



HAL
open science

De la dysfonction endothéliale à la dysfonction immunitaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvelles cibles d'innovation thérapeutique

Alice Huertas

► **To cite this version:**

Alice Huertas. De la dysfonction endothéliale à la dysfonction immunitaire dans l'hypertension artérielle pulmonaire : nouvelles cibles d'innovation thérapeutique. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA114824 . tel-01124132

HAL Id: tel-01124132

<https://theses.hal.science/tel-01124132>

Submitted on 6 Mar 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE DOCTORAT

Soutenue le 02/10/2013

Par

Alice HUERTAS

**De la dysfonction endothéliale
à la dysfonction immunitaire dans
l'Hypertension Artérielle Pulmonaire:
nouvelles cibles d'innovation thérapeutique**

Composition du jury

Directeur de Thèse

Professeur Marc HUMBERT

Co-directeur de Thèse

Docteur David MONTANI

Président

Professeur Gérald SIMONNEAU

Rapporteurs

Professeur Pascal CHANEZ

Professeur Antoine MAGNAN

Examineurs

Professeur Bruno CRESTANI

Professeur Anh Tuan DINH-XUAN

*A Pierantonio,
à Elisa*

REMERCIEMENTS

A mon Directeur de thèse, le Professeur Marc HUMBERT, pour l'accueil qu'il m'a réservé et la chance qu'il m'a offerte de travailler au sein de son équipe. Merci surtout pour la rigueur scientifique de ces conseils, son soutien qui m'est précieux et la confiance qu'il m'accorde.

A mon co-Directeur de thèse, le Docteur David MONTANI, pour avoir accepté de co-diriger ma thèse et pour l'aide qu'il m'apporte dans la réalisation de mes projets.

Aux membres du Jury,

Au Professeur Gérald SIMONNEAU, pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le Jury.

Aux Professeurs Pascal CHANEZ et Antoine MAGNAN, pour avoir accepté d'être rapporteurs de ma thèse et pour le temps qu'ils ont consacré à l'évaluation de mon travail.

Aux Professeurs Bruno CRESTANI et Anh Tuan DINH-XUAN pour avoir accepté d'être examinateurs et de juger mon travail.

Au Docteur Christophe GUIGNABERT, pour son aide précieuse dans ces projets et pour le travail stimulant mené ensemble grâce à sa rigueur et finesse scientifiques. Merci surtout pour son amitié qui m'est très chère.

Au Docteur Ly TU, pour son aide et soutien inconditionnels ainsi que pour sa rigueur scientifique. Merci aussi pour son amitié précieuse et nos fous rires.

Au laboratoire où j'ai effectué ma thèse, merci à Morane Le Hiress, Carole Phan, Nicolas Ricard, Caroline Sattler, Andrei Seferian et Raphaël Thuillet pour leur aide précieuse. Merci aussi à Marie-Camille Chaumais-Pierre, Barbara Girerd et Frédéric Perros.

A tous les membres de l'Unité U999, à Gilles Bru-Mercier, Véronique Capuano, Sylvia Cohen-Kaminsky, Peter Dorfmueller, Sébastien Dumas, Yvonne Dutheil, Natacha Gambaryan, Michèle German-Fattal, Elodie Gouadon, Isabelle Klingelschmitt, Florence Lecerf, Benoit Ranchoux, Jean-François Renaud de la Faverie, Yann Ruchon et Catherine Rucker-Martin.

Aux membres de l'équipe clinique et de l'hôpital de jour, Véronique Colas des Francs, Gilles Garcia, Sven Günther, Xavier Jaïs, Roland Jovan, Isabelle Lecut, Florence Parent, Frédéric Prévotat, Dominique Samain, Laurent Savale, Olivier Sitbon et Azzedine Yaïci.

A toutes les personnes qui ont été de passage dans l'équipe, en particulier Julie Traclet.

Au Professeur Paolo Palange, pour m'avoir initiée à la recherche et pour son amitié.

Au Professeur Jahar Bhattacharya, mon mentor.

A mes amis, à Francesca et Guillaume, toujours présents.

A ma famille, Emmanuel, Vincent et Cécile, et à mes parents, pour tout.

A Pierantonio et à Elisa, ma force.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS.....	5
RESUME	6
INTRODUCTION.....	7
A. GENERALITE SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE.....	8
1. Le lit vasculaire : unique de part sa structure et sa fonction.....	8
2. Structure des artères pulmonaires.....	9
B. HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	11
1. Généralités sur l'hypertension artérielle pulmonaire.....	11
1.1. Définition.....	11
1.2 Classification et épidémiologie.....	11
1.3. Diagnostic.....	14
1.4. Prise en charge thérapeutique.....	14
1.4.1 Traitement médical.....	15
1.4.1.1 Les bloqueurs calciques.....	16
1.4.1.2 Prostacyclines et analogues.....	16
1.4.1.3 Les inhibiteurs de la voie de l'endothéline (ET)-1.....	17
1.4.1.4 Les inhibiteurs de la Phosphodiesterase (PDE)-5	17
1.4.1.5 En cours de développement et/ou d'étude en phase clinique.....	17
1.4.2. Traitement chirurgical.....	19
1.4.2.1. Transplantation pulmonaire.....	19
1.4.2.2. Thromboendartériectomie pulmonaire.....	19
1.4.2.3. Interventions palliatives	20
2. Anatomie pathologique de l'HTAP.....	20
3. Physiopathologie de l'HTAP.....	23
3.1. Remodelage vasculaire pulmonaire.....	23
3.1.1. Rôle des cellules endothéliales pulmonaires et de la dysfonction endothéliale	23
3.1.1.1. Déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction	25
3.1.1.2. Communications intercellulaires aberrantes de la CE HTAP	29
3.1.1.3. Anomalies de la coagulation.....	33
3.1.1.4. Les anomalies endothéliales intrinsèques.....	37
3.1.2. Les cellules musculaires lisses pulmonaires.....	38
3.1.3. Les fibroblastes pulmonaires des parois vasculaires.....	39
3.1.4. Le remodelage de la MEC.....	40
3.2. L'inflammation et les réponses immunes dans l'HTAP	40
3.3. Les facteurs de croissance	41
3.3.1 Voie de signalisation du Platelet Derived Growth Factor (PDGF)	41
3.3.2 Voie de signalisation du Fibroblast Growth Factor (FGF)	42
3.3.3 Voie de signalisation de l'Epidermal Growth Factor (EGF)	43
3.3.4 Voie de signalisation du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	44
3.3.5. Voie de signalisation de la Sérotonine (5-HT)	46
3.3.6 Autres voies de signalisation émergentes.....	48
3.4. Les cellules progénitrices.....	48
3.5. Les acteurs moléculaires impliqués dans les changements métaboliques.....	49
3.6. Aspects génétiques et environnementaux	50
3.6.1 Le gène <i>BMPR-2</i>	50

3.6.1.1	Fonction cellulaire et la voie de signalisation BMPR-II.....	50
3.6.1.2	Les mutations <i>BMPR2</i> dans l'HTAP.....	51
3.6.2.	Les autres gènes impliqués dans l'HTAP.....	53
3.6.2.1	Les gènes <i>ACVRL1</i> et <i>ENG</i>	53
3.6.2.2	Le gène <i>Smad9</i>	54
3.6.3	Les facteurs environnementaux.....	54
4.	Modèles animaux d'étude l'HTAP.....	56
4.1.	Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (MCT) chez le Rat.....	57
4.2.	Hypertension pulmonaire hypoxique chez les rongeurs (rats/souris)	59
4.3.	Modèle d'HTP induite par le SUGEN 5416 + hypoxie (SuHx)	60
4.4.	Modèles animaux d'hypertension pulmonaire sur shunt.....	61
4.5	Animaux transgéniques et hypertension pulmonaire.	61
C.	SYSTEME IMMUNITAIRE ET AUTOIMMUNITE DANS L'HTAP.....	63
1.	Système immunitaire.....	63
2.	Les cellules de l'immunité.....	64
2.1.	Cellules de l'immunité innée.....	64
2.2.	Cellules de l'immunité adaptative.....	65
2.2.1.	Les lymphocytes B.....	65
2.2.2.	Les lymphocytes T.....	66
2.2.2.1.	Les lymphocytes CD4 ⁺ et CD8 ⁺	66
2.2.2.2.	Les lymphocytes T NK (NKT)	67
2.2.2.3.	Importance des lymphocytes T régulateurs dans l'immunité	67
2.2.2.3.1.	Tolérance du soi et autoimmunité.....	67
2.2.2.3.2.	Les lymphocytes T régulateurs (Treg)	68
3.	Les molécules de l'immunité.....	71
3.1.	Les molécules d'adhésion.....	71
3.2.	Les cytokines.....	72
3.3.	Les chimiokines.....	73
4.	Dysfonction immunitaire et HTAP.....	73
4.1.	Dysfonction de l'immunité innée.....	73
4.2.	Dysfonction de l'immunité adaptative : l'autoimmunité dans l'HTAP.....	75
D.	COMMUNICATION ENTRE ENDOTHELIUM PULMONAIRE ET SYSTEME IMMUNITAIRE	77
1.	Communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules inflammatoires.....	78
2.	Communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules de l'immunité adaptative : exemple des lymphocytes T régulateurs.....	79
2.1.	La leptine.....	79
2.1.1.	Structure, récepteurs et voies de signalisation.....	79
2.1.2.	Biosynthèse.....	81
2.1.3.	Fonctions.....	82
2.1.4.	Mécanismes centraux.....	83
2.1.5.	Mécanismes périphériques.....	85
2.1.6.	Effets de la leptine sur le système immunitaire inné.....	85
2.1.7.	Effets de la leptine sur les réponses immunes de type adaptatif.....	87
2.2.	Implication de la leptine au cours de certaines situations pathologiques.....	89
2.2.1.	Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques.....	89
2.2.2.	Rôle de la leptine au cours de certaines maladies autoimmunes.....	91
	HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS.....	117
	MATERIELS ET METHODES.....	120
A.	Prélèvements humains	121
1.	Prélèvements sanguins.....	121

2. Echantillons pulmonaires.....	121
2.1. Isolement de cellules endothéliales micro-vasculaires	122
2.2. Isolement de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires.....	122
B. Modèles expérimentaux.....	123
1. Hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique chez le rat	123
2. Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat.....	123
3. Mesures hémodynamiques chez le rat.....	123
4. Traitements.....	124
C. Cytométrie en flux	124
1. Principes de cytométrie en flux.....	124
2. Isolement des lymphocytes.....	125
3. Analyse spécifique par immunofluorescence	125
D. Etude de l'expression génique	125
1. Principe de la PCR quantitative.....	126
2. Extraction d'ARNm et rétro-transcription.....	126
3. PCR et quantification.....	126
E. Etude de l'expression protéique	127
F. Immunomarquage	127
1. Marquages immunohistochimiques.....	127
2. Marquages immunofluorescents.....	128
3. Marquages immunocytologiques	128
G. Etude de prolifération cellulaire	128
1. Evaluation de la prolifération par l'incorporation de BrdU	128
2. Evaluation par comptage cellulaire.....	129
H. Transfection cellulaire	129
I. Etude de la migration cellulaire	129
J. Dosages immuno-enzymatiques	130
K. Analyses statistiques	130
TRAVAUX	131
DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	208
TRAVAUX ANNEXES ET COLLABORATIFS	214
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	229
CV ABREGE ET LISTE DE PUBLICATIONS.....	251

LISTE DES ABREVIATIONS

Ang	Angiopoietin
BMPR	Bone morphogenetic protein receptor
CD	Cluster of differentiation
CE	Cellule endothéliale
CML	Cellule musculaire lisse
DCA	Dichloroacétate
FGF	Fibroblast growth factor
FoxP3	Forkhead box P3
HIF	Hypoxia inducible factor
HTP	Hypertension pulmonaire
HTAP (i)	Hypertension artérielle pulmonaire (idiopathique)
IL	Interleukine
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCP	Monocyte chemoattractant protein
MEC	Matrice extracellulaire
MIF	Macrophage migration inhibitory factor
MMP	Matrix metalloproteinase
NK	Natural killer
NO	Monoxyde d'azote
NYHA	New York Heart Association
Ob (R)	Leptin (Receptor)
PAP	Pression artérielle pulmonaire
PDGF	Platelet-derived growth factor
RVP	Résistances vasculaires pulmonaires
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TGF	Transforming growth factor
Th	T helper
TNF	Tumor necrosis factor
Treg (n/i)	Lymphocyte T régulateur (inducible/natural)
VEGF	Vascular endothelial growth factor
vWf	von Willebrand factor

RESUME

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave caractérisée par une obstruction progressive des artères pulmonaires de petit calibre, conduisant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et, à terme, à une défaillance cardiaque droite et au décès du patient. La vasoconstriction, le remodelage vasculaire et la dysfonction endothéliale pulmonaire sont autant de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la maladie. Plusieurs arguments sont également en faveur d'une hypothèse de désordres immunologiques, voire autoimmuns, dans la physiopathologie de l'HTAP. Malgré ces données, le lien entre endothélium pulmonaire et système immunitaire dans cette maladie restent peu connus.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif d'**étudier et mieux comprendre la nature et les conséquences d'une communication aberrante entre cellules endothéliales pulmonaires et système immunitaire dans la pathogénèse de l'HTAP**, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous avons analysé le rôle de la dysfonction endothéliale dans la régulation de deux processus de la dysfonction immunitaire : l'autoimmunité pour la réponse adaptative d'une part, et la sécrétion de cytokines en ce qui concerne la réponse innée d'autre part.

