Currently approved drugs for PAH, mainly dedicated to reduce the pulmonary vasomotor tone, do not cure the disease and only confer modest mortality and quality of life benefits (Lajoie et al., 2016). In view of this, the pathogenic paradigm of PAH has gradually shifted away from vasoconstriction towards much greater focus on vascular remodeling with significant research effort directed toward deciphering the molecular mechanisms allowing PA cells (especially PASMCs) to survive and hyper-proliferate, notwithstanding exposure to chronic damaging stresses (Boucherat et al., 2017). Considering that the phenotype of PAH cells in an advanced stage of the disease is quite similar to that observed in cancer cells, this suggests that lessons learned from the field of oncology may provide valuable insights into PAH pathogenesis, and indirectly that drugs currently used in cancer and demonstrating safety profiles could be repurposed to tackle PAH. While inflammation and genetic abnormalities are key factors of PAH pathogenesis, determining the role of DNA damage response, metabolic reprogramming, endothelial-mesenchymal transition and epigenetics have become a major focus in PAH research and substantial effort are directed towards identifying clinical targets.

\* Corresponding author at: Pulmonary Hypertension Research Group, IUCPQ Research Centre, 2725, chemin Sainte-Foy, Québec, QC, G1V 4G5, Canada.  
E-mail address: [olivier.boucherat@iucpq.ulaval.ca](mailto:olivier.boucherat@iucpq.ulaval.ca) (O. Boucherat).

<https://doi.org/10.1016/j.biociel.2018.08.015>

Received 16 April 2018; Received in revised form 24 August 2018; Accepted 29 August 2018

Available online 03 September 2018

1357-2725/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

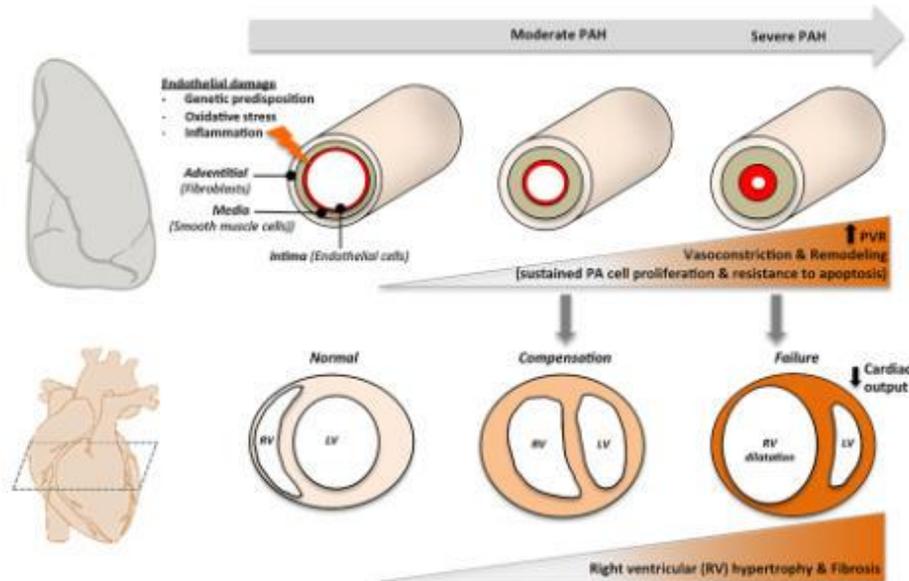


Fig. 1. Schematic progression of pulmonary arterial hypertension. Following endothelial dysfunction, distal pulmonary arteries (PAs) undergo progressive vascular remodeling associated with exaggerated proliferation and resistance to apoptosis of PA resident cells. This structural change progressively results in occlusion of the pulmonary vascular lumen and contributes to elevations of pulmonary vascular resistances (PVR) and PA pressure. As a result of pressure-overload, the right ventricle (RV) initially compensates by an increase in hypertrophy and contractibility to maintain cardiac output (CO). In most of patients, however, these compensatory mechanisms fail and premature death occurs.

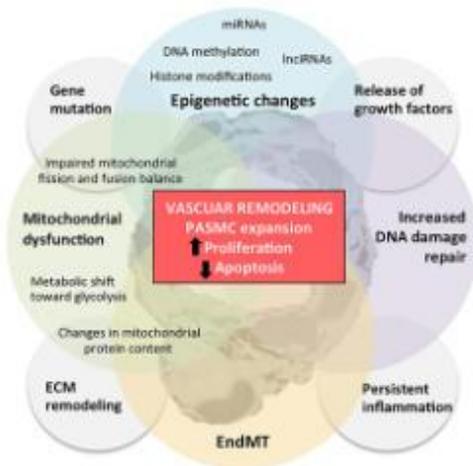


Fig. 2. Pathological factors contributing to vascular remodeling in PAH by stimulation of pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) expansion. ECM, extracellular matrix.

## 2. Pathogenesis

### 2.1. Immune dysregulation

As a result of perivascular accumulation of immune cells (such as macrophages, lymphocytes, dendritic and mast cells), a myriad of pro-inflammatory mediators have been documented to be increased in PAH patients, collectively contributing to the initiation and progression of vascular remodeling (Kuebler et al., 2018). Among them, the interleukin-6 (IL-6) is considered one of the primary target, as (i) its serum concentration is elevated in PAH patients (Humbert et al., 1995) and predicts survival (Soon et al., 2010); (ii) its overexpression induces pulmonary hypertension (PH) in mice (Steiner et al., 2009); and (iii) inhibition of its signaling pathway prevents and reverses PH in animal models by, at least in part, reducing the apoptosis-resistant threshold in PSMCs (Tamura et al., 2018). Although other evidence connect immune dysregulation to PAH, such as protection against PH development in xenograft lung cancer models in immunodeficient mice (Pullamsetti et al., 2017) and the presence of circulating autoantibodies (Kuebler et al., 2018), the beneficial effect of anti-inflammatory treatments remains limited in some human PAH subtypes.

### 2.2. DNA damage response

Efficient detection and repair of DNA damage is crucial for cell survival. In agreement with the two-step model for PAH development, it has been demonstrated that early PAEC dysfunction was associated with an enhanced susceptibility to DNA damage, a condition amplified by genetic loss of BMPR2 signaling or hypoxia (Diebold et al., 2015; Li et al., 2014). However, in the setting of disease progression, PAH cells exhibit sustained proliferation and survival, indicating that cells have

mounted protective responses to counteract the threats posed by DNA damage. Indeed, enhanced expression of Poly(ADP-ribose-1 (PARP-1), a component of the DNA damage/repair machinery was observed in PAH-PASMCs (Meloche et al., 2014). Furthermore, overexpression of the transcription factor Forkhead box protein M1 (FOXO1) was shown to prevent DNA damage accumulation by stimulating the expression of the DNA damage sensor Nijmegen breakage syndrome 1 (Bourgeois et al., 2018). Consistently, pharmacological inhibition of PARP-1 and FOXO1 has clearly demonstrated therapeutic benefits in animal models mimicking PAH (Bourgeois et al., 2018; Meloche et al., 2014). Thus, targeting factors that keep non-deleterious levels of DNA damage to induce intolerable DNA damage levels has recently emerged as an exciting avenue of new treatments for PAH, currently tested in a clinical trial (NCT03251872).

### 2.3. Metabolism

Metabolic dysfunction is a hallmark of PAH cells (Fig. 2). Like cancer cells, PAH cells undergo major metabolic transformations in a process called reprogramming, favoring glycolysis and fatty acid oxidation over oxidative phosphorylation (OXPHOS) (Ryan and Archer, 2015). During disease progression, this metabolic shift coordinated at the transcriptional level by the normoxic activation of the transcription factor Hypoxia-inducible factor 1- $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) directly contributes to the greater proliferative and survival capacity of PAH cells (Fig. 2). Indeed, HIF-1 $\alpha$  was shown to stimulate the expression of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK), which inactivates the pyruvate dehydrogenase (PDH) and thus decreases the metabolism of pyruvate into the mitochondria. Furthermore, inhibition of mitochondrial OXPHOS and activation of Dynamin-related protein-1 by HIF-1 $\alpha$  was documented to perturb the mitochondrial fusion and fission balance in PAH-PASMCs towards exaggerated fission. Although the mechanism remains to be clarified, mitochondrial fragmentation triggers PAH-PASMCs proliferation and resistance to apoptosis (Ryan and Archer, 2015). As a consequence of its critical role in PAH development and progression, metabolic-targeting therapies have been tested. Among them, administration of dichloroacetate (DCA), an inexpensive inhibitor of PDK successfully used to limit cancer progression in experimental models, demonstrated significant clinical effects in genetically susceptible PAH patients receiving background therapies (Michelakis et al., 2017). In addition to altered mitochondrial shape, differences in the mitochondrial protein profile have been also reported. For instance, similar to that observed in cancer cells, specific accumulation of the molecular chaperone Heat Shock Protein-90 (HSP90) was detected in hyperproliferating PAH-PASMCs (Boucherat et al., 2018). Further analyses revealed that this pool of HSP90 compartmentalized in mitochondria of diseased cells represents a protective mechanism against stress by stabilizing different proteins involved in the maintenance of mitochondrial DNA integrity and bioenergetics and thus ensuring cell survival. Importantly, treatment with a mitochondria-targeted HSP90 inhibitor called Gamitrinib (Kang et al., 2009), which does not affect cytosolic HSP90 function, specifically reduced the proliferative capacity of PAH-PASMCs and improved established PAH in two animal models (Boucherat et al., 2018).

### 2.4. Endothelial-Mesenchymal transition

Endothelial-mesenchymal transition (EndMT) is a biological process, known to favor PA thickening during normal development (Arciniegas et al., 2005), in which PAECs transdifferentiate into mesenchymal cells. Excessive EndMT is a newly recognized source of PASMCs/fibroblasts during PAH progression (Good et al., 2015; Ranchoux et al., 2015). Exposure of PAECs to inflammatory mediators (Good et al., 2015; Takagi et al., 2018) or loss of BMPR2 function (Ranchoux et al., 2015) were shown to converge and promote expression of key factors such as Twist-related protein 1, Snail and Snail

family transcriptional known to dictate cell phenotypic conversion (Ranchoux et al., 2015). Using lineage tracing in genetically modified mice, Suzuki et al. (2018) provided further convincing evidence that EndMT occurs in PAH models. In addition, they demonstrated in the Sugen/hypoxia model of PAH that around 15% of PAECs lost their specific marker to gain expression of the smooth muscle cell marker  $\alpha$ SMA (Suzuki et al., 2018). In light of these studies, EndMT appears to be an important contributor to vascular remodeling in PAH and suggests that modulation of its signaling may prove useful in treating the disease, although its relative contribution/clinical impact remains to be defined.

### 2.5. Epigenetics

Although a detailed description of epigenetic modifications in PAH is beyond the scope of the present review (for a comprehensive review, see (Pullamsetti et al., 2016)), histone modification, DNA methylation and non-coding RNA production play a key role in the pathogenesis of PAH affecting virtually all pathways responsible for the cancer-like phenotype of PAH cells (Boucherat et al., 2017). Among the epigenetic changes directly contributing to PAH development and progression, it has been reported that DNA methyltransferase (DNMTs)-dependent hypermethylation of the Superoxide dismutase 2 (SOD2) enhancer/promoter regions (Archer et al., 2010) occurs in PAH patients as well as PAH rat model, leading to SOD2 gene repression, impairment of redox signaling and sustained proliferation of PASMCs. More recently, hypermethylation of the BMPR2 promoter was documented in patients with heritable PAH, which could influence the penetrance of mutation carriers (Liu et al., 2017). Apart from DNA methylation alterations, increased expression of nuclear-located Histone deacetylases (HDACs, responsible for the removal of the acetyl groups from histones, chromatin accessibility and gene silencing) and Bromodomain-containing 4 (BRD4, which binds to acetylated histones and transcription factors) was observed in lungs from PAH patients (Meloche et al., 2015b; Zhao et al., 2012). Pharmacological inhibition of HDACs or BRD4 was shown to improve PAH in different animal models (Meloche et al., 2015b; Zhao et al., 2012), highlighting the importance of epigenetic in the initiation and progression of PAH. However, concerns about cardiovascular side effects from broad-spectrum HDAC inhibitors were noted. Indeed, Bogaard et al. (2011) demonstrated that suppression of HDAC affects the adaptive response to the right ventricle (RV) to pressure overload precipitating RV failure (Bogaard et al., 2011).

Multiple studies have also demonstrated a direct link between microRNA (miRNA) dysregulation and PAH development. Indeed, miR-223 and miR-204 down-regulation in PAH-PASMCs was identified as a mechanism accounting for enhanced PARP-1 and FOXO1 expression, respectively, and thus protecting against accumulation of DNA damage (Bourgeois et al., 2018; Meloche et al., 2015a). Similarly, a reduced level of miR-34a was documented to favor PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis in targeting multiple targets such as Platelet-derived growth factor receptor alpha (Wang et al., 2016) and components of the mitochondrial fission machinery (Chen et al., 2018b). Conversely, up-regulation of miR-138 and miR-25 was reported in PAH-PASMCs contributing to reducing the expression of the mitochondrial calcium uniporter (MCU) and consequently, inhibition of glucose oxidation, enhancement of mitochondrial fission and sustained cell proliferation (Hong et al., 2017). In a therapeutic perspective, nebulized anti-miR-138 restored MCU expression and regressed established PAH in the monocrotaline rat model (Hong et al., 2017). Moreover, recent studies have identified miR-140 as a hub regulating key PAH signaling pathways (Rothman et al., 2016). Finally, the implication of long non-coding RNAs (lncRNA) represents an exciting new field of research and some of them have been pinpointed as key regulators of PAH development by regulating PASMC proliferation (Chen et al., 2018a). Although PAH epigenetics is still in its infancy, studies have already helped identify a battery of druggable targets for therapeutic

interventions. Faced to the multifactorial nature of PAH, the "one drug/multiple targets with a net favorable effect" strategy provided by epigenetic compounds may represent a promising approach.

### 3. Concluding remarks

During the last few years, the development of novel strategies aiming to regress vascular remodeling has become a top priority in PAH. As mentioned above, multiple factors have been identified in preclinical models as valid targets for anti-remodeling therapy. Despite of this, most clinical trials have afforded disappointing results. Face to this reality, dissecting the complex and multifactorial nature of PAH pathogenesis along with a better design in preclinical studies and implementation of personalized medicine are prerequisites to improve clinical outcomes in patients with PAH (Bonnet et al., 2017; Provencher et al., 2018).

### Conflict of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

### Acknowledgements

This work was supported by grants from Heart and Stroke Foundation of Canada and ATS foundation to O.B.

### References

- Archer, S.L., Marban, G., Kim, G.H., Zhang, H.J., Trif, P.T., Svensson, E.C., Dyck, J.R.R., Cornebise-Matland, M., Thibault, B., Husain, A.N., Cipriani, N., Rahman, J., 2010. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 (SOD2) in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 121 (24), 2661–2671.
- Arconiegas, E., Neves, C.Y., Carrillo, L.M., Zambana, E.A., Ramirez, R., 2005. Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 12 (4), 193–200.
- Bogaard, H.J., Mizuno, S., Hassani, A.A., Toldo, S., Abbate, A., Krakaukas, D., Kasper, M., Natarajan, R., Voelkel, N.F., 2011. Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183 (10), 1402–1410.
- Bonnet, S., Provencher, S., Guignabert, C., Perros, F., Boucherat, O., Schermuly, R.T., Hassoun, P.M., Rabinovich, M., Nicolls, M.R., Humbert, M., 2017. Translating research into improved patient care in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195 (5), 583–595.
- Boucherat, O., Vitry, G., Trif, P., Paulin, R., Provencher, S., Bonnet, S., 2017. The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* 7 (2), 285–296.
- Boucherat, O., Peterlini, T., Bourgeois, A., Nadeau, V., Breuils-Bonnat, S., Boiles-Molez, S., Pota, F., Meloche, J., Chabot, S., Lambert, C., Tremblay, E., Chae, Y.C., Ahleri, D.C., Sutendra, G., Michelakis, E.D., Paulin, R., Provencher, S., Bonnet, S., 2018. Mitochondrial HSP90 accumulation promotes vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198 (1), 90–103.
- Bourgeois, A., Lambert, C., Haboubt, K., Rancoux, B., Paquet-Marcoux, S., Trif, P., Breuils-Bonnat, S., Paradis, R., Nadeau, V., Paulin, R., Provencher, S., Bonnet, S., Boucherat, O., 2018. FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J. Mol. Med. (Berl.)* 96 (2), 223–235.
- Chen, J., Guo, J., Cai, X., Dai, Y., Tang, Z., Qiu, J., Raj, J.J.I., Hu, Q., Gao, D., 2018a. The lung zoonocoding RNA LncRPT is regulated by PDGF-BB and modulates the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 58 (2), 181–193.
- Chen, K.H., DasGupta, A., Lin, J., Pota, F., Bonnet, S., Iremonger, J., Fu, J., Mewburn, J., Wu, D., Dunham-Snary, K., Theilmann, A.L., Jing, Z.C., Hindmarch, C., Orniston, M.L., Lauer, A., Archer, S.L., 2018b. Epigenetic dysregulation of the Drp1 binding partners Mif49 and Mif51 increases mitotic mitochondrial fission and promotes pulmonary arterial hypertension: mechanistic and therapeutic implications. *Circulation* 138 (3), 287–304.
- Diebold, I., Hennig, J.R., Miyagawa, K., Li, C.G., Nickel, N.P., Raschrich, M., Can, A., Wang, L., Reddy, S., Chen, P.-L., Nakahira, K., Alcazar, M.A.A., Hopper, R.K., Ji, L., Feldman, B.J., Rabinovich, M., 2015. BMP2 preserves mitochondrial function and DNA integrity during oxygenation to promote endothelial survival and reverse pulmonary hypertension. *Cell Metab.* 21 (4), 596–608.
- Goad, R.B., Gilham, A.J., Trinder, S.L., Denton, C.P., Coghlan, G., Abraham, D.J., Holmes, A.M., 2015. Endothelial to mesenchymal transition contributes to endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Pathol.* 185 (7), 1850–1858.
- Guignabert, C., Phan, C., Seferian, A., Huertas, A., Yu, L., Thuillet, R., Sattler, C., Le Hirou, M., Tamma, Y., Jankot, E.M., Chamaus, M.C., Bouchet, S., Maneglier, B., Molimard, M., Rousselot, P., Sibon, O., Simonneau, G., Montani, D., Humbert, M., 2016. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 126 (9), 3207–3218.
- Hoeper, M.M., Barst, R.J., Bourge, R.C., Feldman, J., Frost, A.E., Galis, N., Gomez-Sanchez, M.A., Grimminger, F., Grünig, E., Hassoun, P.M., Morrell, N.W., Pearson, A.J., Satoh, T., Simonneau, G., Tapson, V.F., Torres, F., Lawrence, D., Quinn, D.A., Ghofrani, H.A., 2013. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 127 (10), 1128–1138.
- Hong, Z., Chen, K.H., DasGupta, A., Pota, F., Dunham-Snary, K., Bonnet, S., Tian, L., Fu, J., Breuils-Bonnat, S., Provencher, S., Wu, D., Mewburn, J., Orniston, M.L., Archer, S.L., 2017. MicroRNA-138 and MicroRNA-25 down-regulate mitochondrial calcium uniporter, causing the pulmonary arterial hypertension cancer phenotype. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 195 (4), 515–526.
- Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sibon, O., Poitier, A., Grangest-Kern, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., Emile, D., 1995. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 151 (5), 1628–1631.
- Kang, R.H., Pleacia, J., Song, H.Y., Miki, M., Colombo, G., Beebe, K., Scroggins, B., Neckers, L., Altieri, D.C., 2009. Combinatorial drug design targeting multiple cancer signaling networks controlled by mitochondrial Hsp90. *J. Clin. Invest.* 119 (3), 454–464.
- Kuebler, W.M., Bonnet, S., Tabuchi, A., 2018. Inflammation and autoimmunity in pulmonary hypertension: is there a role for endothelial adhesion molecules? (2017 grover Conference series). *Pulm. Circ.* 8 (2), 2045893218757596.
- Lapin, A.C., Latzinger, G., Lega, J.C., Lacasse, Y., Martin, S., Simard, S., Bonnet, S., Provencher, S., 2016. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir. Med.* 4 (4), 291–305.
- Lau, E.M.T., Gianoulakis, E., Celermajer, D.S., Humbert, M., 2017. Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* 14 (10), 603–614.
- Li, M., Vattulainen, S., Aho, J., Orchołski, M., Rojas, V., Yuan, K., Helenius, M., Taimen, P., Myllykangas, S., De Jesus Perez, V., Koskenvuo, J.W., Alatalo, T.P., 2014. Loss of bone morphogenetic protein receptor 2 is associated with abnormal DNA repair in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 50 (6), 1118–1128.
- Liu, D., Yan, Y., Chen, J.W., Yuan, P., Wang, X.J., Jiang, B., Wang, L., Zhao, Q.H., Wu, W.H., Simonneau, G., Qu, J.M., Jing, Z.C., 2017. Hypermethylation of BMP2 promoter occurs in patients with heritable pulmonary arterial hypertension and inhibits BMP2 expression. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 196 (7), 925–928.
- Meloche, J., Pflieger, A., Vaillancourt, M., Paulin, R., Pota, F., Zervopoulos, S., Graydon, C., Courbequin, A., Breuils-Bonnat, S., Tremblay, E., Couture, C., Michelakis, E.D., Provencher, S., Bonnet, S., 2014. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 129 (7), 786–797.
- Meloche, J., Le Guen, M., Pota, F., Vinck, J., Rancoux, B., Johnson, I., Antigny, F., Tremblay, E., Breuils-Bonnat, S., Perros, F., Provencher, S., Bonnet, S., 2015a. miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 309 (6), C263–C272.
- Meloche, J., Pota, F., Vaillancourt, M., Bourgeois, A., Johnson, I., Deschamps, L., Chabot, S., Ruffenach, G., Henry, S., Breuils-Bonnat, S., Tremblay, E., Nadeau, V., Lambert, C., Paradis, R., Provencher, S., Bonnet, S., 2015b. Bone-morphin-containing protein 4: the epigenetic origin of pulmonary arterial hypertension. *Circ. Res.* 117 (6), 525–535.
- Michelakis, E.D., Gupta, V., Webster, L., Barnes, G., Watson, C., Howard, L., Capitt, J., Peterson, I., Thompson, H.B., Chw, K., O'Keefe, D.P., Zhao, L., Wharton, J., Kiely, D.G., Kinnaird, A., Boulos, A.E., White, C., Nagendran, J., Freed, D.H., Wort, S.J., Gibbs, J.S.R., Wilkins, M.B., 2017. Inhibition of pyruvate dehydrogenase kinase improves pulmonary arterial hypertension in genetically susceptible patients. *Sci. Transl. Med.* 9 (413).
- Provencher, S., Archer, S.L., Ramirez, F.D., Hibbert, B., Paulin, R., Boucherat, O., Lacasse, Y., Bonnet, S., 2018. Standards and methodological rigor in pulmonary arterial hypertension preclinical and translational research. *Circ. Res.* 122 (7), 1021–1032.
- Pullamsetti, S.S., Perros, F., Chelladurai, P., Yuan, J., Sturmberg, K., 2016. Transcription factors, transcriptional co-regulators, and epigenetic modulation in the control of pulmonary vascular cell phenotype: therapeutic implications for pulmonary hypertension (2015 Grover Conference series). *Pulm. Circ.* 6 (4), 448–464.
- Pullamsetti, S.S., Kejmanovic, B., Stern, S., Gall, H., Salazar, Y., Wolf, J., Weigert, A., El-Nikhely, N., Ghofrani, H.A., Kronbach, G.A., Fink, L., Gatterlöhner, S., Bapp, U.R., Schermuly, R.T., Grimminger, F., Seeger, W., Savai, R., 2017. Lung cancer-associated pulmonary hypertension: role of microenvironmental inflammation based on tumor cell-immune cell cross-talk. *Sci. Transl. Med.* 9 (416).
- Rancoux, B., Antigny, F., Rucker-Martin, C., Hautefort, A., Pichoux, C., Begaud, H.J., Doerflinger, P., Bemy, S., Lecarf, F., Plante, S., Chat, S., Fadel, E., Hrazsimina, A., Anegón, I., Adnot, S., Simonneau, G., Humbert, M., Cohen-Kaminsky, S., Perros, F., 2015. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation* 131 (11), 1006–1018.
- Rothman, A.M., Arnold, N.D., Pickworth, J.A., Iremonger, J., Cianlan, L., Allen, R.M., Guth-Gundel, S., Southwood, M., Morrell, N.W., Thomas, M., Francis, S.E., Rowlands, D.J., Lawrie, A., 2016. MicroRNA-140-5p and SMLRF1 regulate pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 126 (7), 2495–2508.
- Ryan, J.J., Archer, S.L., 2015. Emerging concepts in the molecular basis of pulmonary arterial hypertension (PAH): part I: metabolic plasticity and mitochondrial dynamics in the pulmonary circulation and right ventricle in PAH. *Circulation* 131 (19), 1691–1702.
- Schermuly, R.T., Doey, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., Grimminger, F., 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115 (10), 2811–2821.
- Soon, E., Holmes, A.M., Treacy, C.M., Doughty, N.J., Southgate, L., Machado, R.D., Tremblay, R.C., Jennings, S., Barker, L., Nicklin, P., Walker, C., Budd, D.C., Pepke-Zaba, J., Morrell, N.W., 2010. Elevated levels of inflammatory cytokines predict

- survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 122 (9), 920–927.
- Steiner, M.K., Sytkina, O.L., Kolliputi, N., Mark, E.J., Hales, C.A., Waxman, A.B., 2009. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ. Res.* 104 (2), 236.
- Suzuki, T., Carrier, E.J., Talati, M.H., Rathinasabapathy, A., Chen, X., Nishimura, R., Tada, Y., Tatsumi, K., West, J., 2018. Isolation and characterization of endothelial-to-mesenchymal transition cells in pulmonary arterial hypertension. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 314 (1), L1178–L126.
- Takagi, K., Yamakuchi, M., Matsuyama, T., Kondo, K., Uchida, A., Minono, S., Haseguchi, T., Inoue, H., 2018. IL-13 enhances mesenchymal transition of pulmonary artery endothelial cells via down-regulation of miR-424/503 in vitro. *Cell. Signal.* 42, 270–280.
- Tamura, Y., Phan, C., Yu, L., Le Hirsa, M., Thuillet, R., Jutant, E.M., Fadel, E., Savale, L., Haerias, A., Humbert, M., Guignabert, C., 2018. Ectopic upregulation of membrane-bound IL6R drives vascular remodeling in pulmonary arterial hypertension. *J. Clin. Invest.* 128 (5), 1956–1970.
- Wang, P., Xu, J., Hou, Z., Wang, F., Song, Y., Wang, J., Zhu, H., Jin, H., 2016. miRNA-34a promotes proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells by targeting PDGFRA. *Cell Prolif.* 49 (4), 484–493.
- Zhao, L., Chen, C.-N., Hajji, N., Oliver, E., Cotocaru, E., Wharton, J., Wang, D., Li, M., McKinsey, T.A., Stermark, K.H., Wilkins, M.R., 2012. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid (VPA) and siberyllamide hydroxamic acid (SAHA). *Circulation* 126 (4), 455–467.

## **Annexe VI.**

Publié dans J Mol Med (Berl). 2018 Feb;96(2):223-235.

**FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension.**

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



## FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension

Alice Bourgeois<sup>1</sup> · Caroline Lambert<sup>1</sup> · Karima Habbout<sup>1</sup> · Benoit Ranchoux<sup>1</sup> · Stéphanie Paquet-Marceau<sup>1</sup> · Isabelle Trinh<sup>1</sup> · Sandra Breuils-Bonnet<sup>1</sup> · Renée Paradis<sup>1</sup> · Valérie Nadeau<sup>1</sup> · Roxane Paulin<sup>1,2</sup> · Steeve Provencher<sup>1,2</sup> · Sébastien Bonnet<sup>1,2</sup> · Olivier Boucherat<sup>1,2,3</sup>

Received: 4 October 2017 / Revised: 16 November 2017 / Accepted: 20 December 2017  
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2017

### Abstract

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

### Key messages

- FOXM1 is overexpressed in human PAH-PASMCs and PAH animal models.
- FOXM1 promotes PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis.
- Pharmacological inhibition of FOXM1 improves established PAH in the MCT and Su/Hx rat models.
- FOXM1 may be a novel therapeutic target in PAH.

**Keywords** Vascular remodeling · Proliferation · Apoptosis · Vascular smooth muscle · Pulmonary artery

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00109-017-1619-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Olivier Boucherat  
olivierboucherat@criucpq.ulaval.ca

<sup>1</sup> Pulmonary Hypertension Research Group, Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, QC, Québec, Canada

<sup>2</sup> Department of Medicine, Université Laval, QC, Québec, Canada

<sup>3</sup> Pulmonary Hypertension Research Group, IUCPQ Research Centre, 2725, chemin Sainte-Foy, QC, Québec G1V 4G5, Canada

### Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex disease characterized by a progressive narrowing of the distal pulmonary arteries (PAs) due to vasoconstriction and vascular remodeling. These structural abnormalities are accompanied by a marked and sustained elevation of pulmonary vascular resistance leading to right heart failure and death [1]. Although significant progress has been made in the understanding of PAH, current therapies that mainly focus on vasoconstriction fail to reverse the

disease and only offer a modest benefit in both mortality and morbidity [2]. Therefore, the identification and characterization of new therapeutic targets is a pressing need. Accumulated evidence shows that the hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) is a key component of the aberrant vascular remodeling in PAH [3]. Although PAH is not a cancer, the similarities between these two disorders suggest that lessons learned from cancer may provide important insights into PAH pathogenesis and thus open new therapeutic avenues [3].

Forkhead box M1 (FOXM1) is a transcription factor known to positively regulate the expression of genes essential for DNA repair, cell cycle progression, and cell survival, all of which being important features of PAH [3–5]. In mice, conditional deletion of *Foxm1* targeted to smooth muscle cells caused postnatal lethality due to severe pulmonary hemorrhage in the absence of structural heart abnormalities [6]. Histological examinations revealed that FOXM1 promotes pulmonary vascular development by directly stimulating proliferation of developing smooth muscle cells [6], suggesting that this pathway driving proliferation during normal development could be reawakened in adult vascular diseases characterized by aberrant proliferation such as PAH. Moreover, FOXM1 was repeatedly found to be overexpressed in many types of human cancer [7], its expression correlating with tumor progression and patient survival [8]. Although transcription factors are usually considered as difficult to target, the druggability of FOXM1 was illustrated by several studies showing that the natural product thiostrepton physically interacts with FOXM1 [9] and potentially affects FOXM1 transcriptional activity [9–11]. Consistently, expression of a constitutive active FOXM1 was documented to circumvent the antiproliferative effects of thiostrepton in cancer cells [12]. More importantly, inhibition of FOXM1 resulted in a significant reduction in tumorigenic potential in cancer preclinical models [13, 14], further highlighting the critical importance of FOXM1 in promoting cell proliferation.

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

## Materials and methods

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

## Human tissue samples

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

## Animal studies

All animal protocols were approved by the IUCPQ-UL Biosafety and Ethics Committees. All experiments were in accordance with recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH [16], including animal randomization, sequence allocation concealment, and blinded assessments. Two clinically relevant animal models were used. Two hundred fifty to 350 g male Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories) were injected subcutaneously with 60 mg/kg of monocrotaline (MCT) (Sigma) or single subcutaneous injection (20 mg/kg) of Sugen (Sigma) and then exposed to 3 weeks of normobaric hypoxia (10% O<sub>2</sub>) (Su/Hx model). Once PAH was established 2 and 5 weeks post MCT and Sugen injections, respectively, rats were randomly allocated to receive the FOXM1 inhibitor thiostrepton (10 mg/kg) or its vehicle intraperitoneally administered every day for 2 weeks. Thiostrepton is an FDA-approved macrocyclic thiopeptide antibiotic known to reduce the transcriptional activity and expression of FOXM1 [9–11]. A control (no PAH group) was also monitored.

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

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

### Cell culture and treatments

PAH-PAECs ( $n = 3$  cell lines) and PAH-PASMCs ( $n = 11$  cell lines) were isolated from small PAs ( $< 1000\text{-}\mu\text{m}$  diameter) from PAH patients. Control PAECs ( $n = 3$  cell lines) and PASMCs ( $n = 9$  cell lines) were either purchased from Cell Application or isolated from non-PAH patients. Cells were used at passages 5 to 9 for experiments. As previously published [18], purchased and isolated control PASMCs exhibited the same behavior. PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic/antimycotic (Thermo Fisher Scientific). The purity of PASMCs and PAECs was determined by immunostaining with smooth muscle-specific actin and CD31 antibodies, respectively. Thiostrepton (Santa Cruz Biotechnology) and mirin (Focus Biomolecules) were dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a stock solution of 10 and 100 mM, respectively, and then added to the culture medium immediately before use. The implication of miR-204 in FOXM1 regulation was assessed using miRIDAN miR-204 mimic (200 nM for 48 h) (Thermo Fisher Scientific) and antagomiR-204 (hairpin inhibitor, 200 nM for 48 h) (Thermo Fisher Scientific). For each experiment, a proper control (mimics or hairpin inhibitor negative control from Thermo Fisher Scientific) was used. siFOXMI (#L-009762-00) and scrambled control siRNA (Dharmacon) were transfected at a final concentration of 50 nM with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific).