A travers ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'existence d'une communication aberrante entre endothélium pulmonaire et système immunitaire dans l'HTAP et montré que l'endothélium pulmonaire jouait un rôle primordial dans le contrôle des réponses adaptatives, en régulant la fonction des lymphocytes T régulateurs *via* la leptine, et dans la participation active à la réponse innée, en acquérant un phénotype pro-inflammatoire.

Cette meilleure compréhension du rôle de la dysfonction endothéliale dans la dérégulation du système immunitaire présente dans l'HTAP pourrait aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette maladie.

Mots clés : HTAP ; dysfonction endothéliale ; système immunitaire ; lymphocytes T régulateurs ; leptine ; hypoxie ; modèles animaux ; innovation thérapeutique.

INTRODUCTION

A. GENERALITE SUR LA CIRCULATION PULMONAIRE

1. Le lit vasculaire : unique de part sa structure et sa fonction

La circulation sanguine pulmonaire s'effectue au travers de deux systèmes : la circulation pulmonaire et la circulation bronchique (systémique). La circulation pulmonaire, issue du cœur droit, permet les échanges gazeux dans les poumons. Le sang veineux quitte le cœur droit par l'artère pulmonaire, qui se divise successivement pour donner les artérioles pulmonaires donnant naissance aux capillaires pulmonaires. Le réseau de capillaires pulmonaires tapisse la paroi des alvéoles et assure les échanges gazeux au travers de la barrière alvéolo-capillaire permettant la ré-oxygénation du sang. Le sang riche en oxygène (O₂) est d'abord collecté dans les petites veines pulmonaires qui rejoignent ensuite les veines pulmonaires et le cœur gauche.

Le lit vasculaire pulmonaire est unique de part sa structure et de part ses fonctions. Le poumon est le seul organe à recevoir 100% du débit cardiaque. De plus, la circulation pulmonaire est un système à faible pression, à faible résistance, haute densité et haut débit et ceci est principalement expliqué par deux caractéristiques essentielles propres : 1) une haute compliance des artérioles pré-capillaires qui s'explique par une paroi mince, constituée d'une monocouche de cellules endothéliales (CE) recouvrant une fine couche de cellules musculaires lisses (CML), alors que la paroi des vaisseaux systémiques est plus épaisse et très musclée; 2) une haute capacité à recruter des vaisseaux pour faire face à une augmentation de flux sanguin. En l'absence d'anomalies et en condition normoxique, la pression moyenne dans l'artère pulmonaire est de l'ordre de 14 ± 3 mm Hg. De plus, d'importantes variations locales de vaso-réactivité en réponse à divers stimuli, que se soit l'exposition à l'hypoxie (PaO₂ < 60mmHg (Fishman 1976) ou au monoxyde d'azote (NO), ont été clairement mises en évidence. Enfin, plus le diamètre des artères pulmonaires diminue, plus la réponse vaso-constrictrice est importante (Archer *et al.* 1996; Coppock *et al.* 2001). Cette réponse du lit vasculaire pulmonaire contraste avec la réponse obtenue avec des vaisseaux systémiques pour les mêmes stimuli. Bien que des distributions différentielles de certains canaux potassiques puissent expliquer ces différences, les mécanismes précis de ces particularités propres à la circulation pulmonaire restent encore à éclaircir.

2. Structure des artères pulmonaires

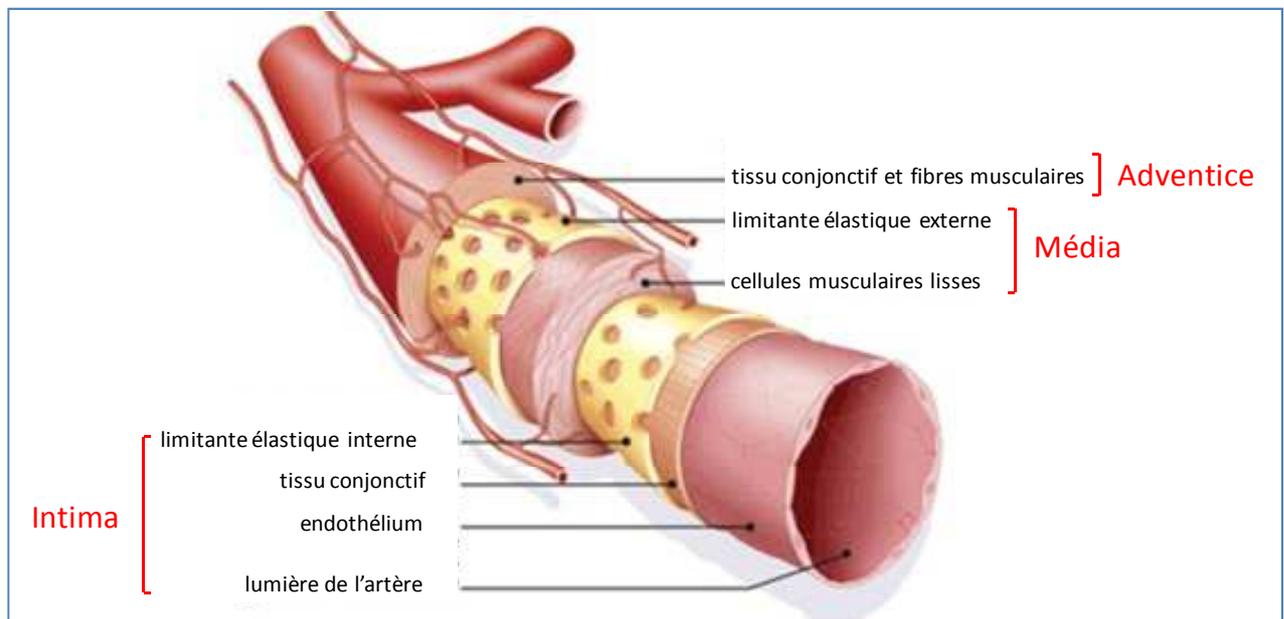


Figure 1 : Schéma illustrant la structure d'artère pulmonaire

La paroi artérielle est constituée de trois couches individualisées, de la lumière à la périphérie, l'intima, la média et l'adventice (Mulvany and Aalkjaer 1990) :

- l'intima, qui représente la couche la plus interne, est constituée d'une monocouche de CE et d'une membrane basale (collagène de type IV, laminine, glycoprotéines) (Figure 1). L'intima joue un rôle majeur d'interface entre le sang et la paroi artérielle. Les CE ont une fonction fibrinolytique, anti-thrombotique, elles permettent la modulation de la vasomotricité artérielle par la synthèse et la transmission de nombreuses substances vasoactives vers le muscle lisse sous-jacent. À la différence des veines qui sont flasques, les artères ne disposent pas de valves.
- la média est la couche centrale, la plus épaisse de la paroi artérielle (Figure 1). Dans les artères de gros calibre, elle est limitée par une lame élastique interne côté luminal (limitante d'élastine interne) et une lame élastique externe (limitante d'élastine externe) et se compose d'une succession de sous-

couches délimitées par les lames élastiques. Dans les artérioles, la lame élastique externe est fragmentée ou bien absente. La média est constituée essentiellement de CML. Ces cellules sont indispensables pour la relaxation et la contraction des artères.

- l'adventice représente la couche périphérique (Figure 1). Elle est essentiellement constituée de tissu conjonctif (élastine, collagènes), de fibroblastes, macrophages, terminaisons nerveuses et de *vasa vasorum*.

C'est sur cette structure en trois couches que reposent de nombreuses fonctions physiologiques, dont la principale est d'assurer l'échange gazeux. Il existe également de nombreuses interactions entre les différentes couches, plus particulièrement entre les CML et les CE, mais également avec les éléments du plasma et figurés du sang (plaquettes, globules rouges et blancs).

B. HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

1. Généralités sur l'hypertension artérielle pulmonaire

1.1. Définition

Le terme «hypertension pulmonaire» (HTP) décrit l'existence d'une élévation permanente de la pression dans la circulation pulmonaire. Elle se définit par une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25 mmHg au repos mesurée au cathétérisme cardiaque droit. Cette élévation accrue permanente entraîne une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires (RVP) et une défaillance ventriculaire droite.

1.2 Classification et épidémiologie

La classification des HTP, qui est régulièrement révisée au cours de congrès mondiaux, a pour objectif d'identifier des catégories de pathologies présentant des similitudes physiopathologiques, cliniques et de prise en charge thérapeutique. Le dernier congrès en date, le cinquième, qui s'est déroulé à Nice du 27 Février au 1^{er} Mars de cette année, n'a pas encore officialisé les mises à jour de la classification existante. Nous nous référons donc, dans ces travaux de thèse, à l'actuelle classification, proposée lors du quatrième congrès mondial de 2008 qui a eu lieu à Dana Point (Simonneau *et al.* 2009). Cette classification distingue cinq catégories d'HTP : l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) (groupe 1), l'hypertension pulmonaire due à une maladie du cœur gauche (groupe 2), hypertension pulmonaire due à une pathologie respiratoire chronique et/ou à une hypoxémie chronique (groupe 3), hypertension pulmonaire post-embolique chronique (groupe 4) et hypertension pulmonaire due à des mécanismes multifactoriels ou incertains (groupe 5) comme par exemple liés à des maladies hématologiques, la sarcoïdose, l'histiocytose X, la neurofibromatose, la lymphangioléiomyomatose, ou encore la compression extrinsèque des vaisseaux pulmonaires par des adénopathies, des tumeurs, ou une fibrose médiastinale.

Dans ces travaux de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au premier groupe de cette classification : les HTAP (**Groupe 1**) qui regroupent différentes maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre (< 500µm), principalement les petites artéoles précapillaires distales. Ces artéoles sont caractérisées par une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15mmHg, éliminant ainsi le diagnostic de cardiopathie gauche. Le registre national français a permis d'estimer la prévalence de l'HTAP à 15 cas par million d'habitants et l'incidence à 2,4 cas par million d'habitants par an (Humbert *et al.* 2006). Le diagnostic est souvent posé de façon retardée puisque 75% des patients ont une dyspnée d'effort en classe fonctionnelle III ou IV de la classification de la New York Heart Association (NYHA) au moment du diagnostic (Humbert *et al.* 2006).

Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en cinq principaux sous-groupes :

- **l'HTAP idiopathique (HTAPi)** définie par la survenue de la maladie en l'absence de facteurs de risque connus ou associés. Cette forme représente 39.2% des cas dans le registre français (Humbert *et al.* 2010). L'âge moyen au moment du diagnostic est de 52±15 ans avec une nette prédominance féminine (62%) (Humbert *et al.* 2006). L'HTAPi est généralement sévère sur le plan clinique et hémodynamique, avec une médiane de survie de 2,8 ans en l'absence de traitement (Humbert *et al.* 2006 ; Humbert *et al.* 2010)
- **l'HTAP héritable (HTAPh)**, définie par la transmission de la maladie à la descendance et/ou présence chez un patient d'une mutation d'un des gènes connus pour la prédisposition au développement de l'HTAP : *bone morphogenetic receptor (BMPR)2*, (Deng *et al.* 2000 ; Lane *et al.* 2000), *ACVRL1* (David *et al.* 2007), *ENG* (Chaouat *et al.* 2004), *SMAD9* (Nasim *et al.* 2011), *CAV1* (Austin *et al.* 2012) and *KCNK3* (Ma *et al.* 2013). Les mutations *BMPR2* sont les plus fréquentes et sont transmises par mode autosomique dominant mais la pénétrance en est toutefois faible (environ 20%) (Machado *et al.* 2009), si bien que la majorité des sujets porteurs de la maladie ne développera jamais la maladie. Des mutations sont retrouvées dans environ 70% des cas d'HTAPh mais également dans 10 à 30% des cas d'HTAPi. Sur le plan clinique, les patients atteints d'HTAPh ont une présentation clinique souvent plus sévère au

moment du diagnostic et répondent plus rarement aux vasodilatateurs en aigu par rapport aux patients atteints d'HTAPi (Humbert *et al.* 2006 ; Humbert *et al.* 2010)

- **l'HTAP associée à la prise de médicaments, drogues et toxines**, définie par la possible association entre exposition à des facteurs de risque connus et développement de l'HTAP. Ces facteurs de risque peuvent être définis comme certains, potentiels et probables, en fonction du type d'étude épidémiologique. Les facteurs de risque certains sont en premier lieu représentés par les anorexigènes comme l'aminorex et la fenfluramine. De larges études ont démontré une association entre anorexigènes et développement de l'HTAP (Fishman 2001; Simonneau *et al.* 2004) montrant que celle-ci augmentait avec la durée d'exposition et diminuait après l'arrêt mais pouvait survenir plusieurs années après la fin de l'exposition. D'autres substances comme la cocaïne et les amphétamines ont été identifiées comme facteurs de risque de l'HTAP. Sur le plan clinique, cette forme d'HTAP est comparable à l'HTAP (Souza *et al.* 2008)
- **l'HTAP associée à diverses pathologies** comme les connectivites, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'hypertension portale, les cardiopathies congénitales, la schistosomiase et l'anémie hémolytique chronique. Dans nos travaux, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'HTAP associée aux connectivites, notamment à la sclérodermie, qu'elle soit systémique ou sous forme cutanée limitée, qui représente la connectivite plus fréquemment compliquée d'HTAP. Deux études de registre récentes retrouvent une prévalence d'HTAP associée à la sclérodermie variant entre 7,8 et 12%, ce qui justifie un dépistage échographique annuel chez les patients atteints de sclérodermie (McGoon *et al.* 2004). Sur le plan clinique, cette forme est généralement sévère et de pronostic sombre (Hachulla *et al.* 2009) avec une réponse moins bonne aux traitements spécifiques de l'HTAP (Condliffe *et al.* 2009). De rares cas d'amélioration sous immunosuppresseurs ont été rapportés dans l'HTAP associée au lupus érythémateux et aux connectivites mixtes (Sanchez *et al.* 2006 ; Jaïs *et al.* 2008)
- **l'HTAP persistante du nouveau-né.**

A ces cinq sous-groupes, il faut associer **la maladie veino-occlusive pulmonaire et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire** qui sont caractérisées par une atteinte veinulaire

ou capillaire prédominante (**Groupe 1'**). Ces deux entités se différencient des autres formes d'HTAP par certaines spécificités thérapeutiques, comme le risque d'œdème pulmonaire en cas de traitement vasodilatateur par prostacycline intraveineuse, et par leur mauvais pronostic (Montani *et al.* 2009). Il existe toutefois de nombreuses similitudes cliniques et physiopathologiques avec les autres formes d'HTAP, en particulier avec les HTAPi, qui justifient leur inclusion dans le groupe 1. La sévérité de cette atteinte réside dans le risque d'aggravation, parfois mortelle, de cet œdème pulmonaire sous traitement vasodilatateur. Le diagnostic formel repose sur la biopsie pulmonaire qui n'est pas dénuée de risque chez ces patients. Une approche diagnostique non invasive est donc indispensable et fait appel au scanner thoracique : la présence et l'association d'épaississement des septa inter-lobulaires, de nodules centro-lobulaires, d'adénopathies médiastinales et d'épanchement pleural sont très suggestives de maladie veino-occlusive ou dhémangiomatose capillaire pulmonaire. L'existence de ces anomalies chez un patient présentant une HTAP doit faire compléter le bilan par la réalisation d'un lavage bronchoalvéolaire qui mettra en évidence une hémorragie alvéolaire occulte avec présence de sidérophages (Montani *et al.* 2009 ; Huertas *et al.* 2011).