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

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

### Statistical analysis

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

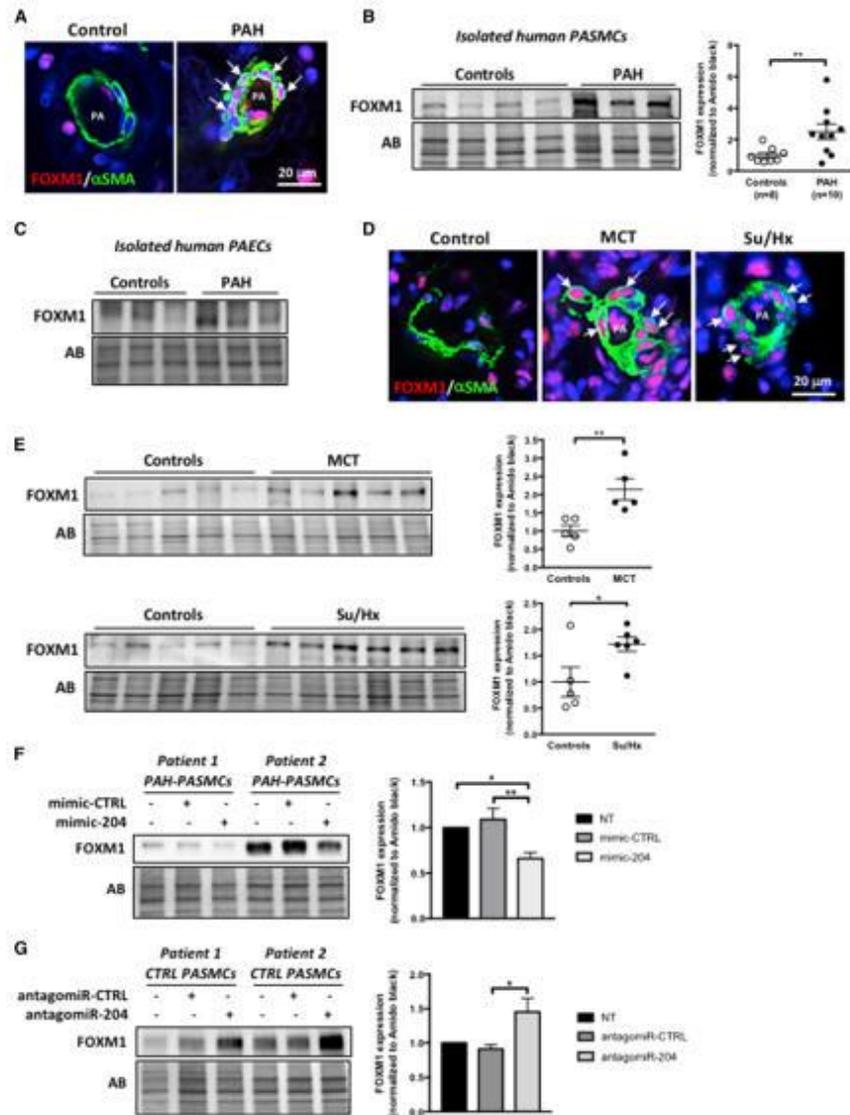
### Results

#### FOXM1 expression is upregulated in human PAH and experimental models

We first performed double immunofluorescence for FOXM1 and alpha smooth muscle actin ( $\alpha$ SMA, a marker of smooth muscle cells) on lung tissue sections from control and PAH patients. In situ analyses revealed a strong FOXM1 nuclear staining in the media of remodeled distal PAs from PAH patients compared to control subjects (Fig. 1a). To validate this result, we measured its expression level by Western blot in PASMCs isolated from PAH patients and control subjects. In agreement with our in situ result, we found that FOXM1 is significantly overexpressed in PAH-PASMCs ( $> 2$ -fold, Fig. 1b) compared to controls. No significant difference was detected between control and PAH-PAECs (Fig. 1c). We next determined the relative expression of the four FOXM1 isoforms in control and PAH-PASMCs. Only the FOXM1a, b, and c were detectable by real-time qPCR. We found that the three FOXM1 isoforms were upregulated in PAH-PASMCs compared to control cells and that the FOXM1 transcript that was predominantly expressed in PAH-PASMCs was the transcriptionally active isoform FOXM1c (Fig. S1). As described in human tissues and cells, the upregulation of FOXM1 expression was also observed by immunofluorescence (Fig. 1d) and Western blot (Fig. 1e) in distal PAs from MCT and SuHx-induced PAH rat models compared to their respective controls. Altogether, our results indicate that FOXM1 overexpression is a common denominator of human and experimental PAH.

#### miR-204 regulates FOXM1 expression in PAH-PASMCs

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



**Pharmacological and molecular inhibition of FOXM1 reduces PAH-PASMC proliferation and survival**

Because FOXM1 is considered as a proto-oncogene promoting cell proliferation and protecting cells from apoptosis, we investigated whether FOXM1 inhibition can rescue the

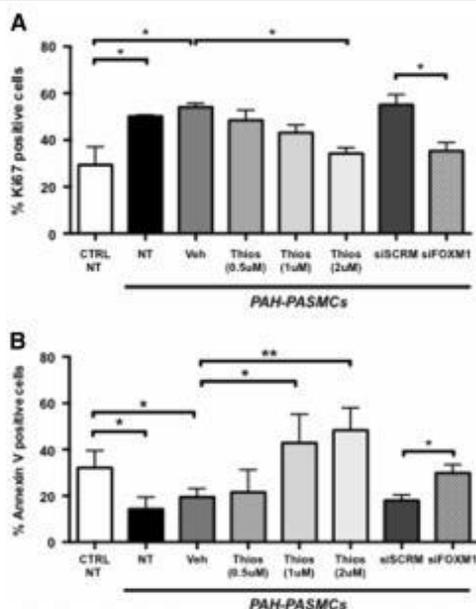
abnormal phenotype of PAH-PASMCs *in vitro*. To this end, PAH-PASMCs were exposed to escalating doses of thiostrepton. Consistent with the fact that FOXM1 positively autoregulates its own expression [21], treatment with thiostrepton in PAH-PASMCs caused a marked downregulation of FOXM1 expression and resulted in a significant

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

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

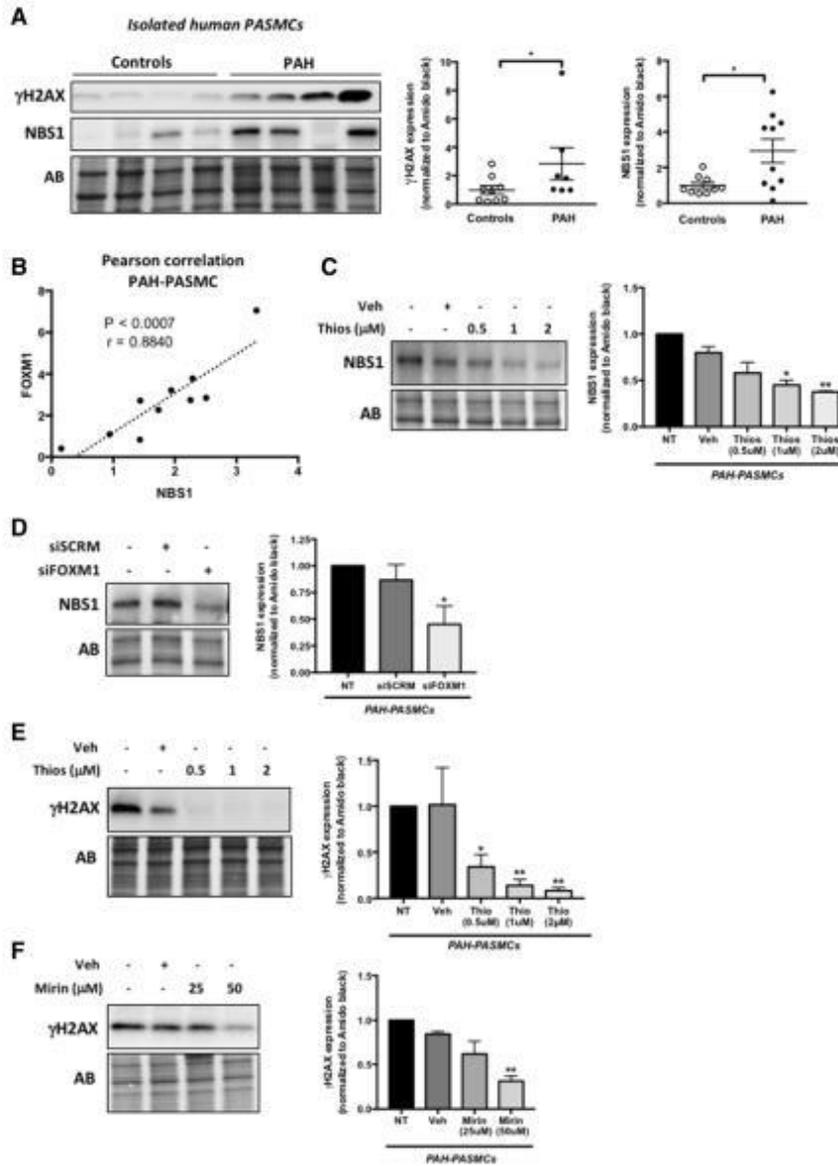
#### FOXM1 inhibition reduces DNA repair pathways and survivin expression

During disease progression, sustained activation of the DNA repair machinery was identified as an adaptive response used by PAH-PASMCs to face stress, allowing them to survive and hyperproliferate [4]. Interestingly, accumulated evidence indicates that enhanced FOXM1 expression confers resistance to DNA damage by stimulating the transcriptional network of genes involved in DNA repair [5]. Among them, FOXM1 was demonstrated to positively regulate expression of Nijmegen breakage syndrome 1 (NBS1) [22], a member of the tri-protein complex called MRN (MRE11-RAD50-NBS1) sensing DNA lesions and initiating the DNA damage response networks by supporting activation of ataxia-telangiectasis mutated [23, 24]. We thus investigated whether FOXM1 contributes to the enhanced DNA repair capacity of PAH-PASMCs by stimulating NBS1 expression. As previously observed [4],



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

we confirmed that PAH-PASMCs manifest a more pronounced activated DNA damage signaling as revealed by elevated endogenous  $\gamma$ H2AX expression (Fig. 3a) and demonstrated that NBS1 is overexpressed in these cells compared to their normal counterparts (Fig. 3a). A significant positive correlation was found between the expression of FOXM1 and NBS1 in PAH-PASMCs (Fig. 3b). Interestingly, NBS1 upregulation in isolated PAH-PASMCs was accompanied by an increase in MRE11, whereas no change was observed for RAD50 (Fig. S4a). High levels of NBS1 were also detected in distal PAs of MCT- and Su/Hx-challenged animals. Consistent with the above results in human PAH-PASMCs, a significant positive correlation was found between FOXM1 and NBS1 expression in both models (Fig. S4). More importantly, pharmacological or molecular inhibition of FOXM1 in PAH-PASMCs caused a marked downregulation in NBS1 expression (Fig. 3c, d), supporting the direct relationship between these two factors. As a consequence, thiostrepton-treated PAH-PASMCs exhibited reduced activation of DNA damage signaling (Fig. 3e). Accordingly, the effects of



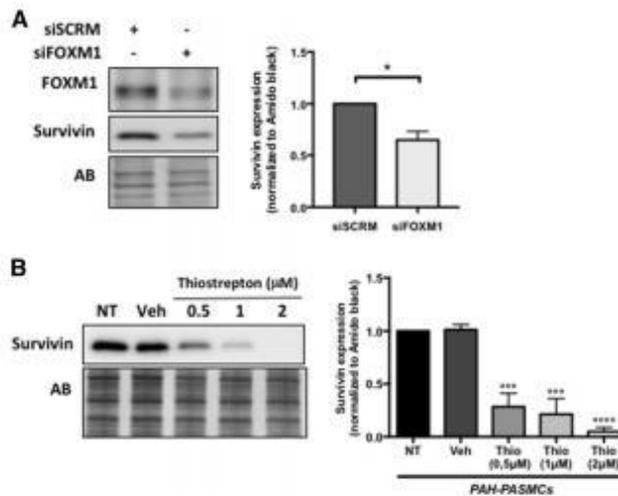
FOXM1 inhibition on DNA damage signaling, cell proliferation, and resistance to apoptosis were recapitulated by treatment with mirin, a small molecular inhibitor of the MRN complex [24] (Figs. 3f and S5). Taken together, our results

extend prior research showing that an enhanced DNA damage signaling contributes to exaggerated PAH-PASMC survival and proliferation and identify FOXM1 as a key player in DNA repair capacity.

**Fig. 3** Inhibition of FOXM1 impairs DNA repair in PAH-PASMCs. **a** Representative Western blots and corresponding densitometric analysis showing activation of the DNA damage signaling ( $\gamma$ H2AX) as well as increased expression of NBS1 in isolated PAH-PASMCs ( $n = 6-10$ ) compared to control cells ( $n = 9$ ). **b** Analysis based on the Pearson's correlation coefficient indicates the positive correlation between FOXM1 and NBS1 protein expression in isolated PAH-PASMCs. **c** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating that thiostrepton reduces NBS1 expression in PAH-PASMCs. **d** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis demonstrating that knockdown of FOXM1 using siFOXM1 reduces NBS1 expression in PAH-PASMCs. **e** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing that thiostrepton reduces activation of DNA repair signaling in PAH-PASMCs. **f** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing that pharmacological inhibition of the MRN complex using mirin reduces activation of DNA repair signaling in PAH-PASMCs. Protein expression was normalized by Amido black (AB). \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ . Experiments were performed in at least four different PAH-PASMC cell lines

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

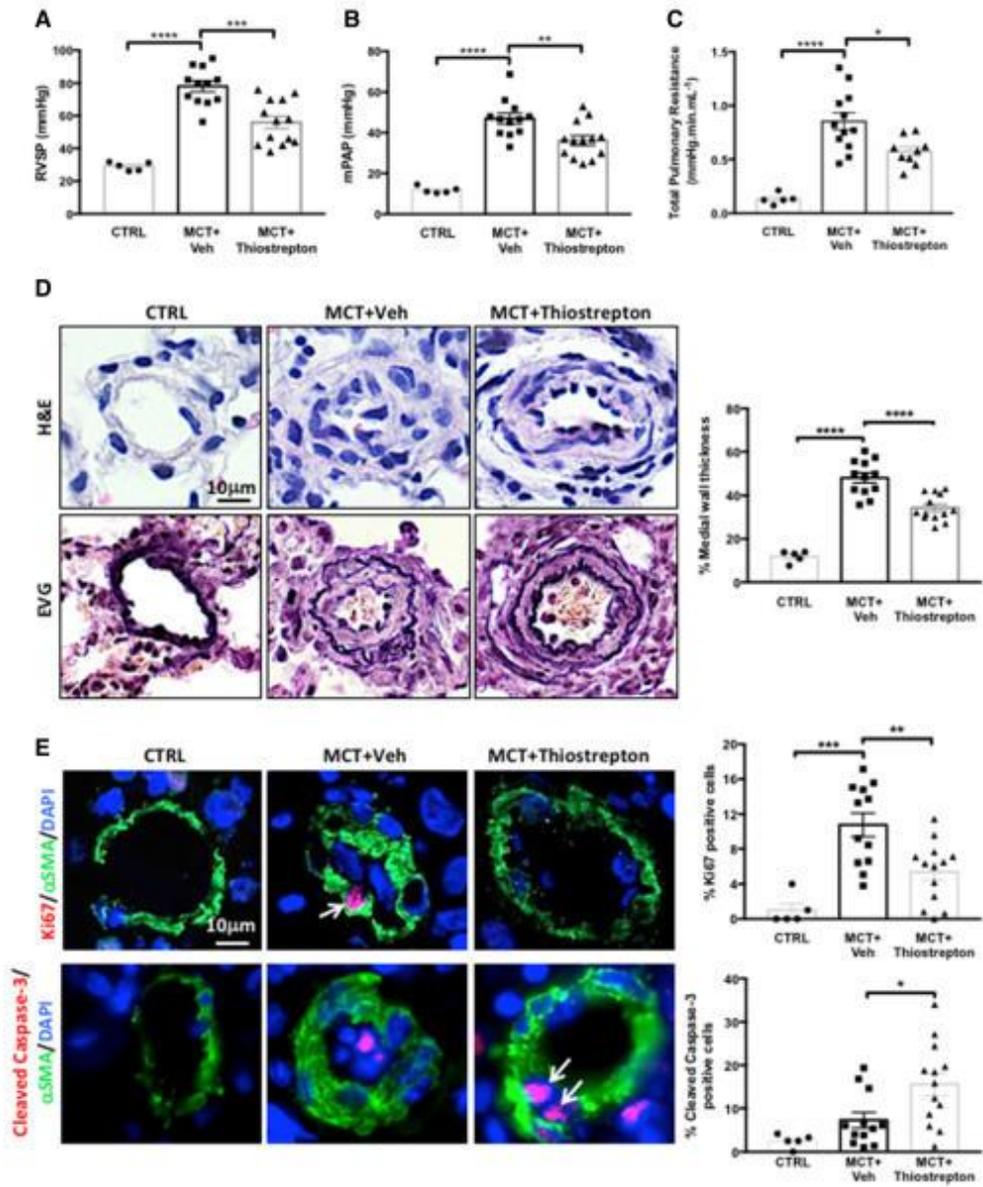
**Fig. 4** Inhibition of FOXM1 in PAH-PASMCs reduces survivin expression. **a** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing decreased expression of survivin in PAH-PASMCs ( $n = 4$  different cell lines) treated with siFOXM1 (50 nM) for 48 h. **b** Representative Western blot and corresponding densitometric analysis showing reduced survivin expression levels in PAH-PASMCs ( $n = 4$  different cell lines) exposed to thiostrepton for 48 h. Protein expression was normalized by Amido black (AB). \* $P < 0.05$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$  (compared to siSCR or Veh)



Springer

### Thiostrepton reverses pulmonary hypertension in the monocrotaline rat model

Because FOXM1 inhibition corrects the abnormal phenotype of PAH-PASMCs in vitro, we tested whether thiostrepton can reverse established PAH in the MCT rat model. Treatment with thiostrepton in MCT rats markedly reduced expression levels of FOXM1 target genes NBS1 and survivin, indicating effective inhibition of FOXM1 by thiostrepton (Fig. S6a). While vehicle-treated rats showed severe PAH, treatment with thiostrepton for 2 weeks significantly improved RVSP and mean mPAP in MCT rats (Fig. 5a, b), as assessed by right heart catheterization, whereas cardiac output was slightly but not significantly improved. Heart rate did not significantly change between groups (Fig. S6). As a result, thiostrepton significantly diminished total pulmonary resistance (TPR) as compared to vehicle-treated rats (Figs. 5c and S6). RV hypertrophy calculated by Fulton index showed a trend towards a decrease in the thiostrepton group (Fig. S6). As expected, vehicle-treated MCT animals exhibited marked increase in the wall thickness of distal PAs, which was significantly diminished by thiostrepton (Fig. 5d), suggesting that the improvement of the hemodynamic parameters was due to reduced vascular remodeling of distal PAs. Consistent with this finding, the proportion of Ki67-positive proliferating vascular cells was reduced by thiostrepton (Fig. 5e), whereas a significant increase in apoptotic cell death was observed in distal PAs (Fig. 5e).