1.3. Diagnostic

Le diagnostic d'une HTAP est évoqué dans deux cadres contextuels distincts : lors de l'exploration de symptômes, souvent peu spécifiques mais évocateurs d'une dyspnée d'effort inexpliquée ou d'une asthénie inhabituelle persistante, ou lors d'un dépistage devant une pathologie prédisposante identifiée.

La démarche diagnostique comprend le dépistage et /ou la suspicion diagnostique (échocardiographie), le diagnostic différentiel, la confirmation du diagnostic (cathétérisme cardiaque droit), le diagnostic nosologique et le diagnostic de gravité.

1.4. Prise en charge thérapeutique

Bien que la prise en charge ait considérablement évolué ces dernières années, il n'existe malheureusement aucun traitement curatif connu à ce jour. Néanmoins, les

thérapies actuelles permettent de ralentir nettement la progression de la maladie et/ou d'améliorer nettement le bien-être des patients (Figure 2). En cas d'échappement thérapeutique ou de dégradation de l'état de santé du patient malgré sa prise en charge, la transplantation cardio-pulmonaire ou bi-pulmonaire est alors la seule alternative. Cependant le taux de survie à 5 ans de 50% est largement insatisfaisant (Fadel *et al.* 2010).

1.4.1 Traitement médical

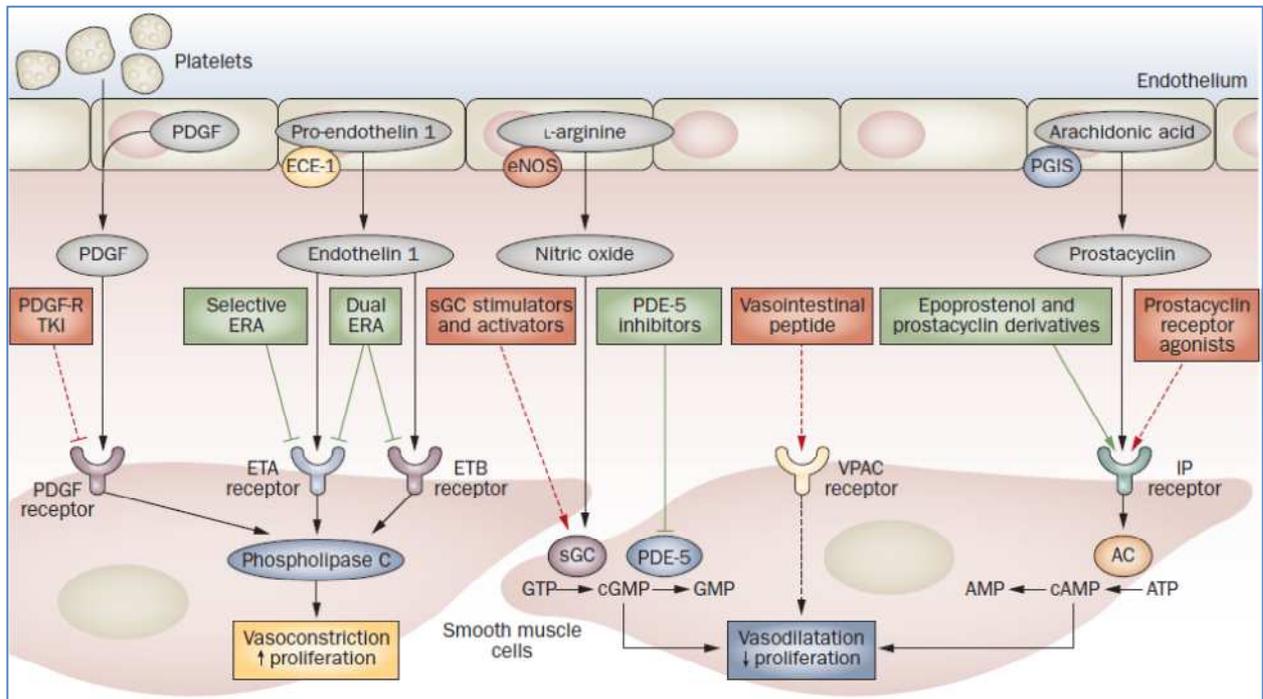


Figure 2: Traitements actuels et nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP (O'Callaghan DS *et al.* Nat Rev Cardiol 2011)

Les traitements symptomatiques, et non spécifiques, de l'HTAP sont représentés par :

- le traitement anticoagulant au long cours qui permet, sauf contre-indications, de diminuer la mortalité probablement par réduction des phénomènes de thrombose *in situ* (Rich *et al.* 1992) ;
- les diurétiques, en association avec le régime sans sel, permettent de réduire la volémie, de diminuer les signes de surcharge ventriculaire droite et d'améliorer les signes cliniques. La posologie doit être adaptée à la clinique

mais peut être ajustée en fonction des pressions de remplissage cardiaque droit mesurées lors des bilans hémodynamiques;

- une oxygénothérapie doit être envisagée chez les patients présentant une hypoxémie sévère ($\text{PaO}_2 < 60 \text{ mmHg}$).

1.4.1.1 Les bloqueurs calciques

L'utilisation des bloqueurs calciques n'est restreint qu'à une faible sous-population des patients HTAP, moins de 10% (Montani *et al.* 2010). Ces patients montrent une diminution et parfois une normalisation de la pression artérielle pulmonaire au moment du cathétérisme cardiaque après avoir inhalé du monoxyde d'azote (NO). Malheureusement, cette réponse est perdue chez certains patients après plusieurs années qui sont alors mis sous les traitements spécifiques de l'HTAP (Sitbon *et al.* 2005).

1.4.1.2 Prostacyclines et analogues

Les analogues de la prostacycline, comme l'Époprosténol, qui a été l'une des premières molécules approuvées pour le traitement de l'HTAP, sont largement utilisés et permettent à la fois une amélioration de la capacité à l'exercice, une diminution des PAP et des PVR (Barst *et al.* 1996, Sitbon *et al.* 2002). Une amélioration de la survie des patients HTAP a été retrouvée à 1 an (87.8% vs 58.9%), à 2 ans (76.3% vs 46.3%) et à 3 ans (62.8 vs 35.4%) (Rich *et al.* 2010). Il existe d'autres analogues de la prostacycline : le Treprostinil, qui est administré par voie sous-cutanée en continu, présente des effets comparables à l'Époprostenol (Barst *et al.* 2006) ; l'Iloprost, qui est administré par inhalation plusieurs fois par jour, n'est malheureusement pas aussi efficace à long terme (Opitz *et al.* 2005).

Malgré leur grande efficacité, beaucoup de points limitent parfois l'utilisation de ces analogues de la prostacycline. D'une part, la demi-vie de l'Époprostenol est très courte (de 3 à 5 minutes) et requiert donc une administration intraveineuse continue. D'autre part, les effets secondaires (maux de tête, diarrhées, douleurs articulaires, rougeurs et douleurs aux mâchoires lors de la mastication) peuvent contraindre à une modification de la prise en charge. De grands efforts sont actuellement entrepris pour améliorer les molécules existantes et faciliter leur utilisation.

1.4.1.3 Les inhibiteurs de la voie de l'endothéline (ET)-1

Le Bosentan et l'Ambrisentan sont deux antagonistes des récepteurs de l'ET-1 à avoir été développés et mis sur le marché. Administrés par voie orale, ces traitements ont démontré des bénéfices cliniques significatifs (Channick *et al.* 2001 ; Rubin *et al.* 2002). Mieux supportés que les analogues de la prostacycline, les antagonistes des récepteurs de l'ET-1 peuvent induire des élévations transitoires des transaminases hépatiques généralement réversibles à l'arrêt du traitement.

1.4.1.4 Les inhibiteurs de la Phosphodiesterase (PDE)-5

Parmi ces molécules, nous retrouvons le Sildénafil et plus récemment le Tadalafil. Plusieurs études ont montré une amélioration du 6MWT (6 min walk test) et une diminution des PAP suite à la prise de Sildénafil (Galiè *et al.* 2005 ; Galiè *et al.* 2009 ; Rubin *et al.* 2011). Les effets secondaires le plus fréquemment observés sont : maux de tête, rougeur du visage, troubles de la vision, liés à l'action vasodilatatrice du produit.

1.4.1.5 En cours de développement et/ou d'étude en phase clinique

- Les Activateurs de la Guanylate Cyclase

Récemment, des molécules stimulants la guanylate cyclase, comme le YC-1 et le BAY 420-2272 ont été démontrés comme augmentant la sensibilité de l'enzyme vis-à-vis de taux faibles de NO. De plus, une autre molécule de cette classe, le BAY-58-2667, semblerait avoir la capacité d'induire une vasodilatation en absence de NO, grâce à son action sur l'enzyme oxydée ou l'hème libre. Le Riociguat et le Cinaciguat, deux stimulateurs de la guanylate cyclase sont testés dans des phases cliniques avec des résultats plutôt positifs aussi bien sur les paramètres hémodynamiques, l'index cardiaque que sur la capacité à l'exercice (Ghofrani *et al.* 2013).

- Les Molécules Anti-Prolifératives

Après la mise en évidence de l'importance de la voie du *platelet-derived growth factor* (PDGF) dans la physiopathologie de l'HTAP au travers des modèles expérimentaux, l'Imatinib a été testé chez l'humain (Ghofrani *et al.* 2010). Malgré des résultats encourageant au niveau hémodynamique en étude de Phase II, les études de phase III ont mis en évidence de

graves effets secondaires (Hoeper *et al.* 2013 ; Humbert 2013). L'évaluation de l'efficacité de l'utilisation d'autres inhibiteurs restent à prouver.

- L'Administration de Cellules Progénitrices

Des cellules progénitrices endothéliales (EPCs) autologues génétiquement modifiées pour sur-exprimer la eNOS ont été administrées à des patients présentant une HTAPi ou associée à une sclérodermie (Campbell *et al.* 1999). Cependant, l'efficacité réelle de cette thérapie reste encore à être démontrée. Plus récemment, une étude menée par l'équipe de Kourembanas (Liang *et al.* 2011), montre que l'injection de cellules souches stromales mésenchymateuses améliore l'HTP induite par l'hypoxie chronique chez les souris en terme de paramètres hémodynamiques et de réduction de l'hypertrophie cardiaque droite. Cet effet est d'autant plus important si ces cellules souches stromales mésenchymateuses portent un transgène sur-exprimant le gène Hème oxygénase-1. *In vitro*, ces cellules sont capables de réduire l'inflammation et la prolifération de CML.

Ces dernières années ont vu une augmentation remarquable de notre connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de la pathobiologie de l'HTAP et ont permis le développement de plusieurs outils et molécules qui ont nettement amélioré la prise en charge des patients (Morrell *et al.* 2009; O'Callaghan *et al.* 2011) (Figure 2). Cependant, malgré le succès reconnu des médicaments existants dans le traitement des symptômes de l'HTAP, et l'amélioration de la survie, la plupart des patients finissent par échapper à leur thérapie et succombent à la maladie (Humbert *et al.* 2010; O'Callaghan *et al.* 2011). Dans les meilleures circonstances, une transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire peut être envisagée, mais cette solution reste lourde et largement insatisfaisante avec un taux de survie à 5 ans légèrement inférieur à 50%.

C'est pourquoi l'amélioration et la précision de nos connaissances de la physiopathologie de l'HTAP est requise pour améliorer et identifier de nouvelles cibles moléculaires et permettre le développement de nouveaux outils thérapeutiques plus efficaces et mieux tolérés.

1.4.2. Traitement chirurgical

1.4.2.1. Transplantation pulmonaire

Malgré des progrès importants dans la prise en charge médicale des patients atteints d'HTAP, la transplantation demeure une option thérapeutique valide de dernier recours, qui permet d'améliorer le pronostic vital et la qualité de vie. Des recommandations émanant des différentes sociétés savantes internationales ont permis d'homogénéiser les pratiques des équipes médicales et chirurgicales, avec des critères d'indication de transplantation et d'inscription sur liste d'attente (Orens *et al.* 2006). Dans l'HTAP idiopathique, la transplantation bi-pulmonaire représente actuellement la procédure de choix, mais la greffe cardio-pulmonaire est également très pratiquée. Les patients en classe fonctionnelle III ou IV de la NYHA, en échec de traitement médical, devraient être inscrits sur liste d'attente de transplantation, en l'absence de contre-indications (Orens *et al.* 2006). Il existe de nombreuses complications à la greffe pulmonaire, en particulier les complications à distance de la transplantation, comme le rejet chronique d'allogreffe. Selon le registre international, la survie après transplantation pour HTAP idiopathique est de 67%, 57%, 48% et 30% à 1, 3, 5 et 10 ans, respectivement (Christie *et al.* 2008). Si l'on fait abstraction de la mortalité précoce post-opératoire (dans la 3 premiers mois), les courbes de survie rejoignent celles des autres indications à la greffe pulmonaire, témoignant du risque accru pré- et péri-opératoire dans ce contexte (Toyoda *et al.* 2008).

1.4.2.2. Thromboendartériectomie pulmonaire

L'endartériectomie pulmonaire, effectuée sous arrêt circulatoire en hypothermie profonde, consiste à extraire de chaque artère pulmonaire et de ses branches lobaires, segmentaires et sous-segmentaires, le matériel fibreux organisé à partir de caillots d'une ou plusieurs embolies pulmonaires qui n'ont pas évolué vers la lyse physiologique habituelle. L'endartériectomie pulmonaire représente le traitement de choix de l'HTAP post-embolique (Galiè *et al.* 2004). Cette technique offre une réelle guérison à ces patients, à condition que l'obstruction soit suffisamment proximale et que la gravité hémodynamique soit corrélée au degré de l'obstruction anatomique (Dartevelle *et al.* 2004). La mortalité postopératoire globale est celle d'une intervention chirurgicale thoracique majeure, soit 3 à 4% (Thistlethwaite *et al.* 2006).

1.4.2.3. Interventions palliatives

Le maintien de la fonction ventriculaire droite est le déterminant principal des symptômes, du niveau de la tolérance à l'effort et de l'évolution de l'HTAP idiopathique et ainsi que de la plupart des formes associées (Galiè *et al.* 2009). A l'inverse, seulement 15% des patients souffrant de cardiopathies congénitales finissent par évoluer vers l'insuffisance cardiaque droite (Hopkins 2005). De plus, la présence d'une communication intracardiaque dans l'HTAP paraît associée à un meilleur pronostic, par exemple chez les patients présentant un foramen ovale perméable (Roskovec *et al.* 1986). La création artificielle d'une telle communication représente donc une option attractive chez des patients strictement sélectionnés : patients en classe fonctionnelle III/IV de la NYHA pour lesquels le traitement médical devient insuffisant, en l'absence d'alternative thérapeutique, dans le cadre d'un pont vers la transplantation ou chez les patients en fin de vie. La création d'une communication artificielle entre cœur droit et cœur gauche est possible à travers deux techniques : l'atrioseptostomie et le shunt de Potts. L'atrioseptostomie comprend une ponction du septum interauriculaire, suivie d'une dilatation par ballonnet dont la taille est définie par une mesure systématique de la saturation artérielle et de la pression d'occlusion de l'artère pulmonaire (Keogh *et al.* 2009). Le shunt de Potts consiste à créer une anastomose entre l'artère pulmonaire gauche et l'aorte ascendante. Cette technique a été pratiquée avec succès chez des enfants souffrant de formes graves d'HTAP idiopathique (Blanc *et al.* 2004 ; Labombarda *et al.* 2009). Cependant, son rôle dans la prise en charge de l'adulte reste incertain.

2. Anatomie pathologique de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par plusieurs anomalies structurelles et fonctionnelles des petites artères pulmonaires, de moins de 500 μ m (Voelkel and Tuder 1995; Humbert *et al.* 2004; Mandegar *et al.* 2004; Rabinovitch 2005, 2008 et 2012 ; Morrell *et al.* 2009). Les lésions caractéristiques de l'HTAP sont en effet localisées au niveau de la microcirculation des parties distales résistives du lit vasculaire pulmonaire (Figure 3). Ces lésions associent

une néo-vascularisation des artéioles pulmonaires normalement dépourvues de muscle lisse, une hypertrophie concentrique de l'intima dite « en bulbe d'oignon », une hypertrophie de la média, des lésions dites plexiformes et des microthromboses, ainsi qu'une raréfaction des artéioles pulmonaires distales. Ces lésions structurelles associées à

une vasoconstriction soutenue et à des thromboses *in situ* sont à l'origine de l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires, ce qui va conduire à une défaillance cardiaque droite.

Muscularisation anormale des artères pré-capillaires distales

On retrouve une néo-muscularisation des petites artéioles pré-capillaires distales, normalement non-musculaires jusque dans l'acinus respiratoire. Les mécanismes cellulaires responsables de cette muscularisation de cette partie des vaisseaux pulmonaires ne sont pas complètement élucidés, mais l'une des hypothèses possibles est la prolifération des CML des artères pulmonaires pré-existantes ou encore la différenciation à partir des cellules précurseurs – pericytes ou autres (Meyrick and Reid 1980).

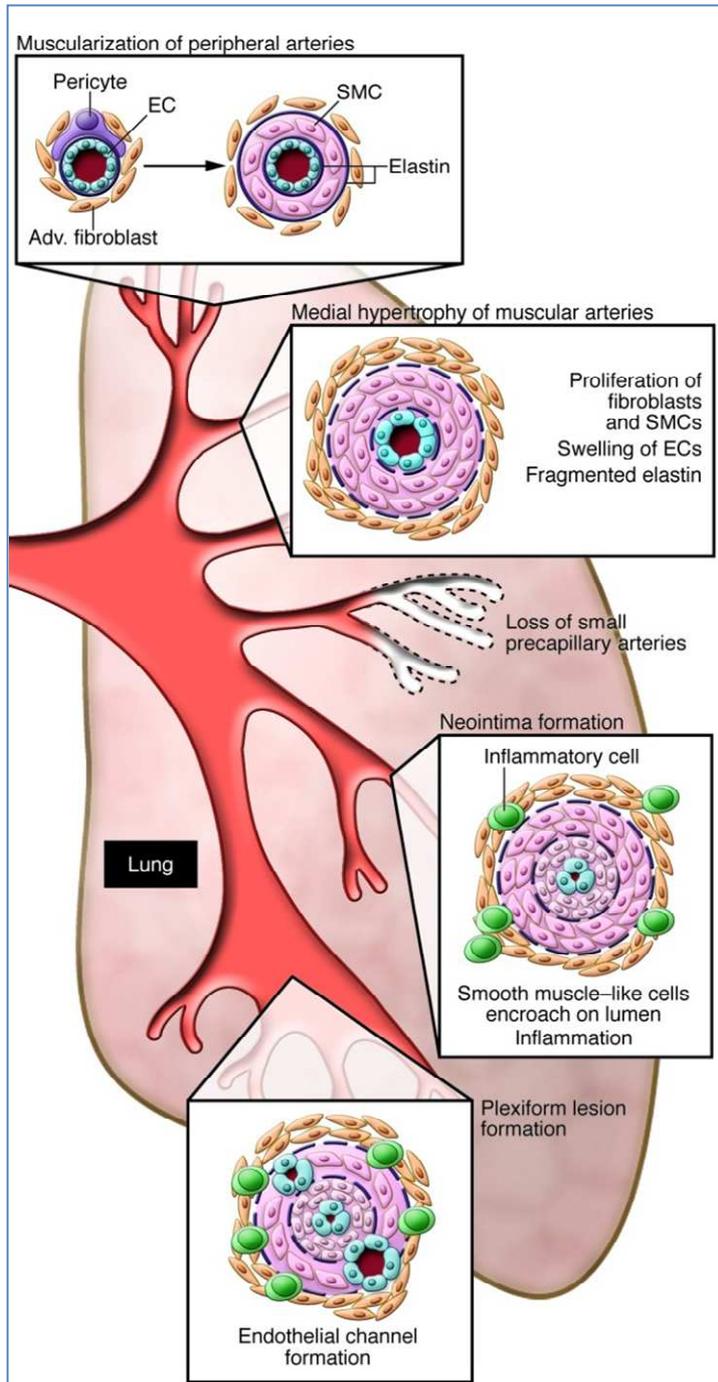


Figure 3 : Schéma illustrant les anomalies vasculaires pulmonaires présentes dans l'HTAP : muscularisation des artères pré-capillaires distales, hypertrophie de la média des grosses artères pulmonaires, raréfaction des petites artères pré-capillaires distales, formation néo-intimale occlusive et formation de lésions plexiformes (Rabinovitch M. JCI 2012)

- **Hypertrophie de la média des grosses artères pulmonaires**

Les vaisseaux de plus gros calibre, entre 100 et 500 μ m, sont également touchés par l'hypertrophie médiale et adventitielle. L'épaississement de la paroi des artères pulmonaires proximales a été attribué à la prolifération et la migration anormales des CML et péricytes locaux, ou leur différenciation à partir d'une population de cellules souches ou de fibrocytes (Davie *et al.* 2004) ou encore des CE qui sont capables d'acquérir le phénotype de CML (Frid *et al.* 2002).

- **Raréfaction de petites artérioles pré-capillaires distales**

Cette réduction du nombre des vaisseaux du lit vasculaire contribue également à l'augmentation de la résistance vasculaire. Les raisons de cette perte de petites artérioles pré-capillaires distales restent encore inconnues, cependant ce phénomène semble très précoce dans le développement de la maladie. Une agression endothéliale importante et continue, une perte de la fonction péricytaire ou encore des perturbations profondes des processus angiogéniques sont fortement suspectés.

- **Formation néo-intimale occlusive des vaisseaux de plus gros calibre**

Dans ces vaisseaux (entre 200 et 500 μ m), on retrouve également la formation d'une couche supplémentaire, néo-intimale, constituée de myofibroblastes, de matrice extracellulaire (MEC) et d'infiltrats inflammatoires entre l'endothélium et la limitante élastique interne. Dans certains modèles expérimentaux d'HTP, en particulier dans les modèles hypoxiques, les fibroblastes adventitiels semblent être les premières cellules à être activées et à proliférer et synthétiser des composés de la MEC en réponse aux signaux hypertensifs pulmonaires (Frid *et al.* 2002). Les mécanismes qui rendent possible la migration des fibroblastes adventitiels dans la média (et à un stade plus évolué dans l'intima) sont mal identifiés. Des données expérimentales suggèrent qu'il existe une surexpression des métalloprotéinases de la matrice (MMP), essentiellement de la MMP-2 et de la MMP-9, et des activités élastases (Cowan *et al.* 2000), favorisant la migration des fibroblastes adventitiels et la formation de la néo-intima (Lepetit *et al.* 2005; Chelladurai *et al.* 2012). La néo-intima favorise l'occlusion et la re-canalisation des vaisseaux et contribue à la formation des lésions plexiformes ou fibrose intimale concentrique (aspect en « bulbe d'oignon »), dernier stade du remodelage vasculaire.

- **Formation des lésions plexiformes**

Les lésions plexiformes ont longtemps été considérées comme pathognomoniques des HTAPi. Cependant, plusieurs de ces lésions vasculaires ont également été mises en évidence dans d'autres formes d'HTP comme l'HTP associée à des cardiopathies congénitales et associées à l'hypertension portale. Ces lésions sont formées par une prolifération exubérante de CE et de myofibroblastes, formant des canaux microvasculaires endoluminaux dans une matrice oblitérante riche en collagène (Bjornsson and Edwards 1985).

3. Physiopathologie de l'HTAP

3.1. Remodelage vasculaire pulmonaire

3.1.1. Rôle des cellules endothéliales pulmonaires et de la dysfonction endothéliale

L'endothélium vasculaire est à l'interface entre le milieu sanguin et la paroi interne des vaisseaux sanguins et contrôle le passage du plasma et des cellules depuis l'espace vasculaire vers l'espace extravasculaire. L'endothélium vasculaire n'est plus considéré aujourd'hui comme une simple barrière inerte entre le sang et les tissus, mais comme un élément clé dans le contrôle du tonus vasculaire, la perméabilité endothéliale, l'agrégation plaquettaire mais aussi l'adhésion des plaquettes et des leucocytes, la prolifération des CML et la régulation de la fibrinolyse (Bunting *et al.* 1976 ; Furchgott and Zawadzki 1980, Vane *et al.* 1990). Ce rôle primordial dans l'homéostasie vasculaire permet à l'endothélium d'adapter localement et temporairement plusieurs fonctions vasculaires en réponse à divers stimuli. Les facteurs impliqués dans ces nombreux processus physiologiques sont sécrétés lorsque l'endothélium est activé par des agonistes tels que les neurotransmetteurs, les hormones circulantes, les produits des plaquettes ou de la coagulation sanguine.

L'endothélium forme une monocouche de cellules quiescentes avec un turnover de quelques mois à quelques années. Les CE présentent une grande hétérogénéité structurelle et leur rôle dans la vasculature varie considérablement d'un organe à l'autre. En effet, les CE pulmonaires présentent de nombreuses particularités qui varient en fonction de leur localisation dans le lit vasculaire pulmonaire. Contrairement à l'endothélium systémique, les

CE pulmonaires expriment fortement l'enzyme de conversion de l'angiotensine, la thrombomoduline (Wang *et al.* 1999) et la dispase membranaire (Ford *et al.* 1992). Les CE pulmonaires en culture conservent certaines de ces caractéristiques, ce qui suggère que l'expression de ces gènes fait partie de ces cellules et représente donc une caractéristique intrinsèque en dehors de tout contexte environnemental (Tu *et al.* 2011, de Man *et al.* 2012).