**Fig. 5** Thiostrepton improves established PAH in the monocrotaline (MCT) rat model. **a–c** RVSP (a), mPAP (b), and TPR (c) were measured in control, MCT + Veh, and MCT + thiostrepton (10 mg/kg/day). Thiostrepton significantly reduces hemodynamic parameters. **d** Representative images of perfused, formalin-fixed lung tissues stained with hematoxylin/eosin (H&E) or Elastica van Gieson (EVG). The morphometric analysis of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness using EVG stain is shown. Thiostrepton significantly reduces vascular remodeling of distal PAs. **e** Representative images of distal pulmonary vessels labeled with Ki67 (top) and cleaved caspase-3 (bottom) in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using  $\alpha$ SMA (green). Graphs represent the percentage of cells positive for Ki67 or cleaved caspase-3 in distal pulmonary vessels;  $n = 5$  to 13 rats/group (mean of 20 vessels/rat). Arrows mark positive PASMCs. \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$

### Thiostrepton improves pulmonary hypertension in the Sugen/hypoxia rat model

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

### Discussion

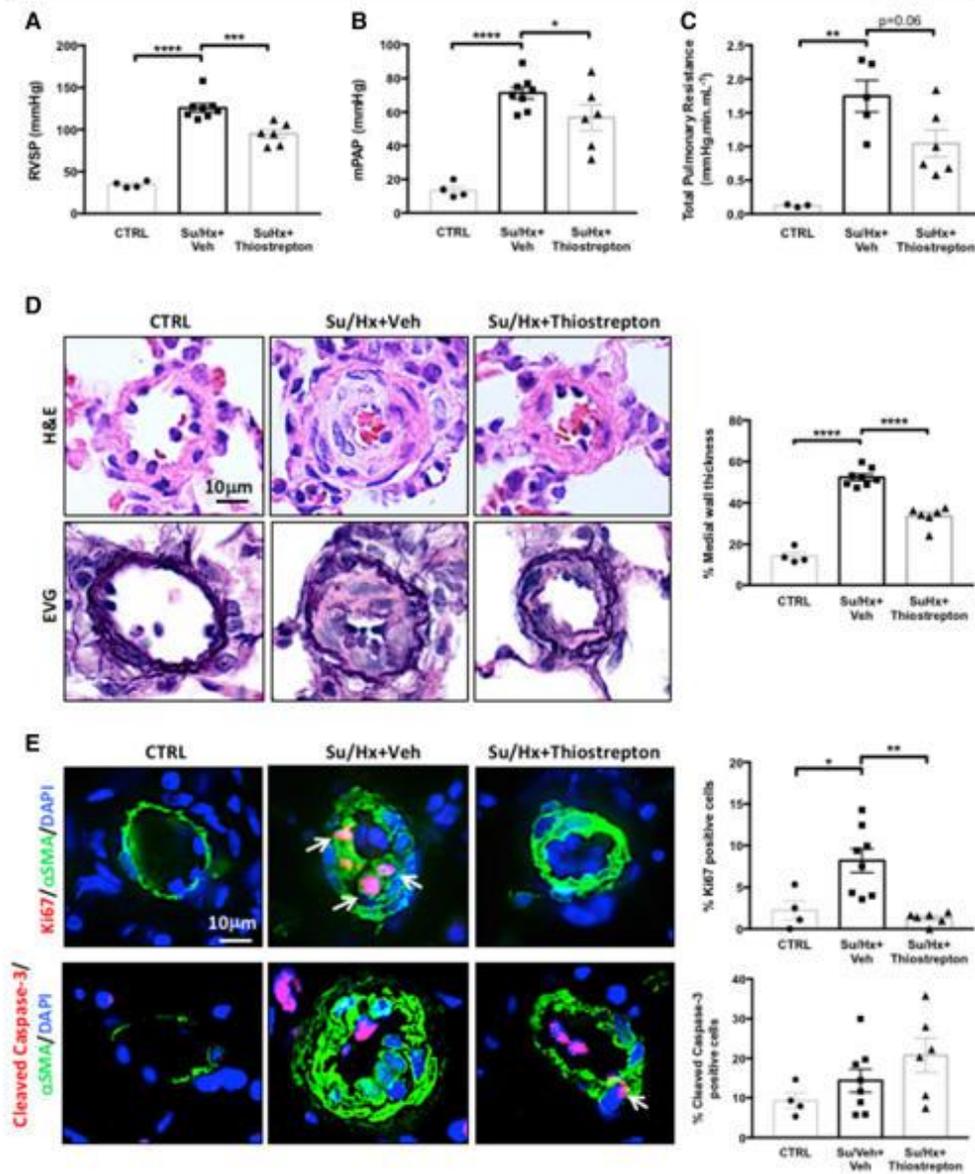
In the present study, we showed that FOXM1 is overexpressed in PASMCs from PAH patients as well as in two animal models of PAH and established FOXM1 as a molecular driver of PASMC proliferation and resistance to apoptosis. Importantly, we demonstrated that pharmacological inhibition of FOXM1 transcriptional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

There is mounting evidence that epigenetic alterations are involved in PAH [29]. We demonstrated here that FOXM1 abundance in PAH-PASMCs is regulated, at least in part, through miR-204 downregulation, previously shown to be etiologically implicated in PAH and accounting for the cancer-like phenotype of PAH-PASMCs [20]. In addition to miR-204, the regulation of FOXM1 expression in cancer cells has been attributed to a myriad of factors. Among them, two other members of the forkhead box family, namely FOXO1

and FOXO3, have been shown to antagonize FOXM1-dependent transcription by repressing FOXM1 transcription [30, 31]. Indeed, in response to growth factors like PDGF or IGF1, which are elevated in PAH patients [32], Akt was found to be activated, leading to the phosphorylation and nuclear exclusion of FOXOs and thus upregulation of FOXM1 [30]. Because FOXO1 and FOXO3 are downregulated in PAH-PASMCs contributing to vascular remodeling [32], it can be speculated that the reversal of vascular remodeling observed in preclinical animal models of PAH secondary to FOXO1 reconstitution could be due to the inhibition of FOXM1 activity. In addition to FOXOs, FOXM1 was identified as a direct target of hypoxia-inducible factors [33, 34] that play a pivotal role in PAH [35, 36]. Notably, it was reported that under hypoxic conditions, FOXM1 promoter activity and mRNA expression are induced in control human PASMCs and that FOXM1 is necessary for hypoxia-induced PASMC proliferation [34]. Interestingly, several pro-hypertensive factors including hypoxia have been shown to reduce miR-204 expression in PASMCs [20]. Published data combined to our finding suggest that FOXM1 is a downstream target of multiple signaling pathways and that its overexpression in PAH-PASMCs results from a coordinated transcriptional and post-transcriptional regulation. In light of these results, further studies are warranted to fully dissect the mechanisms involved in FOXM1 upregulation in PAH cells.

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

Importantly, we provide evidence that inhibition of DNA damage repair mechanisms through downregulation of the DNA damage sensor protein NBS1 combined to repression of the antiapoptotic and pro-proliferative factor survivin contributes to the beneficial effects of FOXM1 inhibition on PAH-PASMCs. We previously demonstrated that PASMCs from PAH patients display increased expression of the DNA repair enzyme PARP-1 in comparison with control subjects allowing cells to survive [4]. We show here that FOXM1 plays a pivotal role in promoting the DNA repair processes by



stimulating expression of NBS1, one of the three proteins of the MRN complex involved in the initial processing of DNA damage. Consistent with this, we found that expression levels of NBS1 along with MRE11 are strongly overexpressed in

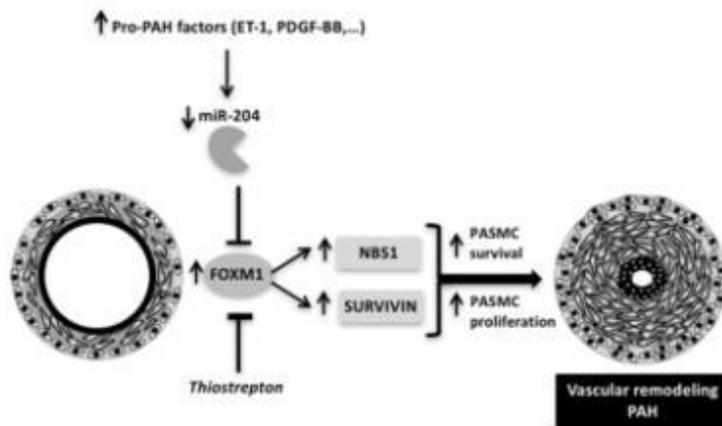
PAH-PASMCs and that pharmacological inhibition of the MRN complex mimics FOXM1 inhibition leading to reduced activation of the DNA repair factor H2AX required for the assembly of DNA repair proteins [39]. This suggests that

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

inhibition of FOXM1 disrupts the integrity of the MRN complex precluding efficient DNA repair required to sustain proliferation and survival of PAH-PASMCs. Interestingly, FOXM1 has been documented to directly enhance the expression of multiple genes involved in metabolic reprogramming towards glycolysis and cell cycle progression, such as GLUT1 [40], HK2 [40], cyclin D1 [41], and STAT3 [42], also implicated in PAH progression [28, 35, 43]. Moreover, studies revealed that FOXM1 interacts and promotes activity of NF- $\kappa$ B [44] and  $\beta$ -catenin [45], two transcription factors affecting numerous mechanisms involved in PAH progression including stress response, cell proliferation, and survival as well as immune response [46, 47]. Therefore, considering the large number of genes influenced by FOXM1 overexpression and described as being implicated in the multi-faceted disease process in PAH, it can be assumed that the beneficial effects of

FOXM1 inhibition observed both in vitro and in vivo are likely the result of a cumulative effect on numerous target pathways.

**Limitations** Transcription factors are traditionally considered as difficult to target. Although thiostrepton was identified as a chemical inhibitor of FOXM1 transcriptional activity, some studies demonstrated that the compound interferes with the proteasome. Therefore, we cannot formally rule out the possibility that some of our in vitro and in vivo effects may be due to an off-target mechanism. Nevertheless, our findings showing that molecular inhibition of FOXM1 recapitulates those obtained after treatment of thiostrepton support the notion that the primary consequence of thiostrepton is due to its effects on FOXM1. It must be underlined that, although the current study was designed to examine the role of FOXM1 in PAH-PASMCs, its possible implication in other cell types (including adventitial fibroblasts and inflammatory cells) also involved in the pathological remodeling of distal PAs remains to be addressed. For instance, deletion of FOXM1 in macrophages was documented to reduce their proliferation in injured lungs and to downregulate the expression levels of multiple inflammatory mediators such as IL-6 and CX3CL1 [48]. Because IL-6 and CXCL3 are key drivers of PAH pathogenesis [49], it can be speculated that the beneficial effects of thiostrepton in our animal models also result from attenuated perivascular inflammation. Further studies are required to clarify this issue. Moreover, despite the fact that thiostrepton significantly improved established PAH in MCT- and Su/Hx-challenged rats by reducing hemodynamic parameters



**Fig. 7** Proposed model depicting the molecular mechanisms by which FOXM1 promotes PASC expansion and vascular remodeling in PAH. Pro-PAH factors reduce miR-204 expression in PAH-PASMCs leading to FOXM1 upregulation. Increased FOXM1 expression in PSMCs stimulates the expression of several factors,

including NBS1 and survivin, enhancing cell proliferation and resistance to apoptosis and thus vascular remodeling in PAH. Inhibition of FOXM1 transcriptional activity using thiostrepton improved established PAH. ET1 endothelin 1, NBS1 Nijmegen breakage syndrome 1, PDGF-BB platelet-derived growth factor-BB

(RVSP and mPAP), RV hypertrophy was unchanged. The lack of significant cardiac improvement may be due to insufficient treatment duration or, alternatively, to adverse effects of FOXM1 inhibition in the heart. However, this prospect seems unlikely because postnatal ablation of *Foxm1* in cardiomyocytes does neither alter cardiac morphology or function in injured mice nor exacerbate cardiac hypertrophy of fibrosis following chronic pressure overload [50].

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

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

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

#### References

- Lan EMT, Giannoulitou E, Celermajer DS, Humbert M (2017) Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 14(10):603–614
- Lajoie AC, Lauziere G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S (2016) Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir Med* 4(4):291–305
- Boucherat O, Vitry G, Trinh I, Paulin R, Provencher S, Bonnet S (2017) The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ* 7(2):285–299
- Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulin A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E et al (2014) Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 129(7):786–797
- Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EW (2014, 1839) FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta*: 1316–1322. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.09.016>
- Ustiyon V, Wang IC, Ren X, Zhang Y, Snyder J, Xu Y, Wert SE, Lessard JL, Kalin TV, Kalinichenko VV (2009) Forkhead box M1 transcriptional factor is required for smooth muscle cells during embryonic development of blood vessels and esophagus. *Dev Biol* 336(2):266–279
- Gartel AL (2017) FOXM1 in cancer: interactions and vulnerabilities. *Cancer Res* 77(12):3135–3139
- Li L, Wu D, Yu Q, Li L, Wu P (2017) Prognostic value of FOXM1 in solid tumors: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 8:32298–32308
- Hegde NS, Sanders DA, Rodriguez R, Balasubramanian S (2011) The transcription factor FOXM1 is a cellular target of the natural product thiothrepton. *Nat Chem* 3(9):725–731
- Bhat UG, Halasi M, Gartel AL (2009) Thiazole antibiotics target FoxM1 and induce apoptosis in human cancer cells. *PLoS One* 4(5):e5592
- Kwok JM, Myatt SS, Marson CM, Coombes RC, Constantinidou D, Lam EW (2008) Thiothrepton selectively targets breast cancer cells through inhibition of forkhead box M1 expression. *Mol Cancer Ther* 7(7):2022–2032
- Kwok JM, Peck B, Monteiro LJ, Schwenen HD, Millour J, Coombes RC, Myatt SS, Lam EW (2010) FOXM1 confers acquired cisplatin resistance in breast cancer cells. *Mol Cancer Res* 8(1):24–34
- Buchner M, Park E, Geng H, Klemm L, Flach J, Passegué E, Schjervén H, Melnick A, Paietta E, Kopanja D et al (2015) Identification of FOXM1 as a therapeutic target in B-cell lineage acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun* 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7471>
- Wang IC, Ustiyon V, Zhang Y, Cai Y, Kalin TV, Kalinichenko VV (2014) Foxm1 transcription factor is required for the initiation of lung tumorigenesis by oncogenic Kras(G12D). *Oncogene* 33(46):5391–5396
- Galie N, Humbert M, Vachiery JL, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M et al (2015) 2015 ESC/ERS guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS); endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Respir J* 46(4):903–975
- Bonnet S, Provencher S, Guignabert C, Perros F, Boucherat O, Schermuly RT, Hassoun PM, Rabinovitch M, Nicolls MR, Humbert M (2017) Translating research into improved patient care in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 195(5):583–595
- Boucherat O, Chabot S, Paulin R, Trinh I, Bourgeois A, Potus F, Lampron MC, Lambert C, Breuils-Bonnet S, Nadeau V et al (2017) HDAC6: a novel histone deacetylase implicated in pulmonary arterial hypertension. *Sci Rep* 7(1):4546
- Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S et al (2015) Bromodomain-containing protein 4: the epigenetic origin of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 117(6):525–535
- Sun Y, Yu X, Bai Q (2015) miR-204 inhibits invasion and epithelial-mesenchymal transition by targeting FOXM1 in esophageal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8(10):12775–12783
- Courboulin A, Paulin R, Giguere NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Cote J et al (2011) Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med* 208(3):535–548
- Halasi M, Gartel AL (2009) A novel mode of FoxM1 regulation: positive auto-regulatory loop. *Cell Cycle* 8(12):1966–1967
- Khongkow P, Karumarathna U, Khongkow M, Gong C, Gomes AR, Yague E, Monteiro LJ, Kongsema M, Zona S, Man EP et al (2014) FOXM1 targets NBS1 to regulate DNA damage-induced senescence and epirubicin resistance. *Oncogene* 33(32):4144–4155
- You Z, Chahwan C, Bailis J, Hunter T, Russell P (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol* 25(13):5363–5379
- Dupre A, Boyer-Chatenet L, Sattler RM, Modi AP, Lee JH, Nicolette ML, Kopelovich L, Jasin M, Baer R, Paull TT et al (2008) A forward chemical genetic screen reveals an inhibitor of the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Nat Chem Biol* 4(2):119–125

25. Sanders DA, Gornally MV, Marsico G, Beraldi D, Tannahill D, Balasubramanian S (2015) FOXM1 binds directly to non-consensus sequences in the human genome. *Genome Biol* 16(1):130
26. Nestal de Moraes G, Delbue D, Silva KL, Robaina MC, Khongkow P, Gomes AR, Zona S, Crocamo S, Mencalha AL, Magalhaes LM et al (2015) FOXM1 targets XIAP and Survivin to modulate breast cancer survival and chemoresistance. *Cell Signal* 27(12):2496–2505
27. Wang JC, Chen YJ, Hughes D, Petrovic V, Major ML, Park HJ, Tan Y, Ackerson T, Costa RH (2005) Forkhead box M1 regulates the transcriptional network of genes essential for mitotic progression and genes encoding the SCF (Skp2-Cks1) ubiquitin ligase. *Mol Cell Biol* 25(24):10875–10894
28. McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED (2005) Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 115(6):1479–1491
29. Chelladurai P, Seeger W, Pullamsetti SS (2016) Epigenetic mechanisms in pulmonary arterial hypertension: the need for global perspectives. *Eur Respir Rev* 25(140):135–140
30. Lam EW, Broseus JJ, Gomes AR, Koo CY (2013) Forkhead box proteins: tuning forks for transcriptional harmony. *Nat Rev Cancer* 13(7):482–495
31. Sengupta A, Kalinichenko VV, Yutzey KE (2013) FoxO and FoxM1 transcription factors have antagonistic functions in neonatal cardiomyocyte cell cycle withdrawal and IGF1 gene regulation. *Circ Res* 112(2):267–277
32. Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecechi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W et al (2014) Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 20(11):1289–1300
33. Xia L, Mo P, Huang W, Zhang L, Wang Y, Zhu H, Tian D, Liu J, Chen Z, Zhang Y et al (2012) The TNF-alpha/ROS/HIF-1-induced upregulation of FoxM1 expression promotes HCC proliferation and resistance to apoptosis. *Carcinogenesis* 33(11):2250–2259
34. Raghavan A, Zhou G, Zhou Q, Ibe JC, Ramchandran R, Yang Q, Racherla H, Raychaudhuri P, Raj JU (2012) Hypoxia-induced pulmonary arterial smooth muscle cell proliferation is controlled by forkhead box M1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 46(4):431–436
35. Paulin R, Courboulin A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, Cote J, Provencher S, Sussman MA, Bonnet S (2011) Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 123(11):1205–1215
36. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS et al (2006) An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1alpha-Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 113(22):2630–2641
37. Naxerova K, Bult CJ, Peaston A, Fancher K, Knowles BB, Kasif S, Kohane IS (2008) Analysis of gene expression in a developmental context emphasizes distinct biological motifs in human cancers. *Genome Biol* 9(7):R108
38. Pullamsetti SS, Savai R, Seeger W, Goncharova EA (2017) Translational advances in the field of pulmonary hypertension. From cancer biology to new pulmonary arterial hypertension therapeutics. Targeting cell growth and proliferation signaling hubs. *Am J Respir Crit Care Med* 195(4):425–437
39. Podhorecka M, Skladanowski A, Bozko P (2010, 2010) H2AX phosphorylation: its role in DNA damage response and cancer therapy. *J Nucleic Acids*. <https://doi.org/10.4061/2010/920161>
40. Wang Y, Yun Y, Wu B, Wen L, Wen M, Yang H, Zhao L, Liu W, Huang S, Wen N, Li Y (2016) FOXM1 promotes reprogramming of glucose metabolism in epithelial ovarian cancer cells via activation of GLUT1 and HK2 transcription. *Oncotarget* 7(30):47985–47997
41. Hu C, Liu D, Zhang Y, Lou G, Huang G, Chen B, Shen X, Gao M, Gong W, Zhou P et al (2014) LXRalpha-mediated downregulation of FOXM1 suppresses the proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Oncogene* 33(22):2888–2897
42. Gong AH, Wei P, Zhang S, Yao J, Yuan Y, Zhou AD, Lang FF, Heimberger AB, Rao G, Huang S (2015) FoxM1 drives a feed-forward STAT3-activation signaling loop that promotes the self-renewal and tumorigenicity of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Res* 75(11):2337–2348
43. Tuder RM, Davis LA, Graham BB (2012) Targeting energetic metabolism: a new frontier in the pathogenesis and treatment of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 185(3):260–266
44. Zhao B, Barrera LA, Ersing I, Willox B, Schmidt SC, Greenfield H, Zhou H, Molloy SB, Shi TT, Takasaki K et al (2014) The NF-kappaB genomic landscape in lymphoblastoid B cells. *Cell Rep* 8(5):1595–1606
45. Zhang N, Wei P, Gong A, Chiu WT, Lee HT, Colman H, Huang H, Xue J, Liu M, Wang Y et al (2011) FoxM1 promotes beta-catenin nuclear localization and controls Wnt target-gene expression and glioma tumorigenesis. *Cancer Cell* 20(4):427–442
46. Takahashi J, Orchołski M, Yuan K, de Jesus PV (2016) PDGF-dependent beta-catenin activation is associated with abnormal pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *FEBS Lett* 590(1):101–109
47. Hosokawa S, Haraguchi G, Sasaki A, Arai H, Muto S, Itai A, Doi S, Mizutani S, Isobe M (2013) Pathophysiological roles of nuclear factor kappaB (NF-kB) in pulmonary arterial hypertension: effects of synthetic selective NF-kB inhibitor IMD-0354. *Cardiovasc Res* 99(1):35–43
48. Balli D, Ren X, Chou FS, Cross E, Zhang Y, Kalinichenko VV, Kalin TV (2012) Foxm1 transcription factor is required for macrophage migration during lung inflammation and tumor formation. *Oncogene* 31(34):3875–3888
49. Schermuly RT, Ghofrani HA, Wilkins MR, Grimminger F (2011) Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat Rev Cardiol* 8(8):443–455
50. Bothe C, Zhang Y, York A, Kalin TV, Schultz Jel J, Molkentin JD, Kalinichenko VV (2012) Postnatal ablation of Foxm1 from cardiomyocytes causes late onset cardiac hypertrophy and fibrosis without exacerbating pressure overload-induced cardiac remodeling. *PLoS One* 7(11):e48713

## Annexe VII.

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

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

Diederik E Van der Feen, Kondababu Kurakula, Eve Tremblay, Olivier Boucherat, Guido P L Bossers, Robert Szulcek, Alice Bourgeois, Marie-Claude Lampron, **Karima Habbout**, Sandra Martineau, Roxane Paulin, Ewelina Kulikowski, Ravi Jahagirdar, Ingrid Schaliq, Harm Jan Bogaard, Beatrijs Bartelds, Steeve Provencher, Rolf M F Berger, Sébastien Bonnet 3, Marie-José Goumans.

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

Diederik E. Van der Feen<sup>1\*</sup>, Kondababu Kurakula<sup>2\*</sup>, Eve Tremblay<sup>3\*</sup>, Olivier Boucherat<sup>3</sup>, Guido P. L. Bossers<sup>1</sup>, Robert Szulcek<sup>4</sup>, Alice Bourgeois<sup>3</sup>, Marie-Claude Lampron<sup>3</sup>, Karima Habbout<sup>3</sup>, Sandra Martineau<sup>3</sup>, Roxane Paulin<sup>3</sup>, Ewelina Kulikowski<sup>5</sup>, Ravi Jahagirdar<sup>6</sup>, Ingrid Schaliq<sup>4</sup>, Harm Jan Bogaard<sup>4</sup>, Beatrijs Bartelds<sup>1,6</sup>, Steeve Provencher<sup>3</sup>, Rolf M. F. Berger<sup>1,2</sup>, Sébastien Bonnet<sup>3,†</sup>, and Marie-José Goumans<sup>2,†</sup>

<sup>1</sup>Center for Congenital Heart Diseases, Beatrix Children's Hospital, University Medical Center Groningen, University of Groningen, Groningen, the Netherlands; <sup>2</sup>Department of Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands; <sup>3</sup>Pulmonary Hypertension and Vascular Biology Research Group of Quebec Heart and Lung Institute, Laval University, Quebec, Canada; <sup>4</sup>Pulmonary Medicine, Amsterdam Cardiovascular Sciences, Amsterdam University Medical Centers, Amsterdam, the Netherlands; <sup>5</sup>Reseverlogix Calgary, Calgary, Alberta, Canada; and <sup>6</sup>Division of Cardiology, Department of Pediatrics, Erasmus University Medical Center, Sophia Children's Hospital, Rotterdam, the Netherlands

### Abstract

**Rationale:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a degenerative arteriopathy that leads to right ventricular (RV) failure. BRD4 (bromodomain-containing protein 4), a member of the BET (bromodomain and extra-terminal motif) family, has been identified as a critical epigenetic driver for cardiovascular diseases.

**Objectives:** To explore the therapeutic potential in PAH of RVX208, a clinically available BET inhibitor.

**Methods:** Microvascular endothelial cells, smooth muscle cells isolated from distal pulmonary arteries of patients with PAH, rats with Sugen5416 + hypoxia- or monocrotaline + shunt-induced PAH, and rats with RV pressure overload induced by pulmonary artery banding were treated with RVX208 in three independent laboratories.

**Measurements and Main Results:** BRD4 is upregulated in the remodeled pulmonary vasculature of patients with PAH, where it regulates FoxM1 and PLK1, proteins implicated in the DNA damage response. RVX208 normalized the hyperproliferative, apoptosis-

resistant, and inflammatory phenotype of microvascular endothelial cells and smooth muscle cells isolated from patients with PAH. Oral treatment with RVX208 reversed vascular remodeling and improved pulmonary hemodynamics in two independent trials in Sugen5416 + hypoxia-PAH and in monocrotaline + shunt-PAH. RVX208 could be combined safely with contemporary PAH standard of care. RVX208 treatment also supported the pressure-loaded RV in pulmonary artery banding rats.

**Conclusions:** RVX208, a clinically available BET inhibitor, modulates proliferative, prosurvival, and proinflammatory pathways, potentially through interactions with FoxM1 and PLK1. This reversed the PAH phenotype in isolated PAH microvascular endothelial cells and smooth muscle cells *in vitro*, and in diverse PAH rat models. RVX208 also supported the pressure-loaded RV *in vivo*. Together, these data support the establishment of a clinical trial with RVX208 in patients with PAH.

**Keywords:** BET inhibition; BRD4 (bromodomain-containing protein 4); pulmonary arterial hypertension; vascular remodeling; right ventricle pressure load

(Received in original form December 7, 2018; accepted in final form April 30, 2019)

\*These authors contributed equally to this manuscript.

†These authors equally supervised the study.

Supported by the Netherlands Cardiovascular Research Initiative: the Dutch Heart Foundation, Dutch Federation of University Medical Centres, the Netherlands Organization for Health Research and Development, and the Royal Netherlands Academy of Sciences (CVON-Phaedra 2012-08); the Sebald fund; the Ter Meulen Fund (Royal Netherlands Academy of Sciences); the Dutch Heart Foundation (NHS2013-T091, Cobra3, B.B. and R.M.F.B.); and the Dutch Lung Foundation (Longfonds; 5.2.17.198J0, K.K.). Reseverlogix Corp. provided the RVX208 and unrestricted grant (minor) for the Canadian studies.

**Author Contributions:** D.E.V.d.F., K.K., O.B., B.B., R.M.F.B., S.B., and M.-J.G. contributed to the conception and design of the research. D.E.V.d.F., K.K., E.T., O.B., G.P.L.B., A.B., M.-C.L., K.H., S.M., and I.S. performed the experiments. R.S. performed the human microvascular endothelial cell isolation. D.E.V.d.F., K.K., E.T., O.B., R.P., R.M.F.B., B.B., S.B., and M.-J.G. interpreted the results of experiments. D.E.V.d.F. drafted the manuscript. E.K. and R.J. provided input regarding the pharmacology of RVX208 and performed the tissue exposure experiments. H.J.B., B.B., S.P., R.M.F.B., S.B., and M.-J.G. edited and revised the manuscript.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Marie-José Goumans, Ph.D., Department of Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Center, P.O. Box 9600, Postzone S-1-P, 2300 RC Leiden, the Netherlands. E-mail: m.j.goumans@lumc.nl

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

Am J Respir Crit Care Med Vol 200, Iss 7, pp 910-920, Oct 1, 2019

Copyright © 2019 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/ajrccm.201812-2275OC on May 1, 2019

Internet address: [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org)

### At a Glance Commentary

#### Scientific Knowledge on the

**Subject:** Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a degenerative arteriopathy that leads to right ventricular failure. BRD4 (bromodomain-containing protein 4) has been identified as a critical epigenetic driver for cardiovascular diseases.

#### What This Study Adds to the Field:

RVX208, a clinically available BET (bromodomain and extra-terminal motif) inhibitor, modulates proliferative, prosurvival, and proinflammatory pathways. This reversed the PAH phenotype in isolated PAH microvascular endothelial cells (pulmonary origin) and smooth muscle cells *in vitro*, and in diverse PAH rat models. RVX208 also supported the pressure-loaded right ventricle *in vivo*. Together, these data support the establishment of a clinical trial with RVX208 in patients with PAH.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by occlusive vascular remodeling, vascular rarefaction, and sclerosis. This ultimately causes pulmonary vascular resistance (PVR) to rise and induces right ventricular (RV) failure. Loss of BMPR2 (bone morphogenic protein receptor 2) and accumulating DNA damage (1) are early pathogenic phenomena that seem to act in a vicious cycle (2). In different cardiovascular diseases and cancers, BRD4 (bromodomain-containing protein-4), a member of the BET (bromodomain and extra-terminal motif) family, has been identified as a critical transcriptional modulator in the context of DNA damage (3–6). BRD4 can inhibit apoptosis, the physiologic response to accumulating DNA damage, by promoting cell survival (7), and stimulate hyperproliferation (8). BRD4 can further regulate a cellular switch into a proinflammatory phenotype via increased transcription of cytokines, such as IL-6 and IL-8 (Figure 1) (9). In previous studies, we have shown that BRD4 is also increased in PAH (7) and associated with an aberrant DNA damage response (DDR) (10)

mediated by FoxM1, a downstream BRD4 effector (11). Specific BRD4 inhibition by JQ1 and siRNA has shown to reverse vascular remodeling and improve pulmonary hemodynamics in Sugden5416-hypoxia rats (SH-PAH), which was associated with reduced PAH smooth muscle cell (SMC) apoptosis resistance and proliferation (7). However, neither JQ1 nor siRNA can be used clinically. We therefore explored the therapeutic potential of RVX208, a clinically available BET inhibitor and BRD4 antagonist. The experiments were initiated and conducted independently by the Pulmonary Hypertension and Vascular Biology Research Group in Quebec, Canada, and by the PHAEDRA consortium in the Netherlands. Because of high similarity in experimental set up and outcome, the Canadian and Dutch preclinical trials were later unified.

### Methods

#### Human Cell Culture and Treatments

Pulmonary microvascular endothelial cells (MVECs) and SMCs were isolated from idiopathic PAH (IPAH), and normal lung explant tissue. Cells were treated with vehicle (5% DMSO), or RVX208, thiothrepton (FoxM1 inhibitor), or BI6727 (PLK1 inhibitor) in the indicated doses for 16 hours, or with siRNA against BRD4, FoxM1, or PLK1. Cell proliferation, apoptosis, inflammation, and BMPR2 signaling were assessed. Detailed culture procedures and all assays are described in the online supplement.

#### Rat Models for PAH and RV Pressure Overload and Treatments

All experiments were performed according to recently published standards for methodologic rigor in preclinical PAH studies (12), as described in the online supplement. RVX208 was evaluated in two established rat models for progressive PAH: SH-PAH and monocrotaline/shunt (MS-PAH). The Canadian and Dutch *in vivo* experiments were initiated simultaneously, conducted and analyzed independently, and finally unified in this work. In the Canadian study, SH-PAH was induced in male Sprague-Dawley rats by a 20 mg/kg Su5416 injection followed by 3 weeks in 10% hypoxia and 3 weeks in normoxia. Saline-injected,

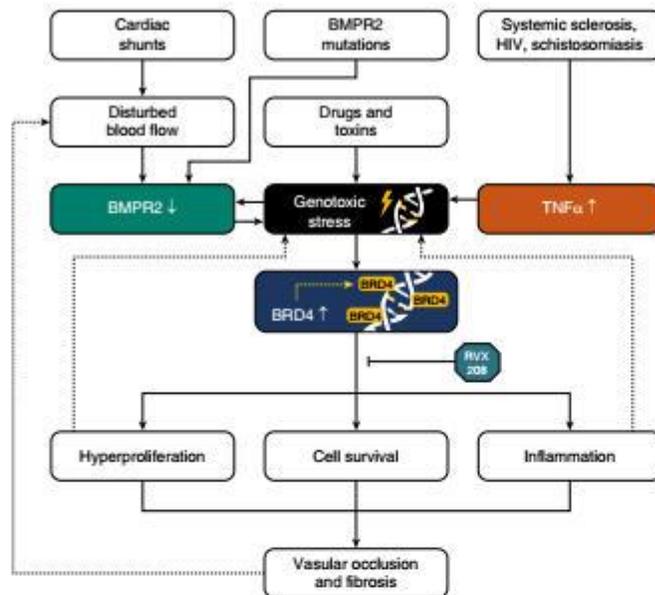
normoxia rats ( $n=6$ ) served as control animals. From Day 42 to Day 70, SH-PAH rats received daily oral treatment with vehicle (formulation EA006 [13];  $n=14$ ), 90 mg/kg RVX208 ( $n=8$ ), or RVX208 + contemporary care (CC; tadalafil 10 mg/kg + macitentan 10 mg/kg;  $n=7$ ). In the Dutch studies, SH-PAH was induced similarly. Rats received daily oral treatment from Day 42 to Day 70 with vehicle (5% DMSO in drinking water;  $n=12$ ) or 100 mg/kg RVX208 ( $n=12$ ).