Tout comme l'endothélium systémique, l'endothélium pulmonaire a la capacité de transiter d'un état quiescent, c'est-à-dire ne présentant pas de capacité d'adhésion, à un état activé et adhésif. Cette perte de quiescence pour un état activé est retrouvée dans l'HTAP et représente l'un des nombreux signes de la dysfonction endothéliale associée à la maladie. La dysfonction endothéliale est un phénomène physiopathologique souvent indépendant de la maladie et présent dans les phases précoces de différentes conditions pathologiques telles que l'athérosclérose et différents types de vasculopathies (Cines *et al.* 1998). D'autres travaux menés sur des CE de patients HTAP ont révélé également beaucoup d'autres signes de dysfonction endothéliale. En effet, les CE HTAP présentent une surexpression de la synthèse de l'ET-1 (Giaid *et al.* 1993), une diminution d'expression de la synthèse endothéliale du NO (eNOS) (Giaid and Saleh 1995) et de synthèse de la prostacycline (Tuder *et al.* 1999). De plus, les CE HTAP présentent des expressions anormalement élevées de divers composés de la MEC comme la ténascine, la laminine, la fibronectine et l'élastine, révélant des défauts de la balance entre la production/dégradation de la MEC dans la paroi vasculaire (Rabinovitch 2001; Botto *et al.* 2006). Plusieurs autres travaux ont suggéré des défauts importants dans la balance prolifération/apoptose des CE pulmonaires qui sont associés à des anomalies de différenciation, à l'origine du remodelage vasculaire pulmonaire et de la formation des lésions plexiformes (Cool *et al.* 1999). Des expansions monoclonales de CE résistantes à l'apoptose (Voelkel *et al.* 2002; Sakao *et al.* 2009 et 2010) ont été décrites dans l'HTAP qui résulteraient de la multiplication de ces CE particulières au niveau de sites d'atteinte endothéliale (Masri *et al.* 2007; Tu *et al.* 2011). Ces CE anormales ont été montrées comme sur-exprimant les récepteurs au *vascular endothelial growth factor* (VEGF) (Cool *et al.* 1999), sous-exprimant les récepteurs de type 2 du *transforming growth factor* (TGF) β (TGF β -R2) et le facteur pro-apoptotique Bax (Yeager *et al.*

2001). En cohérence avec ces données, Lee et al. ont démontré que certaines CE qui composent les lésions plexiformes auraient une origine monoclonale (Lee *et al.* 1998).

Le(s) élément(s) à l'origine de cette perte d'adaptation (temporelle et locale) de la réponse vasculaire pulmonaire à divers stimuli reste(nt) encore inconnu(s). Cependant plusieurs modulateurs de dysfonction endothéliale comme les forces hémodynamiques (ou shear stress), les médiateurs inflammatoires ou hormonaux, les toxines, des modifications épigénétiques et une réduction du lit vasculaire pulmonaire font parties des éléments fortement suspectés.

3.1.1.1. Déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction

Le tonus vasculaire est régulé par de nombreux facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs endothéliaux. Les facteurs vasoconstricteurs sont principalement composés du thromboxane A₂, des anions superoxydes, de l'ET-1, de la prostaglandine H₂ et d'angiotensine (Ang)-II. Les trois principaux facteurs vaso-relaxants sont le NO, la prostacycline, et le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium EDHF. Ainsi, l'endothélium joue un rôle crucial en maintenant un équilibre entre vasoconstriction et vasodilatation, en régulant la prolifération des CML et en maintenant un équilibre entre des activités anti-/pro-fibrinolytique et anti-/pro-thrombotique. Ce rôle est d'autant plus important que c'est l'endothélium qui permet l'adaptation temporaire des différentes régions vasculaires en réponse à divers stimuli ou pour faire face à un afflux de sang. La perte de cette propriété physiologique cruciale des vaisseaux est appelée dysfonction endothéliale.

L'endothélium libère des facteurs de croissance divers et des médiateurs vaso-actifs, qui régulent les propriétés physiques et biochimiques des vaisseaux pulmonaires et affectent la contractilité vasculaire et la croissance cellulaire. Chez les individus sains, un équilibre entre ces médiateurs existe et permet le faible tonus basal des vaisseaux pulmonaires, l'homéostasie et la réparation des lésions vasculaires. Une altération de cet équilibre essentiel altère les propriétés des vaisseaux pulmonaires dans l'HTAP.

➤ **Diminution des facteurs vasodilatateurs**

▪ **Le Monoxyde d'Azote (NO)**

Le rôle du NO dérivé de l'endothélium dans la pathogenèse de l'HTAP reste mal compris. Les données disponibles suggèrent que le NO est au moins partiellement responsable de la vasorelaxation pulmonaire. L'enzyme NO synthase de type endothéliale (eNOS) catalyse la conversion de la L-arginine en citrulline, et produit ainsi le NO. Le NO active la guanylate cyclase et augmente le taux de GMP cyclique dans les CML, entraînant une vasodilatation. En dehors d'une expression de base constitutive, l'eNOS peut être modulée par de nombreux stimuli tels que les forces hémodynamiques (ou shear stress) ou l'augmentation du débit sanguin pulmonaire. Le rôle spécifique d'eNOS dans la régulation du tonus vasculaire pulmonaire a été bien étudié dans les modèles animaux d'HTP. La surexpression d'eNOS dans des souris transgéniques protège contre l'HTP induite par l'hypoxie (Champion *et al.* 1999). A l'inverse, les souris déficientes en eNOS présentent une HTP sévère suite à l'exposition à l'hypoxie modérée (Fagan *et al.* 1999). Cependant, les études sur les biopsies humaines ont montré une expression variable d'eNOS dans les patients d'HTAPi avec une expression réduite dans les vaisseaux pulmonaires mais parfois une expression accrue dans l'endothélium des lésions plexiformes (Mason *et al.* 1998). Le NO protège de la vasoconstriction induite par l'hypoxie dans les poumons, inhibe la prolifération du muscle lisse et l'agrégation plaquettaire, et régule la baisse de production d'ET-1. Le rôle hypothétique de la déficience du NO dérivé de l'endothélium dans la pathogenèse de l'HTAP est renforcé par les effets bénéfiques du NO inhalé et des donneurs de NO tels que la L-arginine chez les patients traités.

▪ **La Prostacycline**

La prostacycline a un puissant effet vasodilatateur pulmonaire et des propriétés d'agrégation plaquettaire (Stitham *et al.* 2011). Elle est synthétisée à partir de la cyclo-oxygénase par la voie de l'acide arachidonique dans l'endothélium vasculaire. Bien que la prostacycline ne puisse pas contribuer à la vasorelaxation basale pulmonaire, elle protège contre la vasoconstriction pulmonaire et le remodelage en réponse à divers stimuli. La surexpression de la prostacycline protège les souris de l'HTP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Geraci *et al.* 1999). En revanche, les souris déficientes en récepteur de la prostacycline développent une HTP sévère induite par l'hypoxie (Hoshikawa *et al.* 2001).

Dans le modèle monocrotaline, le traitement par microsphères sur lesquelles des analogues de la prostacycline ont été polymérisés atténue le développement de l'HTP induite chez le rat (Obata *et al.* 2008). Une diminution de l'expression de la prostacycline synthase a été observée dans les artères pulmonaires des patients HTAPi sévère, porto-pulmonaire ou associée au VIH, et les niveaux urinaires des métabolites de la prostacycline sont également diminués chez les patients. La baisse de la prostacycline peut expliquer en outre la vasoconstriction pulmonaire, la prolifération des CML et la dérégulation de la coagulation (Obata *et al.* 2008).

Le rôle de la prostacycline dans l'HTAP est démontré par le succès du médicament dans le traitement palliatif de cette maladie. Plusieurs essais ont montré de façon constante une amélioration de la capacité d'exercice, de l'hémodynamique cardio-pulmonaire, de la classe fonctionnelle NYHA, des symptômes, ainsi que de la survie des patients HTAP traités avec une perfusion continue de prostacycline intraveineuse (époprosténol) (Barst *et al.* 1996 ; Sitbon *et al.* 2002).

➤ **Augmentation des vasoconstricteurs**

▪ **Le système de l'Endotheline-1 (ET-1)**

L'ET-1, un peptide de 21 acide-aminés avec une activité vasoconstrictrice puissante et des propriétés d'agrégation de plaquettes, est largement distribué dans l'endothélium humain. La production d'ET-1 est élevée dans des modèles animaux d'HTP et chez les patients. En outre, il y a une forte corrélation entre la production d'ET-1 et la résistance vasculaire pulmonaire chez les patients HTAP et des HTP liées à un syndrome d'Eisenmenger (Cacoub *et al.* 1997). Le ratio du taux d'ET-1 dans les artères et les veines pulmonaires est significativement augmenté chez les patients, ce qui suggère une surproduction ou une diminution de la clairance de cette molécule. Chez les mammifères, l'ET-1 agit de façon paracrine sur 2 types de récepteurs à l'ET-1 : ETA et ETB. L'ETA et l'ETB sont présents sur les CML vasculaires pulmonaires et agissent sur leur vasoconstriction et leur prolifération, ETB est aussi présent au niveau des CE où il stimule la vasodilatation par l'intermédiaire du NO et de la prostaglandine (PGI₂). L'expression de l'ARNm des deux récepteurs est augmentée dans des modèles animaux d'HTP (Li *et al.* 1994; Frasc *et al.* 1999). Chez l'homme, une importante augmentation de l'expression du gène du récepteur ETB a été rapportée dans

l'HTAP thromboembolique sévère (Bauer *et al.* 2002). L'antagoniste des récepteurs, tels que le Bosentan, améliore l'état fonctionnel des patients (Rubin *et al.* 2002).

▪ **Le système sérotoninergique**

La sérotonine, encore appelée 5-hydroxytryptamine (5-HT), est une monoamine, synthétisée par les cellules entérochromaffines du tube digestif, par les neurones sérotoninergiques et les CE pulmonaires (Eddahibi *et al.* 2006). Elle est fabriquée à partir du tryptophane qui est d'abord convertit en 5-hydroxytryptophane (5-HTP) par l'enzyme tryptophane hydroxylase TPH. Le 5-HTP est ensuite transformé en 5-HT par la 5-HTP décarboxylase. Dans la circulation sanguine, la 5-HT est activement capturée et stockée dans les plaquettes et explique les taux faibles circulants (Nilsson *et al.* 1985 ; Brenner *et al.* 2007). La principale voie d'inactivation de la 5-HT est la désamination oxydative assurée par les monoamines oxydases (ou MAO) avec la formation d'acide 5-hydroxy-indol-acétique (ou 5HIAA).

La sérotonine agit soit au travers d'un transporteur membranaire (le 5-HTT ou SERT) qui l'internalise dans la cellule, soit au travers de récepteurs membranaires spécifiques (5-HTR). On connaît au moins 14 gènes codant les 5-HTR classifiés en 7 familles : 5-HT1A-E, P, 5-HT2A-C, 5-HT3, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 et 5-HT7. Le système sérotoninergique est particulièrement important pour l'hyperplasie du muscle lisse, la vasoconstriction et la microthrombose *in situ*. De plus amples détails sont situés dans la section 3.3.5. *Voie de Signalisation de la Sérotonine (5-HT)*.

▪ **Le Thromboxane**

Le Thromboxane est produit par des cellules endothéliales et les plaquettes. Il est un puissant vasoconstricteur, un mitogène du muscle lisse, et un inducteur de l'agrégation plaquettaire. Une augmentation de la production de métabolites thromboxane A2 est retrouvée dans l'HTAP (Christman *et al.* 1992). L'inhibition de thromboxane produit une légère amélioration de l'hémodynamique pulmonaire dans une petite étude de patients HTAP (Rich *et al.* 1987). Cependant, un vaste essai clinique impliquant un inhibiteur de la thromboxane, terbogrel, a dû être interrompu prématurément en raison de douleurs aux jambes graves dans le groupe traité (Langleben *et al.* 2002). Néanmoins, une inhibition

significative de thromboxane dans cette étude suggère un rôle potentiel thérapeutique d'un inhibiteur de la thromboxane avec un meilleur profil de sécurité.

Comme évoqué précédemment, plusieurs travaux menés sur des CE de patients HTAP ont révélé de nombreux signes de dysfonction endothéliale, comprenant entre autres : une surexpression de plusieurs molécules d'adhésion (*intercellular adhesion molecule (ICAM)-1*, *vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1*); des synthèses perturbées de molécules vaso-réactives (NO, prostacycline, ET-1, 5-HT, thromboxane) ; une participation active au remodelage de la MEC (protéases et inhibiteurs de protéase, synthèse de composés de la matrice) ; défauts de balance prolifération/apoptose; communication intercellulaire perturbée avec les CML et cellules immunitaires ; synthèse de diverses molécules jouant sur l'inflammation et l'autoimmunité ; synthèse de facteurs pro-coagulants. De plus, il s'avère que les CE HTAP possèdent plusieurs anomalies intrinsèques qui peuvent expliquer ce phénotype anormal dans la maladie.

3.1.1.2. Communications intercellulaires aberrantes de la CE HTAP

En contact direct avec le sang, l'endothélium est placé comme un élément privilégié de communication. Il est capable d'interagir avec les cellules voisines plus particulièrement les CML et cellules péricyaires. Cette communication intercellulaire lui permet d'assurer ses principales fonctions qui sont : le contrôle du tonus musculaire (*via* ses facteurs vaso-actifs), l'inflammation (*via* des médiateurs chimio-attractants), le contrôle de la coagulation et le contrôle de l'angiogenèse.

➤ Communications Aberrantes entre CE et CML dans l'HTAP

Le rôle des CE dans l'angiogenèse et le remodelage est maintenant mieux compris. Un aspect essentiel du développement des vaisseaux est la maturation, au cours de laquelle les CE ne prolifèrent plus ou ne migrent plus, mais stabilisent le vaisseau en recrutant des cellules de soutien péri-endothéliales (Folkman and D'Amore 1996; Hanahan 1997). Les interactions entre les CE et les cellules murales (péricytes et CML vasculaires) dans la paroi des vaisseaux sanguins ont récemment émergé comme un processus central dans la régulation de la formation vasculaire, sa stabilisation, son remodelage et sa fonction. Les défauts d'interactions entre les deux types de cellules, comme dans de nombreux modèles génétiques de souris, résulte en des anomalies cardiovasculaires sévères au stade

embryonnaire et sont souvent létales à la naissance. Les interactions anormales entre ces deux types de cellules sont également impliquées dans un certain nombre de maladies humaines, y compris l'angiogenèse tumorale et les maladies vasculaires (Jain and Booth 2003; Armulik *et al.* 2005). Ainsi, les CE produisent et libèrent de manière constitutive des facteurs de croissance qui agissent sur les CML d'artère pulmonaire et dont la fonction physiologique est de recruter ces cellules pour maintenir une couche de muscle lisse autour des vaisseaux pulmonaires. L'activation anormale de ce processus peut conduire à un remodelage vasculaire pathologique. Inversement, les carences dans ce processus peuvent conduire à une dilatation anormale des vaisseaux comme on en observe dans la pathologie de l'hémorragie héréditaire télangiectasie (Folkman and D'Amore 1996; Hanahan 1997). Des études récentes fournissent des preuves que la dérégulation des voies moléculaires qui régissent la maturation des vaisseaux est impliquée dans le processus de remodelage vasculaire pulmonaire au cours de l'HTP.

L'exposition de CML d'artère pulmonaire au milieu de culture de CE induit la prolifération des CML et cet effet est beaucoup plus fort lorsque les CE proviennent de patients HTAPi (Eddahibi *et al.* 2006). De façon intéressante, ces résultats ont été obtenus en utilisant des cellules humaines en culture primaire non stimulées. L'effet stimulant du milieu de CE sur la croissance des CML est supérieur chez les patients HTAPi que chez les contrôles, ce qui indique qu'il y a des altérations dans la communication entre les deux types cellulaires et ceci pourrait être une étape critique dans le remodelage vasculaire pulmonaire.

Cette communication aberrante est liée à plusieurs altérations au niveau de la CE avec une synthèse exagérée de facteurs proliférant. L'étude menée par Giaid A (Giaid 1998) a montré que l'expression de l'enzyme de conversion de l'endothéline (ECE) est augmentée au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires lésées. Ce qui explique une synthèse plus importante de l'ET-1 qui va pouvoir induire la contraction et la prolifération de CML *via* son récepteur ET-A. Cependant l'altération de cette voie n'est pas suffisante pour expliquer l'hyperplasie des CML dans l'HTAP. En effet, une étude menée par notre équipe montre, pour la première fois, que les CE pulmonaires présentent une expression et une activité de la tryptophane hydroxylase (TPH) endogène indiquant que les CE sont capables de synthétiser localement de la 5-HT au niveau des vaisseaux pulmonaires. En effet, avant ces travaux, il était considéré que la seule source de 5-HT provenait des plaquettes ou des cellules

enterochromaffines périphériques (Eddahibi *et al.* 2006). Cette synthèse est inhibée par le p-chlorophénylalanine (PCPA), un inhibiteur de la TPH. Dans cette même étude, il a été montré que les CE HTAP ont une expression significativement plus importante de cette enzyme TPH et donc produisent plus de 5-HT. Cet excès de 5-HT agit ensuite sur les CML adjacentes en induisant une prolifération locale. La réponse est d'autant plus exagérée avec les CML HTAPi du fait que ces cellules possèdent des récepteurs sérotonergiques et une forte activité du transporteur pour la 5-HT.

Plus récemment, toujours au sein de notre équipe, il a été démontré que le *fibroblast growth factor* (FGF)-2 est impliqué dans la pathogénèse de l'HTAPi (Izikki *et al.* 2009; Tu *et al.* 2011). Des hybridations *in situ* ont révélé que l'ARNm codant pour le FGF-2 est exprimé au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires remodelées chez les patients HTAP. De manière intéressante, ces observations *in situ* ont pu être confirmées *in vitro*. En effet, nous avons montré que l'expression protéique de FGF-2 et son relargage sont anormalement élevés au niveau de cultures primaires de CE pulmonaires isolées de patients HTAPi. Le FGF-2, un facteur de croissance soluble à forte activité mitogénique, ainsi libéré, agit sur la prolifération des CML d'artère pulmonaire par voie paracrine. C'est pourquoi, l'exposition de CML en culture à des milieux conditionnés de CE issues de patients HTAPi, induit une prolifération plus marquée que celui de CE contrôles. En revanche, cet effet stimulant est aboli lorsque des milieux conditionnés de CE pulmonaires HTAPi déficientes en FGF-2, suite à l'utilisation de siRNA dirigé contre la protéine, sont utilisés. Dans cette même étude, nous avons pu mettre en évidence que l'expression du FGF-2 est également dérégulée dans les modèles animaux avec une augmentation au niveau pulmonaire de rats traités à la monocrotaline. De plus, une étude récente montre également que cette production anormalement élevée de FGF-2 endothéliale joue un rôle crucial dans le phénotype hyperprolifératif et résistant à l'apoptose de la CE pulmonaire HTAPi (Tu *et al.* 2011).

D'autres voies sont également dérégulées dans cette communication intercellulaire. Les souris transgéniques déficientes pour le facteur de transcription PPAR γ au niveau de l'endothélium développent spontanément une HTP (Guignabert *et al.* 2009). Deux mécanismes sont venus étayer le phénotype HTP. D'une part, au niveau pulmonaire, une déficience endothéliale en PPAR γ provoque une altération de l'expression de la protéine apoE. Cette apolipoprotéine diminuée est la cause d'une suractivité du récepteur PDGFR- β

au niveau du muscle lisse et donc de l'hyperplasie de la média. Ce résultat a pu être confirmé par un traitement avec l'imatinib qui a permis de retrouver un phénotype normal chez cette souris transgénique. D'autre part, il a été démontré que la protéine apeline est diminuée dans ce modèle et plus particulièrement au niveau de l'endothélium (Alastalo *et al.* 2011). Ceci contribue à la prolifération exagérée des CML d'artère pulmonaire. Encore une fois, cette étude met en évidence qu'une simple perturbation au niveau de l'endothélium est capable d'engendrer un remodelage vasculaire pulmonaire en influençant le comportement des CML par une induction de prolifération et par une inhibition de la voie anti-proliférative.

Tout récemment, une nouvelle voie a été décrite dans cette communication intercellulaire exagérée : le système rénine-angiotensine-aldostérone (SRAA ou RAAS). Cette voie est altérée en faveur d'un développement de l'HTAP pour plusieurs raisons. D'abord, tous ces facteurs pro-vasoconstricteurs, l'Ang-I et l'Ang-II, sont augmentés au niveau sérique des patients HTAPi (de Man *et al.* 2012). L'activité de la rénine est également significativement augmentée au-delà de la moyenne observée chez les patients sains. Et de manière plus intéressante, nous avons montré que les CE HTAPi, *in vitro*, ont une activité anormalement élevée de l'ACE qui convertit l'Ang-I en Ang-II. De même, l'Ang-II induit une prolifération de CML d'artère pulmonaire qui expriment de manière anormalement élevée les récepteurs AT1R. Dans le modèle expérimental de rats traités à la monocrotaline, un traitement avec l'inhibiteur de l'AT1R, le losartan, réduit considérablement le phénotype HTP des rats.

L'ensemble de ces résultats souligne clairement que la communication intercellulaire entre CE et CML est perturbée dans le cadre de l'HTP. Elle est dérégulée de manière à favoriser localement une hyper-prolifération des CML *via* différents mécanismes moléculaires. Cette communication anormale est liée à la dysfonction endothéliale et au phénotype anormal de la CE HTAP qui sécrète de manière exagérée des facteurs solubles. Cependant et de manière intéressante, l'étude menée par Laurence Dewachter *et al.*, (Dewachter *et al.* 2006) montre que ce phénotype de sécrétion anormale peut être amplifié sous l'influence des CML. En effet, dans cette étude, la CE HTAP présente une expression forte du récepteur Tie2 (ou TEK). L'activation de ce récepteur en présence de son ligand,

l'Ang-I, engendre une production plus importante en 5-HT et en ET-1. En effet, cette voie Ang-I/ Tie2 stimule l'expression de TPH1, d'ECE-1 et de pré-proET-1.

La communication intercellulaire entre CE et CML est altérée en faveur d'un remodelage vasculaire pulmonaire avec une prolifération exagérée des CML. Ces études montrent pour la plupart que la dysfonction endothéliale est à l'origine de cette communication anormale, mais qu'elle peut être amplifiée par les facteurs environnants. En plus de son contact direct avec le sang, l'endothélium communique avec les facteurs solubles sanguins et les cellules circulantes.

3.1.1.3. Anomalies de la coagulation

La coagulation sanguine est un processus complexe aboutissant à la formation de caillots sanguins. Lorsque la paroi d'un vaisseau sanguin est endommagée, un caillot composé d'un réseau de fibrine est formé pour arrêter l'hémorragie. Un ensemble de facteurs complexes issus du système des éléments du sang ou du tissu régule la formation de ce réseau de fibrine. Parallèlement, un ensemble de facteurs du système fibrinolytique active la fibrinolyse. Cet ensemble fait intervenir les plaquettes, les protéines circulantes mais aussi l'endothélium.

La thrombose est ainsi un processus complexe caractérisé par une interaction des CE avec les deux éléments solubles (protéines plasmatiques de la coagulation) et des éléments cellulaires du sang (plaquettes). Dans un état normal, un équilibre existe entre thrombose en cours et prévention de la formation d'un caillot à la fois par des systèmes anti-thrombotiques et fibrinolytiques. Des anomalies de thrombose intravasculaire pulmonaire ont pu être clairement mises en évidence dans l'HTP. En effet, dans une étude menée par Eisenberg, le niveau du fibrinopeptide (un marqueur de la dégradation de la fibrine) est élevé significativement dans tous les patients atteints d'HTP et plus nettement dans 19 cas parmi les 31 patients étudiés (Eisenberg *et al.* 1990). L'endothélium joue un rôle clé dans le maintien de la coagulation normale grâce à l'élaboration de diverses substances telles que les facteurs humoraux, l'héparane sulfaté, la thrombomoduline, *tissue-type plasminogen activator* (t-PA), *urokinase-type plasminogen activator* (u-PA), et le facteur von Willebrand (vWF). Les CE facilitent non seulement le processus thrombotique, mais inhibent également activement la thrombose et sont capables de promouvoir la fibrinolyse. La production et la

libération de NO et de prostacycline, deux inhibiteurs puissants de l'agrégation plaquettaire, par les CE sont des mécanismes importants dans la prévention de la thrombose intra-vasculaire (Vane *et al.* 1990; Moncada *et al.* 1991).

Deux études de cohortes, rétrospectives basées sur des évaluations histologiques de tissus HTAPi, ont évalué le taux de prévalence de l'artériopathie thrombotique isolée à 56% et 57%, respectivement (Fuster *et al.* 1984; Bjornsson and Edwards 1985). Suite à ces analyses, une étude histopathologique plus détaillée des lésions vasculaires pulmonaires des patients du registre « National Institutes of Health Pulmonary Hypertension », a pu établir que 33% des 48 patients disponibles avec un artériopathie pulmonaire présentent des lésions thrombotiques (Pietra *et al.* 1989). Étant donné que ces changements ont été trouvés en l'absence de preuve clinique ou pathologique d'embolie pulmonaire, ils étaient considérés comme de la thrombose *in situ*, comme proposé initialement par Bjornsson et Edwards (Bjornsson and Edwards 1985). Ces lésions thrombotiques *in situ* ont aussi été décrites dans les échantillons pathologiques chez des patients ayant une HTAP associée à la prise de drogues (par exemple, Aminorex) et HTP portale (Edwards *et al.* 1987). Ces observations indiquent une prévalence relativement élevée de lésions thrombotiques chez les patients HTP. Cependant, le rôle exact de la thrombose dans les artères pulmonaires et la micro-vascularisation reste à élucider. Une théorie soutient que l'artériopathie thrombotique est un épiphénomène sous-jacent de l'état hypertensif des vaisseaux pulmonaires et la dysfonction endothéliale des HTP. Un autre point de vue est que les lésions thrombotiques organisées au niveau des lésions vasculaires pulmonaires sont deux aspects indissociables du remodelage pulmonaire, conduisant à un rétrécissement vasculaire luminal et à une augmentation des RVP, contribuant ainsi à la progression de la maladie. Indépendamment du fait que l'artériopathie thrombotique soit une cause ou une conséquence de l'HTAP, l'artériopathie thrombotique participe dans tous les cas à la progression et altère le pronostic de la maladie.