In the MS-PAH study, PAH was induced in 27 male Wistar rats by a 60 mg/kg monocrotaline injection followed by aortocaval shunt surgery at Day 7 as described previously (12, 13). Daily oral treatment with vehicle ( $n=12$ ) or 100 mg/kg RVX208 ( $n=10$ ) was given from Day 21 to Day 35 (MS35Veh or MS35RVX). The remaining five MS-PAH rats were killed at Day 21 to allow a baseline comparison at treatment initiation (MS21). RV pressure overload was induced in rats by pulmonary artery banding (PAB), as described previously (14, 15). Rats received daily oral treatment from Day 28 to Day 56 with vehicle (PAB56Veh;  $n=5$ ) or 100 mg/kg RVX208 (PAB56RVX;  $n=8$ ). The *in vivo* effects of RVX208 on hemodynamics, vascular morphology, proliferation, apoptosis, inflammation and BMPR2, FoxM1, and PLK1 signaling were assessed as described in the online supplement. Tissue exposure levels of oral 100 mg/kg RVX208 treatment were measured in the lung and heart of the PAB rats.

### Results

#### BRD4 Regulates the DDR Protein FoxM1 and Its Transcriptional Target PLK1 in Vascular Cells in Human PAH

We confirmed increased BRD4 protein expression in MVECs and SMCs isolated from patients with IPAH compared with healthy control subjects (Figure 2A). In IPAH, BRD4 localized in the media of larger pulmonary arteries with medial hypertrophy, in neointimal fibrotic lesions, and lining the plexus channels within plexiform lesions. In control subjects, BRD4 localized predominantly in the endothelium (see Figure E1 in the online supplement). We then investigated the functional relationship of BRD4 with



**Figure 1.** Hypothetical representation of the role of BRD4 (bromodomain-containing protein-4) in pulmonary arterial hypertension. DNA damage, induced by various genotoxic triggers associated with pulmonary arterial hypertension, leads to recruitment of BRD4 to the DNA, where it induces hyperproliferation, cell survival, and inflammation, which lead to vascular remodeling. BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor 2; TNF $\alpha$  = tumor necrosis factor- $\alpha$ .

FoxM1 and PLK1, respective downstream targets of BRD4 (11), in IPAH SMCs. In previous research, we have shown that expression of FoxM1 is increased in PAH-SMCs (10). FoxM1 is known to upregulate PLK1, an oncogene implied in hyperproliferation and apoptosis resistance in cancer (16). PLK1 expression was increased in IPAH, both in isolated PAH-SMCs (Figure 2B) and in the vessel wall (Figure 2C). To confirm that BRD4 regulates PLK1 via FoxM1 in PAH-SMCs, we inhibited BRD4 and FoxM1 by siRNA, which both decreased PLK1 protein expression (Figure 2D). Inhibition of BRD4 by RVX208 also decreased FoxM1 and PLK1 on the protein (Figure 2E) and transcriptional level in PAH-SMCs (Figure 2F). Finally, we showed that inhibition of FoxM1 by thiostreptone dose dependently decreased PLK1 protein expression (see Figure E2). In conclusion, we report that BRD4 expression is increased in MVECs and SMCs of patients with PAH, and induces PLK1 via FoxM1.

#### Reversal toward a Healthy Vascular Cell Phenotype by RVX208

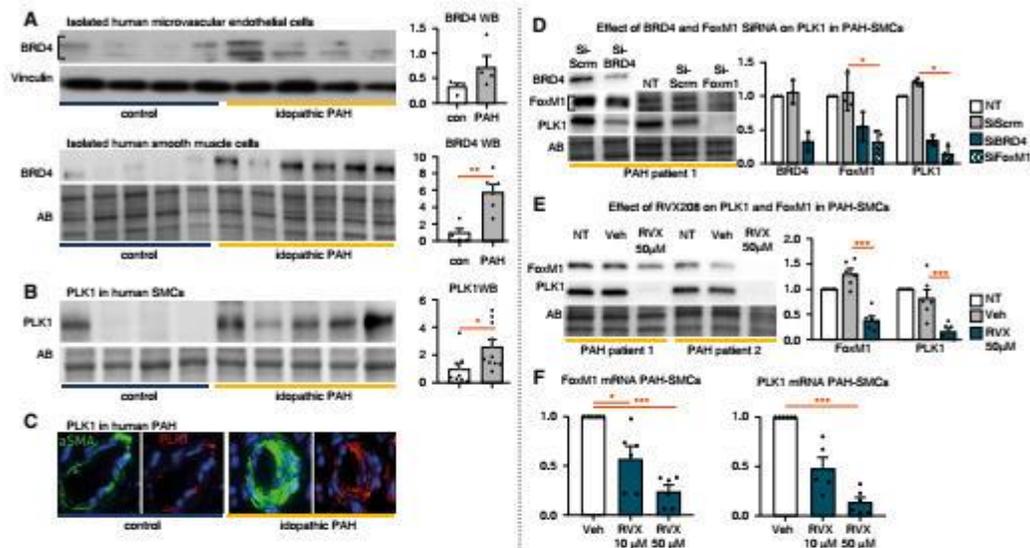
Next, we assessed the effect of BRD4-FoxM1-PLK1 inhibition on principle features of vascular remodeling in PAH: proliferation, apoptosis resistance, TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )/BMP (bone morphogenetic protein) imbalance, and inflammation (Figures 3A, 3G, and 3K). We found that 10- $\mu$ M RVX208 significantly reduced cell viability, a product of reduced proliferation and increased apoptosis, in control and PAH-MVECs and PAH-SMCs (Figure 3B). RVX208 reduced proliferative signaling in PAH-MVECs by decreasing cyclin-D1 promoter activity, and normalized the level of cyclin-D1 mRNA, which had been increased by stimulating healthy MVECs with 10-nM TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) (Figure 3C). We further showed that medium conditioned by PAH-MVECs induced proliferation of normal SMCs, whereas 10- $\mu$ M RVX208 treatment of PAH-MVECs resulted in conditioned

medium that decreased SMC proliferation (Figure 3D), signifying that RVX208 modulates the proproliferative crosstalk of endothelial cells to SMCs. In isolated PAH-SMCs, siBRD4, or 50- $\mu$ M RVX208 significantly reduced proliferation and apoptosis resistance, as shown by decreased Ki67 and increased annexin V expression (Figures 3E and 3F). Similar effects were observed in PAH-pulmonary artery smooth muscle cells exposed to siPLK1 or the PLK1 inhibitor BI6727 (see Figure E3).

Next, we assessed the effect of RVX208 (10  $\mu$ M) on TGF $\beta$ /BMP imbalance, using ID1 and PAI1 as the respective readouts of BMP- and TGF $\beta$ -mediated signaling. In PAH-MVECs, RVX208 reduced the activity of the PAI1-derived TGF $\beta$ -responsive CAGA-Luc reporter and the ID1-derived BMP-responsive BRE-Luc reporter (Figure 3H). In control MVECs, RVX208 reversed the decrease in ID1 and increase in PAI1 mRNA that were induced by TNF $\alpha$  stimulation (Figure 3I). The increase in ID1 protein levels was confirmed in PAH-MVECs, likely explained by a concurrent increase in BMPR2 protein on RVX208 treatment (Figure 3J). Seeing the regulatory effects of an inflammatory stimulus, such as TNF $\alpha$  on the aforementioned processes, we finally assessed the effect of RVX208 on cytokine production. In control MVECs, RVX208 reversed the TNF $\alpha$ -mediated increase in IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, and CCL5 mRNA (Figure 3L). RVX208 also reduced IL-6 and MCP1 secretion by PAH-MVECs (ELISA) (Figure 3M), and reduced NF $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B) promoter activity (Figure 3N). In conclusion, we report that RVX208 amended the TGF $\beta$ /BMP imbalance and reversed the proproliferative, apoptosis-resistant, and inflammatory PAH vascular cell phenotype.

#### RVX208 Reverses Pulmonary Vascular Remodeling and Improves Hemodynamics *In Vivo*

In the Canadian SH-PAH study all rats survived until the endpoint. Vascular occlusion, systolic RV pressure (sRVP), and mean pulmonary artery pressure (mPAP) were increased in vehicle-treated rats compared with control animals. Treatment with either RVX208 alone or RVX208 + CC in SH-PAH rats decreased sRVP, mPAP, and PVR and vascular occlusion by decreasing intimal thickness (Figure 4B; see Figure E4). Medial thickness was only



**Figure 2.** BRD4 (bromodomain-containing protein-4) regulates the DNA damage response protein FoxM1 and its transcriptional target PLK1 in vascular cells in human pulmonary arterial hypertension (PAH). (A) Western blot showing increased BRD4 protein in microvascular endothelial cells and pulmonary artery smooth muscle cells isolated from patients with idiopathic PAH versus control subjects. (B) Western blot showing increased PLK1 in idiopathic PAH smooth muscle cells (SMCs). (C) Increased expression of PLK1 (red) in the idiopathic PAH vessel wall (each image is 100  $\mu$ m wide). SMCs are marked by  $\alpha$ -SMA in green. (D) Western blot showing the effect of BRD4 and FoxM1 siRNA on PLK1 in PAH-SMCs. (E) Western blot showing the effect of RVX208 on PLK1 in FoxM1 in PAH-SMCs. (F) FoxM1 and PLK1 mRNA is reduced dose dependently by RVX208 in PAH-SMCs. Data are represented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis test. Significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , and \*\*\* $P < 0.0001$ .  $\alpha$ -SMA =  $\alpha$ -smooth muscle actin; AB = Amido black; NT = no treatment; siBRD4/FoxM1 = siRNA against BRD4/FoxM1; si-Scrm = scrambled siRNA; Veh = vehicle (DMSO); WB = western blot.

decreased by RVX208 + CC (see Figure E4). The RV to left ventricular (LV) + intraventricular septal (IVS) weight ratio [RV/(LV + IVS)] was increased in SH-PAH compared with control subjects, but was not significantly decreased by treatment (see Figure E4).

Results were largely similar in the Dutch SH-PAH study. One rat died in each group (Figure 4). RVX208 significantly reduced sRVP, PVR, and vascular occlusion, also by reducing intimal thickness. No effects on the RV/(LV + IVS) weight ratio were observed (Figure 4E; see Figure E5). Pulmonary artery acceleration time, an echocardiographic parameter that decreases early during development of pulmonary hypertension (17), was increased by RVX208 treatment (see Figure E5).

In the MS-PAH study, three rats died before the endpoint at Day 35 in the vehicle group versus two in the RVX208 group. Vascular occlusion score and intimal

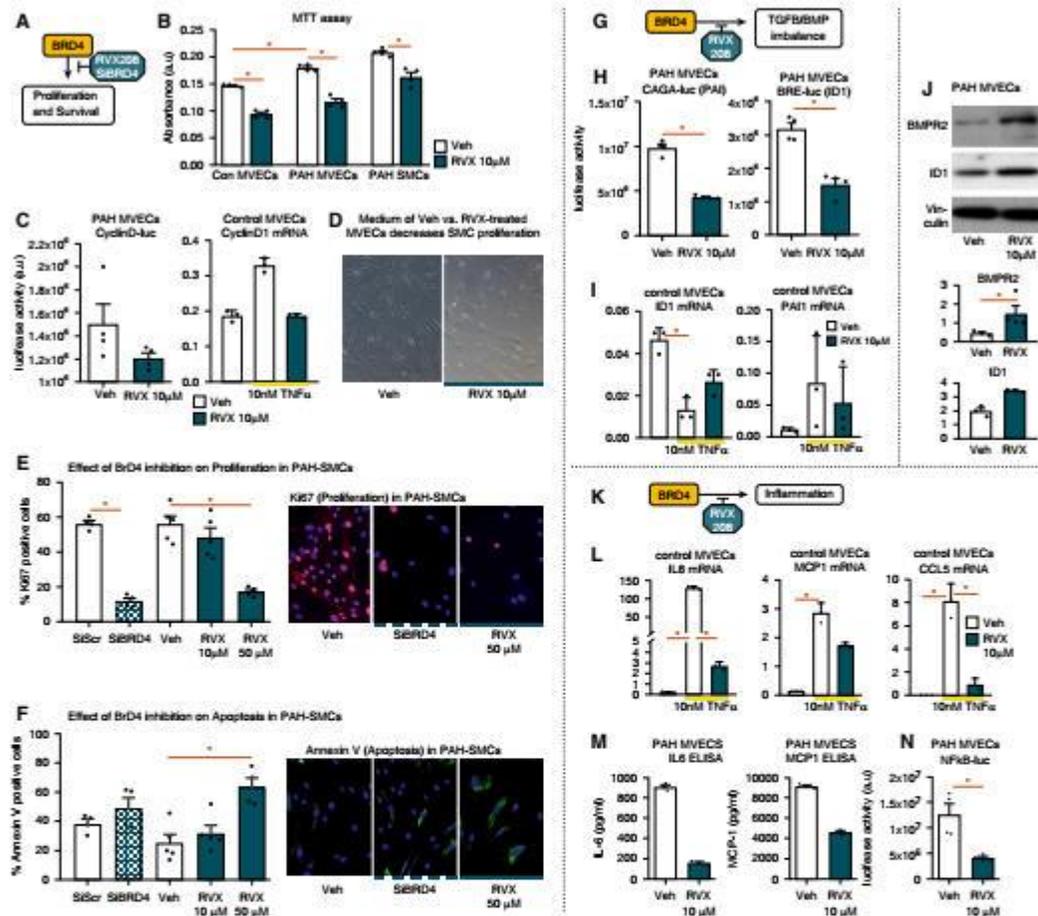
thickness were comparable in the MS21 and MS35veh rats, indicating initiation of treatment during end-stage pulmonary vascular disease. RVX208 significantly reduced vascular occlusion and intimal thickness (Figure 4H). Lung fibrosis, as assessed by Masson staining and quantified in the total lung (Figure 4J), was decreased by RVX208. Specifically, RVX208-treated lungs showed less fibrosis in the vessel wall (Figure 4K). Although mean pulmonary artery acceleration time was significantly improved by RVX208, the reduction in sRVP, mPAP, and PVR did not reach statistical significance and the RV/(LV + IVS) weight ratio was not affected by RVX208 (Figure 4H; see Figure E6).

In conclusion, we report that in three independent research groups, oral treatment with RVX208 reversed vascular remodeling in both the SH- and the MS-PAH rat, and improved pulmonary hemodynamics, particularly in the SH-PAH rat.

#### **In Vivo Effects of RVX208 on FoxM1, PLK1, Proliferation, Apoptosis, Inflammation, and BMP Signaling**

In the Canadian SH-PAH study, total lung PLK1 mRNA was increased in vehicle-treated rats versus normal control animals, and was decreased by RVX + CC (Figure 5A). FoxM1 expression in pulmonary artery smooth muscle cells was increased in SH-vehicle rats versus control animals, and decreased significantly by RVX + CC (Figure 5B). Cell proliferation was increased in SH-vehicle rats versus control animals, which was reversed by RVX + CC (Figure 5C). Apoptosis was not affected in SH-PAH, nor by RVX treatment (Figure 5D). Finally, mRNA levels of IL-6 and MCP1 were increased in SH-PAH versus control subjects and were decreased by RVX + CC (Figure 5E; see Figure E4).

In the MS-PAH study, FoxM1 and PLK1 protein expression tended to be higher in the total lung lysate of MS35Veh



**Figure 3.** Reversal toward a healthy vascular cell phenotype by RVX208. (A) The effect of BRD4 (bromodomain-containing protein-4)-FoxM1-PLK1 inhibition on cell proliferation and survival (hypothesis). (B) MTT cell viability assays with 10- $\mu$ M RVX208 in control and pulmonary arterial hypertension (PAH)-microvascular endothelial cells (MVECs) and PAH-smooth muscle cells (SMCs). (C) Luciferase assay showing decreased activity of the cyclin-D promoter by RVX208 in PAH-MVECs, and PCR for cyclin-D1 under TNF $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ ) stimulation and RVX208 treatment. (D) SMCs cultured in medium conditioned by PAH-MVECs treated with vehicle or RVX208. (E) K67 staining and quantification showing the effect of BRD4 inhibition by sBRD4 and RVX208 on PAH-SMC proliferation. The dashed line denotes a different but similar treatment. (F) Annexin V staining and quantification showing the effect of BRD4 inhibition by sBRD4 and RVX208 on PAH-SMC apoptosis. (G) The effect of BRD4 inhibition on the TGF $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ )/BMP (bone morphogenic protein) imbalance in PAH (hypothesis). (H) Luciferase assay for the BMP reporter (BRE-Luc) and TGF $\beta$  reporter (CAGA-Luc) in PAH-MVECs after BMP9 (1 ng/ml) or TGF $\beta$  (1 ng/ml) stimulation, respectively, in the absence or presence of RVX208 treatment. (I) PCR for ID1 and PAI1 under TNF $\alpha$  stimulation and RVX208 treatment. (J) Western blot (top) and quantification (bottom) showing increased BMPR2 and ID1 protein under RVX208 treatment in PAH-MVECs. (K) The effect of BRD4 inhibition on inflammation (hypothesis). (L) PCR for IL-8, monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, and CCL5 under TNF $\alpha$  stimulation and RVX208 treatment in normal MVECs. (M) ELISA for IL-6 and MCP1 in PAH-MVECs. (N) Luciferase assay for the NF $\kappa$ B promoter in PAH-MVECs with RVX208 treatment. Data are represented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis test. Significant differences: \**P* < 0.05. Con = control; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NF $\kappa$ B = nuclear factor- $\kappa$ B; Veh = vehicle (DMSO).