➤ **P-Selectine et Thrombomoduline**

Le P-sélectine est une glycoprotéine produite par l'endothélium et les plaquettes. Une augmentation du niveau de P-sélectine est un marqueur de dysfonction endothéliale et /ou d'activation plaquettaire et peut indiquer la présence d'une hypercoagulabilité (Ruf and Morgenstern 1995). La Thrombomoduline est une protéine produite par des CE, cofacteur

membranaire avec une forte affinité pour la thrombine, et qui permet à l'endothélium de cliver le fibrinogène ou d'activer les plaquettes. De plus, la thrombomoduline active rapidement les protéines C.

Le système anticoagulant thrombomoduline/protéine C est réduit dans l'HTP à cause d'une augmentation de la thrombomoduline soluble, une anomalie qui peut jouer un rôle dans la progression de la maladie (Welsh *et al.* 1996). Dans une étude menée au Japon sur des patients HTAPi, des patients d'HTAP associée à une maladie veino-occlusive et des patients d'HTP associées à d'autres pathologies, le niveau plasmatique de P-sélectine a été retrouvé augmenté par rapport à une population contrôle. Inversement, le niveau de la thrombomoduline lui a été retrouvé diminué. Après la perfusion d'agoniste de prostacycline, le niveau de P-sélectine s'est vu diminué et le niveau de thrombomoduline augmenté, suggérant que la dysfonction endothéliale participe en partie à la thrombose *in situ* (Sakamaki *et al.* 2000).

➤ **Le Facteur von Willebrand (vWF)**

Le facteur vWF, une grande glycoprotéine multimérique, est synthétisé par l'endothélium et les mégacaryocytes. Stocké dans les corps Weibel-Palade, il est libéré suite à une perturbation de l'endothélium. Les vWF multimères fonctionnels se lient au collagène dans les zones de lésion vasculaire et initient la formation d'agrégat plaquettaire.

Dans l'HTAPi ou HTP associée à une cardiopathie congénitale, les taux plasmatiques et l'activité du facteur vWF sont augmentés significativement (Rabinovitch *et al.* 1987). De plus, ces auteurs ont observé *in situ* que cette expression était intense au niveau de l'endothélium sur des biopsies des patients HTAP (Rabinovitch *et al.* 1987). De plus, le taux élevé de ce facteur corrèle au taux de mortalité des patients (Lopes *et al.* 2000).

➤ **Le Système Plasminogène–Plasmine**

Les CE sont une source d'activateur du plasminogène tissulaire humain (t-PA), un activateur clé du plasminogène dans la cascade fibrinolytique. D'autre part, les CE synthétisent et libèrent également la protéine *plasminogen activator inhibitor* (PAI)-1, un inhibiteur du t-PA, soulignant le rôle de l'endothélium dans la régulation de l'équilibre délicat des processus pro-thrombotiques et anti-thrombotiques.

Il y a plusieurs éléments de preuve indiquant que le dysfonctionnement des CE pourrait interférer avec l'équilibre normal du système plasminogène-plasmine : des anomalies du système tPA-plasmine et du système de l'activateur du plasminogène du type urokinase (uPA)-plasmine ont été reportées (Huber *et al.* 1994 ; Kouri *et al.* 2008). De plus, les CE des artères pulmonaires libèrent le t-PA en réponse à divers stimuli comme la thrombine. Comme le tPA ne dispose que d'une activité limitée sur le caillot de fibrine préexistant, la production locale et aigue du t-PA joue un rôle majeur dans la fibrinolyse et, par conséquent, dans le maintien de l'état anti-thrombotique dans la circulation pulmonaire. D'autre part, une augmentation des taux de PAI-1 a été trouvée dans le plasma de 17 sur 29 patients HTAPi (Eisenberg *et al.* 1990).

➤ Les Plaquettes

Les lésions thrombotiques et le dysfonctionnement des plaquettes semblent être également importants dans le développement de l'HTP (Herve *et al.* 2001). En effet, la formation anormale de thrombus serait due et aggravée par des anomalies de la cascade de la coagulation, des CE et/ou des plaquettes. Les anomalies vasculaires, plus particulièrement au niveau de l'endothélium chez les patients HTP, peuvent conduire à une libération plaquettaire de différents facteurs pro-coagulants, vaso-actifs ou mitogènes (Pietra *et al.* 1989; Johnson *et al.* 2006; White *et al.* 2007). Les plaquettes sont en effet très riches en un grand panel de différents facteurs pro-prolifératifs, vaso-conctricteurs et pro-fibrosants : on retrouve par exemple de la sérotonine, du glutamate, du thromboxane A₂, du PDGF, du TGF- β et du VEGF. Une diminution de la numération des plaquettes et une augmentation de l'activité plaquettaire sont retrouvées dans différentes formes d'HTP humaine (Herve *et al.* 2001). Il est probable que l'hypercoagulabilité et les microthromboses *in situ* contribuent à la progression de la maladie. Cependant, dans la plupart des cas, on ignore si la thrombose et les anomalies plaquettaires sont des causes ou des conséquences de l'HTAP (Herve *et al.* 2001). Les rats « *fawn-hooded rat* (FHR) » qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la sérotonine dans les plaquettes développent lentement une HTP et étaye fortement cette hypothèse (Sato *et al.* 1992). La thérapie par anti-coagulants semblerait améliorer la survie chez les patients HTAPi bien que des études supplémentaires soient encore nécessaires pour valider l'ensemble de ces données (Fuster *et al.* 1984).

3.1.1.4. Les anomalies endothéliales intrinsèques

Les CE sont en permanence sous influence de l'environnement et de leurs cellules avoisinantes. Leur comportement change pour s'adapter aux différents facteurs présents dans l'environnement et peuvent aussi à leur tour moduler ce même environnement. En réponse à ces signaux de communication, les CE peuvent soit proliférer, migrer, libérer des facteurs ou même enclencher une apoptose. Dans les vaisseaux, l'endothélium est en permanence sous l'influence de la pression partielle en O₂ (hypoxie), des forces hémodynamiques ou « shear stress », d'hormones ou de drogues, de médiateurs de l'inflammation ou de l'autoimmunité. Mais lorsqu'elles sont retirées de cet environnement HTAP, les CE HTAP isolées des patients maintiennent des anomalies *in vitro*, ce qui suggère qu'elles possèdent des anomalies qui leur sont propres. Nous avons vu que les CE en culture isolées de patients HTAP ont un phénotype altéré avec une production anormale de différents facteurs : tels que des molécules vasoréactives (5-HT, ET-1, Ang-II), des chemokines (monocyte chemoattractant protein, MCP-1), des facteurs de croissances (FGF-2, PDGF, EGF) et une diminution dans la synthèse de NO ou de prostacycline. Les productions anormales de ces facteurs par les CE *in vitro* suggèrent que ces cellules possèdent des anomalies intrinsèques qui lui sont propres dont les mécanismes restent encore à élucider. Cependant, une étude récente a pu mettre en évidence un lien étroit entre Bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-II et activation de la NOS3 (Gangopahyay *et al.* 2011). Or ce gène est souvent muté ou alors négativement régulé dans les HTP. De même, un phénotype hyper-prolifératif et résistant à l'induction d'apoptose a pu être mis en évidence (Masri *et al.* 2007), un phénotype anormal lié à une boucle autocrine FGF-2 résultant en une surexpression de facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et à une activation constitutive de la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *extracellular-signal-regulated kinases* (ERK) 1 et 2 (Tu *et al.* 2011). D'autres travaux suggèrent également l'implication d'une activation persistante du facteur *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-3, et de la protéine de pro-survie Mcl-1 (Masri *et al.* 2007).

Ces anomalies intrinsèques peuvent aussi être liées à des anomalies d'ordre génétique ou chromosomique. Plusieurs études récentes donnent des preuves en ce sens. Il est bien connu que les mutations du gène BMPR-II sont impliquées incontestablement dans la pathogenèse de l'HTAP en induisant une apoptose de CE et permettant l'émergence de

cellules clonales anormales. Comme la pénétrance du gène muté est incomplète, il existe probablement une implication d'autres gènes comme le décrit récemment le groupe d'Austin en ce qui concerne le gène *CAV1* (Austin *et al.* 2012). Par la technique de séquençage exomique, ils ont découvert des mutations de ce gène dans plusieurs cas d'HTAP héritable. Chez ces patients mutés pour ce gène, l'expression de la protéine est diminuée de façon très significative au niveau de l'endothélium. D'autres gènes ont également été décrits : *ACVRL1 (ALK1)*, *SMAD9 (Smad8)*, *ENG* et *KCNK3* (Chaouat *et al.* 2004; Shintani *et al.* 2009; Girerd *et al.* 2010; Nasim *et al.* 2011 ; Ma *et al.* 2013). Des instabilités des microsatellites et des anomalies chromosomiques ont été également décrites (Yeager *et al.* 2001; Aldred *et al.* 2010). Dans cette dernière étude, des réarrangements chromosomiques au niveau de l'endothélium *in situ* ou *in vitro* ont été trouvés chez 5 des 9 patients HTAPi étudiés. Il existe également des anomalies dans le métabolisme énergétique (« effet Warburg ») et une nette diminution du nombre de mitochondries par CE (Xu *et al.* 2007). Pour résumer, un ensemble d'anomalies intrinsèques a été retrouvé dans les CE HTAP et une meilleure compréhension de ce phénotype endothélial anormal est requise.

3.1.2. Les cellules musculaires lisses pulmonaires

Les CML font partie des éléments constitutifs majeurs des parois des artères pulmonaires (média). La prolifération et la migration excessive des CML d'artères pulmonaires expliquent en partie la néo-muscularisation de ces vaisseaux qui normalement sont non muscularisés, ainsi que la muscularisation exagérée des plus grosses artères pulmonaires (<500µm)(Tu *et al.* 2012). Associées à leurs potentiels prolifératifs et migratoires excessifs, les CML d'artères pulmonaires dans l'HTAP synthétisent de manière plus importante de nombreux composants de la MEC, comme le collagène, la ténascine et la fibronectine, et participent ainsi de manière active au remodelage artériel pulmonaire de la maladie (Jones and Rabinovitch 1996 ; Jones *et al.* 1997 ; Rabinovitch 2001; Ma *et al.* 2011; Wei *et al.* 2012). En effet, la MEC constitue un réservoir très important de facteurs de croissance et de cytokines qui se retrouvent piégés temporairement avant d'être relargués suite à l'action de diverses protéases comme les MMP et les élastases (Lepetit *et al.* 2005; Kim *et al.* 2011; Kwapiszewska *et al.* 2012). La libération de ces différentes molécules crée un microenvironnement tissulaire favorable à la prolifération, à la survie et migration des CML et CE environnantes (Bendeck *et al.* 1994 ; Jones *et al.* 1997 ; Ma *et al.* 2011). De plus, tout

comme pour les CE pulmonaires, les CML d'artères pulmonaires présentent plusieurs anomalies intrinsèques majeures qui jouent un rôle important dans le remodelage vasculaire associé à l'HTAP. Les CML d'artères pulmonaires de patients HTAP présentent une surexpression de 5-HTT, un phénomène important pour expliquer leur hyper-prolifération dans la maladie (Eddahibi *et al.* 2001 et 2002). De même, il a clairement été noté que les CML d'artères pulmonaires, en fonction des différents territoires vasculaires, présentent à leur surface des distributions de canaux potassiques très différentes (Archer *et al.* 1996; Coppock and Tamkun 2001). Par exemple, les CML d'artères pulmonaires distales présentent plus de canaux potassiques voltage-dépendant Kv1.5 que les CML d'artères pulmonaires proximales. Les CML d'artères pulmonaires isolées à partir de patients souffrant d'HTAP conservent également *in vitro* certaines de ces caractéristiques et représentent également de bons outils d'étude pour la maladie (Eddahibi *et al.* 2001; Guignabert *et al.* 2005; Guignabert *et al.* 2009 ; Tu *et al.* 2012).

3.1.3. Les fibroblastes pulmonaires des parois vasculaires

Le rôle et l'importance des fibroblastes pulmonaires des parois vasculaires, essentiellement présents dans l'adventice, restent très obscurs mais pourraient s'apparenter à celui des CML d'artères pulmonaires. Les fibroblastes sont connus pour leur facilité à proliférer, à migrer et à synthétiser de grandes quantités de composés matriciels. D'autre part, plusieurs hypothèses suggèrent que les CE pulmonaires et/ou les CML d'artères pulmonaires pourraient se différencier et se rapprocher d'un phénotype pro-fibroblastique et ainsi participer au remodelage artériel pulmonaire (Stenmark and Frid 1998). Dans l'HTAP hypoxique, les fibroblastes ont été retrouvés comme étant l'un des premiers types cellulaires à proliférer et à synthétiser des composés matriciels (Stenmark *et al.* 2002). De plus, les fibroblastes, par leur synthèse active de plusieurs protéases comme la MMP-2 et MMP-9, faciliteraient la migration cellulaire dans la paroi vasculaire (Lepetit *et al.* 2005) et la mise en place de la néo-vascularisation des *vasa vasorum* présente dans de nombreuses formes d'HTAP (Gambaryan *et al.* 2010, 2011 et 2012 ; Montani *et al.* 2011). La formation de ces vaisseaux adventitiels pourrait être une voie d'accès pour les cellules progénitrices et ainsi contribuer à l'épaississement de la média et de l'adventice vasculaire (Davie *et al.* 2004; Gambaryan *et al.* 2012).