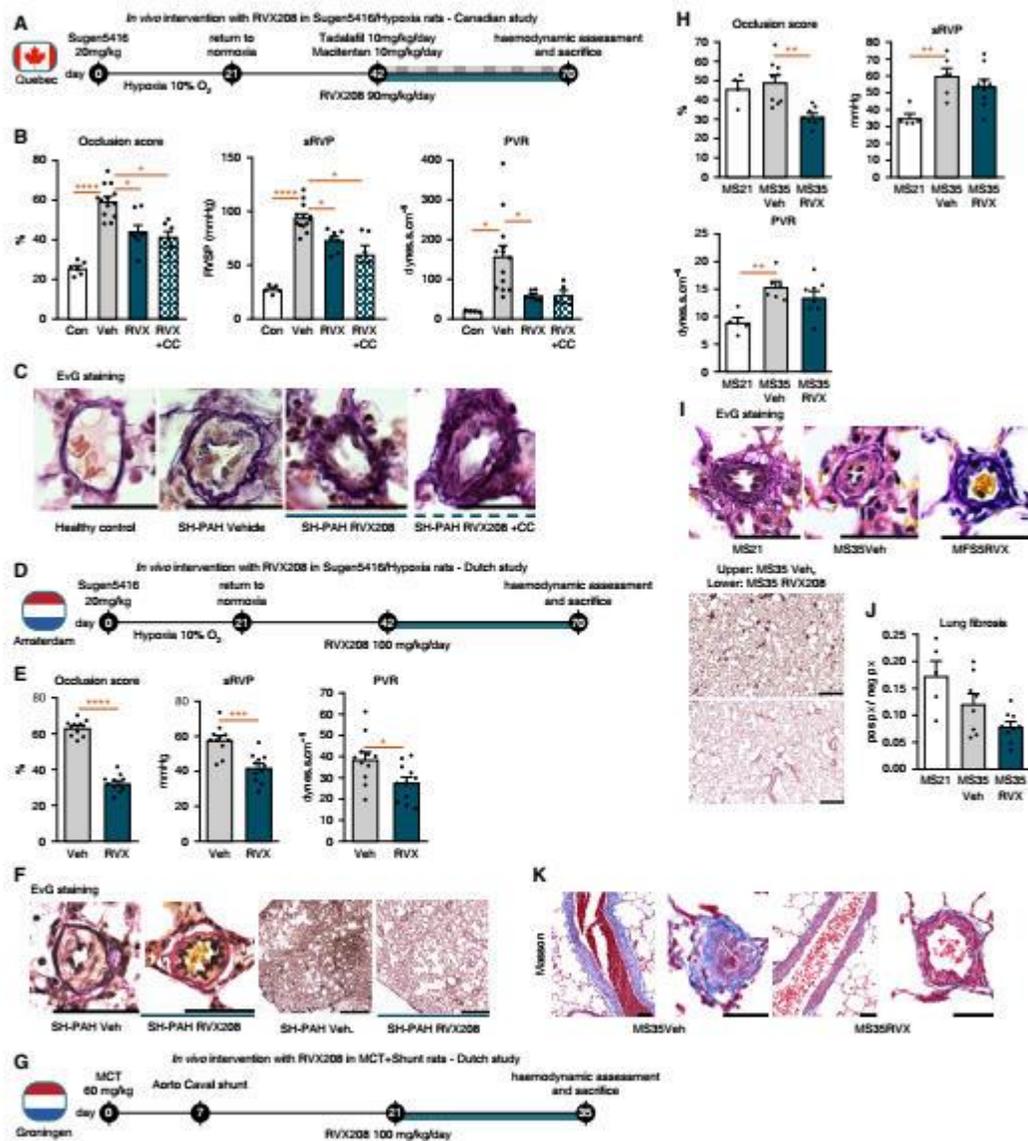


Figure 4. RVX208 reverses pulmonary vascular remodeling and improves hemodynamics *in vivo*. (A) Experimental design for the Canadian *in vivo* intervention study with RVX208 ( $\pm$  contemporary care) in Sugen-hypoxia rats (SH-pulmonary arterial hypertension [PAH]). (B) Quantification of vascular occlusion and hemodynamics. (C) Elastica-van Gieson (EvG) staining, representative examples of vascular lesions. The dashed line denotes RVX+contemporary care. Scale bars, 20  $\mu$ m. (D) Experimental design for the Dutch *in vivo* intervention study with RVX208 in SH-PAH. (E) Quantification of vascular occlusion and hemodynamics. (F) EvG staining. Left: representative examples of vascular lesions. Scale bars, 50  $\mu$ m. Right: overview of the SH-PAH lung, showing fewer occluded vessels and inflammatory infiltrates in RVX208-treated rats. Scale bars, 500  $\mu$ m. (G) Experimental design for

compared with normal control. RVX208 significantly decreased FoxM1 protein, and tended to decrease PLK1 protein (Figures 4F and 4G). Total lung PLK1 mRNA was decreased by RVX208 (Figure 5G). FoxM1 mRNA was not detected. Vascular FoxM1 expression, located mainly in the media, was increased in MS35Veh versus control subjects, which was blunted by RVX208 treatment (Figure 5H). Vascular PLK1 expression was largely absent in healthy control subjects, was increased in the endothelium of MS35Veh, and was reduced by RVX208 (Figure 5H). Contrary to the SH-PAH study, apoptosis (assessed by cleaved-caspase-3 staining, which located mainly in the intima) was increased by RVX208 treatment in MS35-PAH (Figure 5I). Ki67 staining is usually scarce in the vasculature of MS35Veh (18), and was therefore not assessed here. Furthermore, RVX208 treatment resulted in increased BMPR2 and ID3 protein (Figure 5J). IL-6 and MCP1 mRNA level was low in all MS35RVX rats, whereas high expression was observed in four of nine MS35Veh rats, and CCL5 mRNA was significantly reduced by RVX208 (Figure 5K; see Figure E6). In conclusion, we report a consistent downregulation of FoxM1 and PLK1 and a decrease in cytokine mRNA levels after RVX208 treatment in both the SH- and MS-PAH model. Model-specific effects of RVX208 treatment were observed regarding proliferation and apoptosis.

#### RVX208 Supports RV Function during Increased Pressure Load

We finally studied the effects of RVX208 treatment in RV pressure load induced by PAB in rats (14, 17) to confirm safety of the drug during RV compromise. Three rats died during surgery. At Day 14, we measured PAB pressure gradient using echocardiography to confirm effective and equal pressure load at baseline. In PAB56RVX rats, the pressure gradient increased from Day 14 to Day 56, indicating adaptation to pressure load

(Figure 6B). In line with this observation, cardiac output, RV stroke volume, stroke work, and RV power were also increased by RVX208 (Figure 6B). Tricuspid annular plane systolic excursion was normal in both groups. The relatively higher contractile force in PAB56RVX was also reflected in an increase in RV/(LV + IVS) mass. RV cardiomyocyte cross-sectional area showed a twofold increase compared with sham conditions (see Figure E7), but was similar in PAB56RVX and PAB56Veh (Figure 6C), indicating that the increased RV mass in PAB56RVX could be caused by a proportional increase in the length of cardiomyocytes, which is associated to higher contractility (19). The increased RV mass in RVX208-treated rats was not accompanied by evidence of adverse remodeling, as indicated by a favorable capillary/myocyte ratio and a low percentage of fibrosis (Figure 6D) (20). Furthermore,  $\beta$ -myosin heavy chain to  $\alpha$ -myosin heavy chain ratio, typically increased in pathologic cardiac hypertrophy, tended to be lower in PAB56RVX. Together, these data indicated that RVX208 stimulates RV adaptation in response to increased pressure load without signs of adverse remodeling, suggesting a favorable safety profile or even therapeutic benefit for patients with RV dysfunction in advanced PAH. FoxM1 and PLK1 mRNA levels were also increased in the PAB56Veh RV compared with sham-operated animals, but were not decreased by RVX208 (Figures 6E and 6F). In conclusion, we report that RVX208 treatment support RV function in the context of increased RV pressure load.

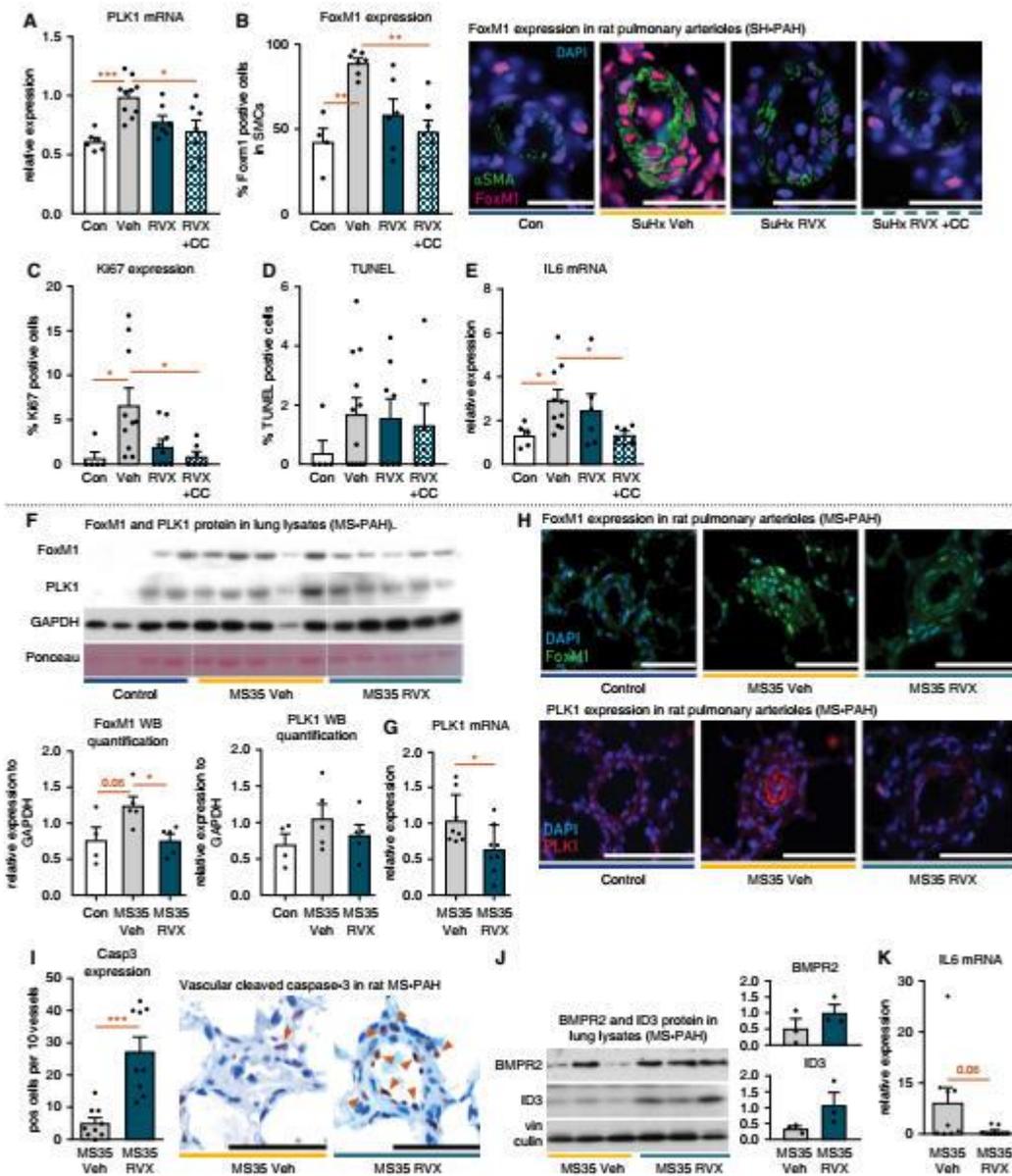
As an additional verification of oral RVX208 bioavailability at the 100 mg/kg dose, we used pulmonary and LV tissue of the RVX-treated rats in the PAB study to determine tissue exposure levels. Mean pulmonary exposure was  $2.1 \pm 1.8 \mu\text{M}$  and mean LV exposure was  $0.82 \pm 0.4 \mu\text{M}$  (Figure 6G), which is in the same range as the maximum plasma concentration at the desired clinical dose.

## Discussion

We described the union of two independent preclinical trials in three independent research laboratories that explored the therapeutic potential of the clinically available BET inhibitor RVX208 in PAH. Together, we confirmed that BRD4, the best studied member of the BET family, is upregulated in the remodeled pulmonary vasculature of patients with PAH, where it regulated the expression of the oncogene PLK1 and FoxM1, a DDR protein implied in vascular remodeling in PAH (10, 19, 20). BET inhibition by RVX208 normalized the hyperproliferative, apoptosis-resistant, and proinflammatory phenotype of MVECs and SMCs isolated from patients with PAH. At a clinically relevant dose, RVX208 reversed vascular remodeling in multiple complementary preclinical models of PAH, and could be combined safely with current PAH therapy. Finally, we showed that RVX208 supports the pressure-loaded RV in rats, indicating a beneficial, dual mode of action for patients with PAH-associated RV pressure overload.

BET proteins, such as BRD4, can be recruited to the DNA in a variety of pathologic circumstances, such as in cancer or inflammatory and cardiovascular diseases (5, 6, 21, 22). BRD4 recruitment has a common association with compromised DNA integrity (3) or genotoxic conditions, such as replicative, oncogenic, or oxidative stress (8, 23, 24). As an epigenetic reader, BRD4 is able to sense double strand breaks in the DNA where it elicits a DDR by stimulating  $\gamma\text{H2AX}$  signaling (3), leading to survival rather than apoptosis of the cell. Although an effective DDR is crucial in normal physiology to repair DNA and prevent apoptosis after DNA damage, persistent DDR activation (e.g., by BRD4) during chronic genotoxic conditions can lead to aberrant DNA repair and to survival of cells with genomic abnormalities (2). In these cells, BRD4 can further modulate the chromatin landscape (3), and enable transcription of a context-dependent, yet

Figure 4. (Continued). The *in vivo* intervention study with RVX208 in MCT + shunt rats (MS-PAH). (H) Quantification of vascular occlusion and hemodynamics. (I) EVG staining. Top: representative examples of vascular lesions. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . Bottom: overview of the MS-PAH lung, showing fewer occluded vessels in RVX208-treated rats. Scale bars, 500  $\mu\text{m}$ . (J) Quantification of fibrosis in the whole lung. (K) Masson staining showing increased fibrosis in the vessel wall of vehicle-treated rats. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ . Data are represented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis test. Significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ . CC = contemporary care (masticatory/vascular); Con = control; MCT = monocrotaline; PVR = pulmonary vascular resistance; sRVP = systolic right ventricular pressure; Veh = vehicle (5% DMSO).



**Figure 5.** *In vivo* effects of RVX208 on FoxM1, PLK1, proliferation, apoptosis, inflammation, and bone morphogenic protein signaling. (A–E) Canadian Sugen-hypoxia rats-pulmonary arterial hypertension (PAH) study. (F–K) Dutch monocrotaline/shunt-PAH study. (A) PCR for PLK1 mRNA in whole-lung lysates. (B) FoxM1 staining (pink) and quantification of pulmonary vascular FoxM1 expression. Smooth muscle cells are stained in green. The dashed line denotes RVX+ contemporary care. (C) Quantification of pulmonary vascular Ki67 expression (proliferation). (D) Quantification of pulmonary vascular

characteristic profile of proproliferative, prosurvival (25), and/or proinflammatory factors (9). These data indicated BRD4 as an essential driver of DNA damage-associated pathologies. Substantial evidence indicates that DNA damage and prolonged DDR activation are also implied in PAH (26). DDR proteins, such as  $\gamma$ H2AX, 53BP1, and PARP1, are upregulated in the pulmonary vasculature of patients with PAH (1), and many of the known triggers for PAH cause genotoxic stress. These include acute genotoxic hits, such as alkylating chemotherapy, toxins, or irradiation, or chronic genotoxicity as in inflammatory disease, such as systemic sclerosis, schistosomiasis, or HIV. Persistent BMPR2 downregulation, such as in BMPR2-mutant PAH or as occurs in situations of chronically disturbed shear stress (27), also compromises DNA integrity through loss of normal DNA repair mechanisms (2).

Taken together, these data suggested that modulating the DDR by BRD4 inhibition could be beneficial for patients with PAH. This was first established by inhibiting BRD4 specifically via JQ1 and siRNA in the SH rat (7). JQ1 and siRNA both improved pulmonary hemodynamics and reversed vascular remodeling, which was associated with reduced apoptosis resistance and proliferation (7). In other work, we showed that inhibition of FoxM1, another master regulator of the DDR associated with ineffective DNA repair (28), reversed SH and MCT-PAH in a similar fashion (10). This underlined the importance of the BRD4-FoxM1 axis in PAH. Here, we confirmed once more that BRD4 and FoxM1 are upregulated in PAH. As reported in cancer cells (11), and for the first time in PAH, we show that BRD4 and FoxM1 regulate the expression of PLK1, an oncogene involved in the proliferation-apoptosis (im)balance (Figure 2D). In cancer, where PLK1 is commonly overexpressed (16), it is thought that PLK1 promotes tumorigenesis by stimulating

survival, cell-cycle reentry, and proliferation (29). We hypothesized that this characteristic could also be relevant to the PAH-context, and confirmed PLK1 overexpression in isolated PAH-SMCs and in the remodeled PAH vasculature (Figures 2B and 2C). We further demonstrated that specific inhibition of PLK1 by siRNA or the PLK1 inhibitor BI6727 decreased the cancer-like phenotype of SMCs in PAH (see Figure E3).

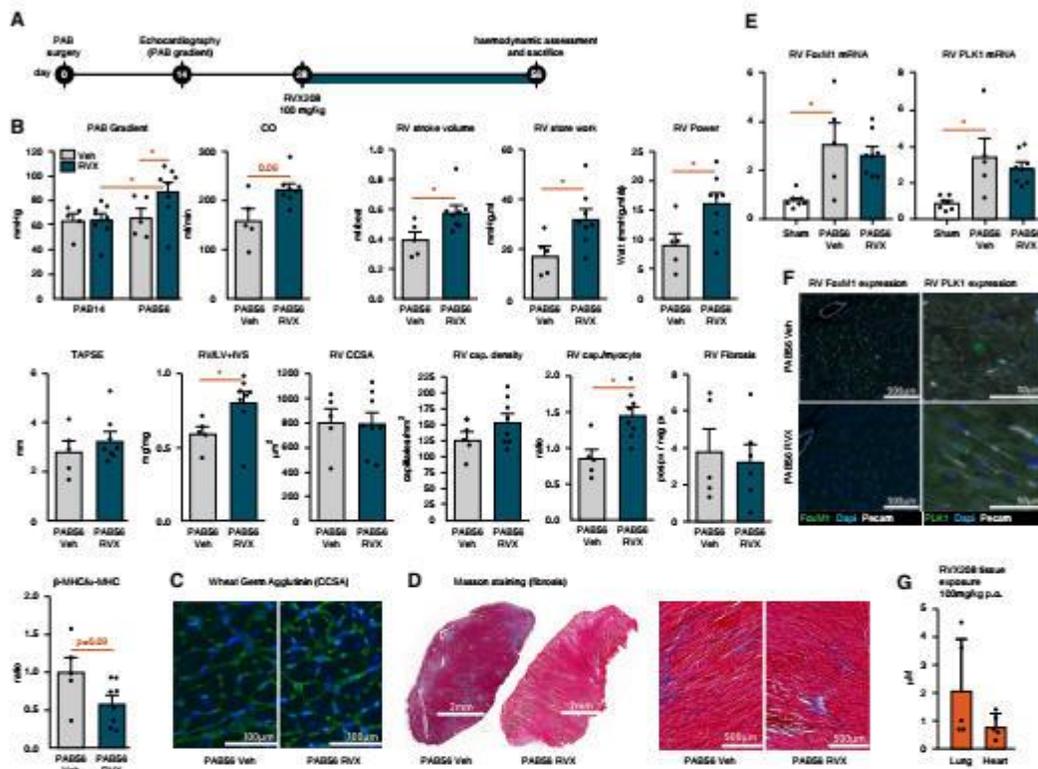
Patients with PAH are in critical need of new, directly applicable treatment strategies that are able to reverse advanced vascular remodeling and are safe in context of RV failure. Contemporary treatment is aimed mainly at vasodilation and slows down the progression of vascular occlusion at best. The BRD4 inhibitor JQ1 held promise for treatment of end-stage PAH (7), but is not suitable for clinical use. We therefore chose RVX208 as a clinically relevant, orally available inhibitor of the BET-family that includes BRD4. *In vitro*, RVX208 reduced PAH-SMC proliferation and survival as effectively as BRD4- and PLK1-siRNA, or PLK1 inhibition by BI6727 (Figures 3E and 3F). RVX208 had a comparable effect on proliferation and survival in PAH-MVECs (Figures 3B–3D). Additionally, RVX208 was able to normalize the proinflammatory phenotype observed in PAH-MVECs (Figures 3L–3N), which is in line with the results of RVX208 treatment in proinflammatory endothelial cells and SMCs in atherosclerosis (30). Interestingly, inflammation and BRD4 were also recently implicated in coronary artery remodeling in patients with PAH, suggesting that BRD4 inhibition may have beneficial effects beyond the pulmonary circulation in PAH (31). A novel finding in this study was that RVX208 also increased BMPR2 signaling in PAH-MVECs, or restored the TGF $\beta$ -BMP balance in healthy MVECs after disturbance by TNF $\alpha$ , a genotoxic hit known to downregulate BMPR2 in

endothelial cells and predispose to PAH (Figures 3H–3J) (32). This was an unexpected positive contribution of RVX208 in restoring the PAH phenotype on top of the more commonly known actions of BRD4 inhibition.

*In vivo*, we have shown that a 4-week treatment with RVX208 at a clinically relevant dose (Figure 6G) significantly reduced vascular occlusion and improved hemodynamics in two independent rat studies with SH PAH (Figures 4A–4F), which was as effective as treatment with JQ1 or BRD4-siRNA in previous work (7). To improve translatability to the clinic, we showed that RVX208 can be combined safely with contemporary standard of care (tadalafil and macitentan). However, RVX208 contributed to the most profound beneficial effects, particularly with regard to vascular remodeling (Figure 4B), indicating that RVX208 alone might also suffice. The MCT-shunt rat studies showed that short-term treatment with RVX208 already improves severe neointimal vascular remodeling, even with the shunt still in place (Figure 4H). Importantly, together these data demonstrated that the beneficial effects of RVX208 were not PAH model specific.

We finally investigated the effect of RVX208 treatment on the RV during pressure load, primarily to ensure safety of the drug in the context of RV dysfunction. Interestingly, FoxM1 and PLK1 mRNA were also significantly increased by pressure load in the rat RV, indicating a potential role for BRD4-FoxM1-PLK1 signaling in RV pathology as well (Figures 6E and 6F). We found that RVX208 treatment stimulated physiologic RV adaptation, which increased RV power (Figure 6B), suggesting that RVX208 treatment could be beneficial in patients with PAH-associated RV dysfunction, in addition to the effects on the pulmonary vasculature. Longer term studies may determine whether RVX208 can prevent or reverse the development of RV failure during pressure load. Our data are consistent with the results of BRD4 inhibition by JQ1 in physiologic LV

Figure 5. (Continued). TUNEL expression (apoptosis). (E) PCR for IL-6 mRNA in whole-lung lysates. (F) Western blots and quantification for FoxM1 and PLK1 protein in total lung lysates. (G) PCR for PLK1 mRNA in whole-lung lysates. (H) FoxM1 and PLK1 expression in rat pulmonary arterioles. Scale bars, 50  $\mu$ m. (I) Staining (brown, arrowheads) and quantification of pulmonary vascular Cleaved Caspase-3 expression (apoptosis). (J) Western blot and quantification for BMPR2 and ID3 in whole-lung lysates. (K) PCR for IL-6 mRNA in whole-lung lysates. Data are represented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney U or Kruskal-Wallis test. Significant differences: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.001$ , and \*\*\* $P < 0.0001$ .  $\alpha$ -SMA =  $\alpha$ -smooth muscle actin; CC = contemporary care (macitentan/tadalafil); Con = control; MS = monocrotaline/shunt; SH = Sugen-hypoxia; SMC = smooth muscle cell; Veh = vehicle (DMSO).



**Figure 6.** RVX208 supports right ventricular (RV) function during increased pressure load. (A) Experimental design for the *in vivo* intervention study with RVX208 in the rat pulmonary artery banding (PAB) model for isolated RV pressure load. (B) Hemodynamic and histologic evaluation. (C) Wheat germ agglutinin staining for cardiomyocyte cross-sectional area measurement. (D) Masson staining for fibrosis assessment. (E) PCR for FoxM1 and PLK1 mRNA in whole RV lysates. (F) Staining for FoxM1 and PLK1 (both in green) in RV tissue of PAB rats. (G) Tissue exposure levels for RVX208 at 100 mg/kg concentration administered via drinking water in 5% DMSO. The desired clinical dose is between 1 and 2  $\mu$ M. Data are represented as mean  $\pm$  SD. Statistical differences were assessed by Mann-Whitney *U* or Kruskal-Wallis test. Significant differences: \**P* < 0.05. Cap = capillary; CCSA = cross-sectional area measurement; CO = cardiac output; MHC = myosin heavy chain; RV(LV + IVS) = right ventricular to left ventricular + intraventricular septal weight ratio; TAPSE = tricuspid annular plane systolic excursion; Veh = vehicle (DMSO).

remodeling, where treatment did not suppress LV adaptation because of high-intensity exercise in mice. In mice with severe LV failure caused by pressure load and myocardial infarction, JQ1 treatment improved LV function; reduced LV fibrosis; and repressed a spectrum of heart failure and fibrosis-associated genes, including TGF $\beta$  and NF $\kappa$ B (6). Overall, interfering with the BRD4 pathway does not limit the ventricular response to increased afterload, and may even enhance its adaptation.

The present study is the first to implement the methodologic rigor preconized in PAH preclinical confirmatory studies to increase the reproducibility and translatability of preclinical research, including independent replication, use of multiple animal models, treatment on top of CC, and assessment of direct effects on the RV, as published recently (12).

In conclusion, we describe the unified results of the first multicenter randomized preclinical trial performed in three independent laboratories that confirmed the

therapeutic potential of the clinically available BET inhibitor RVX208 in various PAH rodent models. We also report that RVX208 modulates the proliferative, prosurvival, and proinflammatory pathways by direct interaction with FoxM1 and PLK1. This reversed the PAH phenotype in isolated PAH-MVECs and SMCs, reversed vascular remodeling in two complementary preclinical PAH models, and supported the pressure loaded RV. Taken together, these data support the establishment of a clinical trial with RVX208 in patients with PAH. ■

Author disclosures are available with the text of this article at [www.atsjournals.org](http://www.atsjournals.org).

**Acknowledgment:** Michel Weij and Annemieke van Oosten of the University Medical Center Groningen are acknowledged for performing

the aortocaval shunt surgery and hemodynamic measurements. Xiaoke Pan of the VU Medical Center in Amsterdam is acknowledged for optimizing the human microvascular endothelial cell culture. Tom van Leusden is acknowledged for his laboratory work in

the University Medical Center Groningen. Tiago Guimarães Ferraz (Leiden University Medical Center) is acknowledged for his work with the human pulmonary microvascular endothelial cells and immunofluorescent analysis.

## References

- Meloche J, Pfeiffer A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, et al. Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2014;129:786-797.
- Li M, Vattulainen S, Aho J, Orcholski M, Rojas V, Yuan K, et al. Loss of bone morphogenetic protein receptor 2 is associated with abnormal DNA repair in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2014;50:1118-1128.
- Floyd SR, Pacold ME, Huang Q, Clarke SM, Lam FC, Cannell IG, et al. The bromodomain protein Brd4 insulates chromatin from DNA damage signalling. *Nature* 2013;498:246-250.
- Gilham D, Wasiaik S, Tsujikawa LM, Halliday C, Norek K, Patel RG, et al. Corrigendum to "RVX-208, a BET-inhibitor for treating atherosclerotic cardiovascular disease, raises ApoA-I/HDL and represses pathways that contribute to cardiovascular disease" [Atherosclerosis 247 (2016) 48-57]. *Atherosclerosis* 2016;253:345.
- Hajmirza A, Emadali A, Gauthier A, Casasnovas O, Gressin R, Callanan MB. BET family protein BRD4: an emerging actor in NF- $\kappa$ B signaling in inflammation and cancer. *Biomedicines* 2018;6:16.
- Duan Q, McMahon S, Anand P, Shah H, Thomas S, Salunga HT, et al. BET bromodomain inhibition suppresses innate inflammatory and profibrotic transcriptional networks in heart failure. *Sci Transl Med* 2017;9:eash5094.
- Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, et al. Bromodomain-containing protein 4: the epigenetic origin of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2015;117:525-536.
- Zhang J, Dulak AM, Hattersley MM, Willis BS, Nikkälä J, Wang A, et al. BRD4 facilitates replication stress-induced DNA damage response. *Oncogene* 2018;37:3763-3777.
- Tasdemir N, Barito A, Roe JS, Alonso-Curbelo D, Camilo M, Tschaharganeh DF, et al. BRD4 connects enhancer remodeling to senescence immune surveillance. *Cancer Discov* 2016;6:612-629.
- Bourgeois A, Lambert C, Habbout K, Ranchoux B, Paquet-Marceau S, Trinh I, et al. FOXM1 promotes pulmonary artery smooth muscle cell expansion in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2018;96:223-235.
- Zhang Z, Ma P, Jing Y, Yan Y, Cai M-C, Zhang M, et al. BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy in ovarian cancer by downregulating FoxM1. *Theranostics* 2016;6:219-230.
- Provencher S, Archer SL, Ramirez FD, Hibbert B, Paulin R, Boucherat O, et al. Standards and methodological rigor in pulmonary arterial hypertension preclinical and translational research. *Circ Res* 2018;122:1021-1032.
- van Albada ME, Schoemaker RG, Kemna MS, Cromme-Dijkhuis AH, van Veghel R, Berger RM. The role of increased pulmonary blood flow in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005;26:487-493.
- Borgdorff MAJ, Koop AMC, Bloks VW, Dickinson MG, Steendijk P, Sille HWW, et al. Clinical symptoms of right ventricular failure in experimental chronic pressure load are associated with progressive diastolic dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 2015;79:244-253.
- Borgdorff MA, Bartelds B, Dickinson MG, Steendijk P, de Vroomen M, Berger RM. Distinct loading conditions reveal various patterns of right ventricular adaptation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;305:H354-H364.
- Strebhardt K, Ullrich A. Targeting polo-like kinase 1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2006;6:321-330.
- Levy PT, Patel MD, Groh G, Choudhry S, Murphy J, Holland MR, et al. Pulmonary artery acceleration time provides a reliable estimate of invasive pulmonary hemodynamics in children. *J Am Soc Echocardiogr* 2016;29:1056-1065.
- Dickinson MG, Kowalski PS, Bartelds B, Borgdorff MAJ, van der Feen D, Sietsma H, et al. A critical role for Egr-1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 2014;103:573-584.
- Kuo P-L, Lee H, Bray M-A, Geisse NA, Huang Y-T, Adams WJ, et al. Myocyte shape regulates lateral registry of sarcomeres and contractility. *Am J Pathol* 2012;181:2030-2037.
- Reddy S, Bernstein D. Molecular mechanisms of right ventricular failure. *Circulation* 2015;132:1734-1742.
- Dai Z, Zhu MM, Peng Y, Jin H, Machireddy N, Qian Z, et al. Endothelial and smooth muscle cell interaction via FoxM1 signaling mediates vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2018;198:788-802.
- Dai J, Zhou Q, Tang H, Chen T, Li J, Raychaudhuri P, et al. Smooth muscle cell-specific FoxM1 controls hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Cell Signal* 2018;51:119-129.
- Zanonato F, Battilana G, Forcato M, Filippi L, Azzolin L, Mantrin A, et al. Transcriptional addiction in cancer cells is mediated by YAP/TAZ through BRD4. *Nat Med* 2018;24:1599-1610.
- Das S, Senapati P, Chen Z, Reddy MA, Ganguly R, Lanting L, et al. Regulation of angiotensin II actions by enhancers and super-enhancers in vascular smooth muscle cells. *Nat Commun* 2017;8:1467.
- Belkina AC, Denis GV. BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* 2012;12:465-477.
- Ranchoux B, Meloche J, Paulin R, Boucherat O, Provencher S, Bonnet S. DNA damage and pulmonary hypertension. *Int J Mol Sci* 2016;17:E990.
- van der Feen DE, Bartelds B, de Boer RA, Berger RMF. Pulmonary arterial hypertension in congenital heart disease: translational opportunities to study the reversibility of pulmonary vascular disease. *Eur Heart J* 2017;38:2034-2041.
- Zona S, Bella L, Burton MJ, Nestal de Moraes G, Lam EW-F. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. *Biochim Biophys Acta* 2014;1839:1316-1322.
- Combes G, Alharbi I, Braga LG, Elowe S. Playing polo during mitosis: PLK1 takes the lead. *Oncogene* 2017;36:4819-4827.
- Jahagirdar R, Zhang H, Azhar S, Tobin J, Atwell S, Yu R, et al. A novel BET bromodomain inhibitor, RVX-208, shows reduction of atherosclerosis in hyperlipidemic ApoE deficient mice. *Atherosclerosis* 2014;236:91-100.
- Meloche J, Lampron MC, Nadeau V, Maltais M, Potus F, Lambert C, et al. Implication of inflammation and epigenetic readers in coronary artery remodeling in patients with pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2017;37:1513-1523.
- Hurst LA, Dunmore BJ, Long L, Crosby A, Al-Lamki R, Deighton J, et al. TNF $\alpha$  drives pulmonary arterial hypertension by suppressing the BMP type-II receptor and altering NOTCH signalling. *Nat Commun* 2017;8:14079.