3.1.4. Le remodelage de la MEC

Le remodelage de la MEC, ainsi que de la membrane basale par les protéases comme les MMP-2 et MMP-9, représente plus qu'un simple remodelage qui supprime la barrière physique qui sépare les cellules de tout ce qui les entoure. En effet, cette modification de la MEC permet de générer des signaux par la libération de molécules séquestrées (Mueller and Fusenig 2004). Plusieurs protéases remodelent la MEC et plusieurs de ces acteurs sont anormalement abondants et/ou actifs dans l'HTAP. En effet, plusieurs évidences révèlent des déséquilibres de balance protéolytiques en faveur des activités élastinolytiques (Rabinovitch 1999; Kim *et al.* 2011), gélatinolytiques (Lepetit *et al.* 2005) et collagénolytiques (Lepetit *et al.* 2005; George *et al.* 2012). De plus, des surabondances de chymase (Mitani *et al.* 1999), de tryptase (Kwapiszewska *et al.* 2012) et des anomalies du système tPA-plasmine et du système uPA-plasmine ont été mises en évidence dans l'HTAP (Huber *et al.* 1994; Christ *et al.* 2001 ; Kouri *et al.* 2008). L'ensemble de ces activités protéasiques excessives est connu pour entraîner le clivage de plusieurs composés de la MEC comme par exemple la laminine et la fibronectine, conduisant donc à une stimulation du remodelage (Duffy 2002). De nombreux autres facteurs sont présents dans la MEC et sont libérés au cours de son remodelage, comme par exemple, le FGF-2, le TGF- β , la 5-HT (Rabinovitch 2001; Ma *et al.* 2011; Wei *et al.* 2012). Les inhibiteurs de l'élastase ont montré une réelle efficacité contre la progression de l'HTP dans les modèles animaux (Ilkiw *et al.* 1989 ; Maruyama *et al.* 1991 ; Cowan *et al.* 2000). De manière similaire, des effets bénéfiques des inhibiteurs des MMP ont été retrouvés dans le modèle monocrotaline (Vieillard-Baron *et al.* 2003). En revanche, l'inhibition des MMP par la doxycycline ou la surexpression d'un inhibiteur naturel des MMP (tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1) à l'aide d'un adénovirus, s'est avérée délétère dans le modèle d'hypoxie chronique (Vieillard-Baron *et al.* 2000). Ces derniers résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des mécanismes physiopathologiques différents entre modèles animaux et des études plus approfondies sont requises.

3.2. L'inflammation et les réponses immunes dans l'HTAP

Ces dernières années, le rôle clé de l'inflammation, du dérèglement de certaines réponses immunes voire du développement de l'autoimmunité, a été clairement mis en

évidence comme étant au moins un stimulus amplificateur et/ou aggravant des lésions vasculaires dans l'HTAP. Ces aspects seront développés dans la section B, *Système immunitaire et autoimmunité dans l'HTAP*, de cette introduction.

3.3. Les facteurs de croissance

Plusieurs facteurs et voies de signalisation sont impliqués dans la prolifération et migration anormale ainsi que dans la survie cellulaire associée à l'HTP comprenant entre autres des facteurs de croissance (*platelet-derived growth factor* ou PDGF, *epidermal growth factor* ou EGF, *fibroblast growth factor* ou FGF), des cytokines et chemokines (interleukines IL-1, IL-6, ou *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1 ou CCL2)) et d'autres molécules comme les protéines morphogéniques osseuses (BMP). Ces molécules exercent leurs effets par fixation à des récepteurs présentant soit une activité tyrosine kinase (RTK) ou une activité serine/thréonine kinase et par la transduction d'un signal mitogène. Plusieurs anomalies d'expression ou d'activité de ces différents récepteurs ainsi que des défauts dans la transmission du signal ont pu être mises en évidence et impliquées dans ces phénomènes d'hyper-prolifération et de résistance à l'apoptose (Humbert *et al.* 1995; Du *et al.* 2003; Benisty *et al.* 2004; Perros *et al.* 2008; Dahal *et al.* 2010; Reynolds *et al.* 2012).

3.3.1 Voie de signalisation du *platelet-derived growth factor* (PDGF)

La famille du PDGF forme une famille de facteurs de croissance homodimériques (PDGF-A, -B, -C et -D) ou hétérodimériques (PDGF-AA, -AB, -BB, -CC et -DD). Cet assemblage se produit de manière intracellulaire juste avant leur libération. Au contraire des formes PDGF-AA, -AB, -BB qui sont directement actives suite à leur sécrétion, les formes PDGF-CC et -DD doivent perdre leur domaine CUB (complément C1r/C1s, Uegf, Bmp1) avant de devenir actives. Il existe trois récepteurs différents qui résultent de la combinaison de deux sous-unités -a et -b suite à la liaison d'un des ligands : PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ et PDGFR- $\beta\beta$. Des différences d'affinité ligand/récepteur existent : le PDGF-AA ne se fixe que sur le PDGFR- $\alpha\alpha$, tandis que le PDGF-BB est le seul à se lier de manière équivalente à toutes les formes de récepteurs avec une haute affinité ; les PDGF-AB et -CC peuvent assembler et activer les récepteurs PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$; le PDGF-DD active avec haute affinité le PDGFR- $\beta\beta$ et

avec une moindre efficacité le récepteur PDGFR- $\alpha\beta$. Chaque PDGFR est un récepteur et s'auto-phosphoryle, ce qui est suivi ensuite d'une activation en cascade d'autres protéines cytoplasmiques pour la transmission du signal intracellulaire. Une fois activés, les récepteurs sont internalisés et leur fonction protéine kinase inhibée, ce qui assure un rétrocontrôle et permet une régulation précise de la réponse au stimulus. Le PDGF stimule la prolifération cellulaire et possède un fort pouvoir chimiotactique vis-à-vis des polynucléaires neutrophiles, fibroblastes, CML et CE (Tanabe *et al.* 2000; Berk 2001; Yamboliev and Gerthoffer 2001; Raines 2004). De plus, le PDGF est considéré comme un facteur pro-angiogénique ayant également des effets stimulateurs sur les péricytes et les CML, cellules indispensables à la stabilisation des vaisseaux néoformés (Carmeliet 2005).

Balasubramaniam *et al.* (Balasubramaniam *et al.* 2003) ont été les premiers à noter une surabondance de PDGF dans l'HTP intra-utérine chronique provoquée par la ligature du canal artériel et à évoquer le possible rôle de cette voie dans la maladie. Cette hypothèse a pu être validée par l'équipe de Schermuly (Schermuly *et al.* 2005), qui a montré que l'imatinib, un antagoniste du PDGFR, réduisait le développement de la maladie dans les modèles animaux d'HTP induit par l'administration de monocrotaline ou l'exposition à l'hypoxie chronique. Dans ces mêmes travaux, une surexpression protéique du PDGFR- β avait pu également être notée dans des homogénats pulmonaires de patients HTAP. Cependant, la preuve d'anomalies de cette voie a pu être clairement mise en évidence par Perros *et al.* (Perros *et al.* 2008). Dans les tissus humains d'artères pulmonaires micro-disséqués de patients HTAPi, une surexpression des ARNm codant pour le PDGF-A, PDGF-B, PDGFR- α , and PDGFR- β a pu être notée. De même, l'augmentation protéique du PDGFR- β a pu être validée ainsi qu'une activation anormale du récepteur PDGFR- β dans les lésions vasculaires. Récemment, des données ont pu également montrer que la sérotonine internalisée par son transporteur 5-HTT pouvait trans-activer le PDGFR- β , un phénomène important dans la prolifération des CML d'artères pulmonaires au cours du remodelage artériel pulmonaire HTAP (Ren *et al.* 2011).

3.3.2 Voie de signalisation du *fibroblast growth factor* (FGF)

La famille des FGF forme un groupe d'au moins 23 membres qui sont fortement conservés au cours de l'évolution et exprimés de manière ubiquitaire. Il s'agit de

polypeptides d'environ 150 acides aminés, synthétisés par les fibroblastes, les CE et CML. Ils agissent sur une famille de 4 récepteurs spécifiques de haute affinité : FGFR-1, -2, -3 et -4. Les FGF se lient à leur récepteur par l'intermédiaire d'héparane sulfate protéoglycanes (protéines associées à la matrice extracellulaire et modifiées par l'addition d'héparane sulfate). Lors de la liaison d'un des ligands, une dimérisation du récepteur se produit, suivie d'activation tyrosine kinase par trans-autophosphorylation qui déclenche le signal mitogénique.

De part de ses effets pléiotropiques allant de la prolifération, la survie, la migration, l'induction de la production de composés de la MEC à la différenciation et l'angiogenèse (Goncalves 1998), le FGF-2 a suscité beaucoup d'intérêt dans l'HTP. Sa synthèse par les cellules vasculaires pulmonaires est induite par l'exposition à l'hypoxie et le shear stress (Quinn *et al.* 2002; Li *et al.* 2003). Les niveaux sériques et pulmonaires de FGF-2 sont anormalement élevés aussi bien dans les modèles animaux d'HTP que dans l'HTP humaine. En effet, une élévation de 51% du taux circulant et de 21% du taux urinaire de FGF-2 est retrouvée chez les patients HTAPi en comparaison à une population contrôle (Benisty *et al.* 2004). De plus, cette surabondance de FGF-2 a pu être retrouvée dans 2 modèles expérimentaux d'HTP : shunt aorto-pulmonaire chez l'agneau (Wedgwood *et al.* 2007) et administration de monocrotaline (Arcot *et al.* 1995; Izikki *et al.* 2009). Notre équipe a également pu montrer que le FGF-2 était surproduit par les CE HTAP aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*, et que cette anomalie jouait un rôle déterminant dans l'hyperplasie du muscle lisse et dans l'acquisition d'un phénotype anormal de la CE (Izikki *et al.* 2009; Tu *et al.* 2011). De plus, le FGF-2 peut être séquestré et stocké localement dans le réseau de MEC et être relargué en grande quantité lors des phénomènes de remodelage matriciel (Benezra *et al.* 1993; Thompson and Rabinovitch 1996; Buczek-Thomas and Nugent 1999; George *et al.* 2001).

3.3.3 Voie de signalisation de l'*epidermal growth factor* (EGF)

La famille des facteurs EGF est constituée de l'EGF, du facteur de croissance transformant- α (TGF- α), de l'*heparin-binding EGF-like* (HB-EGF), de l'épiréguline, de l'amphiréguline (AR), de l'épigène, de la bêta-celluline (BTC), et de la neuréguline -1, -2, -3 et -4. Il existe quatre types de récepteurs de l'EGF (EGFR), comprenant l'ErbB1, aussi appelé

EGFR ou HER1, l'ErbB2 (Neu/Her2), l'ErbB3 (Her3), et l'ErbB4 (Her4). Ces récepteurs de l'EGF ont un domaine de liaison pour le ligand dans le domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique à activité tyrosine kinase. Chaque ligand peut se lier à un même récepteur, mais des affinités de liaison différentes sont observées. L'EGF, HB-EGF, le TGF- α , AR, la BTC, et l'épiréguline sont capables de se lier à ErbB1. L'HB-EGF, l'épiréguline, et la BTC sont connus pour se lier à ErbB4 ainsi que ErbB1. Les neurégulines sont des ligands pour ErbB3 et ErbB4. Lors de liaison au ligand, des monomères EGFR se dimérisent et une autophosphorylation dans le domaine intracellulaire se produit, conduisant à l'activation de voies de signalisation intracellulaires.

Plusieurs éléments suggèrent que le système de signalisation EGF contribue à la réponse proliférative des CML et qu'il pourrait être impliqué dans l'initiation et/ ou la progression du remodelage vasculaire pulmonaire dans l'HTAP. Plusieurs études ont démontré que l'EGF se co-localisait avec la ténascine-C, un composé de la MEC présent abondamment dans les lésions obstructives des patients HTAP et qu'ainsi il conduirait à une prolifération et à une migration des cellules vasculaires (Jones *et al.* 1997; Cowan *et al.* 1999 ; Cowan *et al.* 2000). Ce rôle pathogène de la signalisation de l'EGF est renforcé par les données obtenues dans divers modèles animaux. En effet, des souris transgéniques sur-exprimant le TGF- α sous le contrôle du promoteur de la protéine surfactant humaine SP-C (les souris TGF- α) développent une HTP sévère et présentent un remodelage vasculaire caractéristique avec une musculation anormale des petites artères pulmonaires (Le Cras *et al.* 2003). De plus, ce phénotype HTP est redevenu normal avec une souris double transgénique exprimant à la fois le TGF- α et un récepteur EGF muté, négatif-dominant sous le contrôle du même promoteur SP-C.

3.3.4 Voie de signalisation du *vascular endothelial growth factor* (VEGF)

La famille des VEGF comprend le facteur de croissance placentaire (PlGF), le VEGF-A, -B, -C, le -D et -E. Le VEGF en se liant à ses récepteurs de type tyrosine kinase de haute affinité (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4) est impliqué dans le nombreux processus biologiques et plus particulièrement au niveau des CE. Le VEGF est indispensable pour la formation du lit vasculaire pendant l'embryogenèse. Les souris transgéniques déficientes en VEGF ne sont pas viables et meurent au stade embryonnaire avec une

vasculogénèse anormale du cœur et des vaisseaux (Carmeliet *et al.* 1996). La voie VEGF/VEGFR est impliquée dans la prolifération de CE, la synthèse du NO et de la prostacycline, l'angiogénèse et le contrôle de la perméabilité vasculaire (Dimmeler and Zeiher 1999; He *et al.* 1999). Chez les patients HTAPi, l'expression du VEGF et du VEGFR-2 est accrue dans les vaisseaux pulmonaires et dans les lésions plexiformes (Cool, Kennedy *et al.* 1997; Tuder *et al.* 2001; Voelkel *et al.* 2006) : le VEGF étant plus abondant au niveau du muscle lisse et le VEGFR-2 au niveau de l'endothélium. Le VEGFR-1 est principalement exprimé dans les CE des vaisseaux pulmonaires adjacents aux lésions plexiformes. Le contenu plaquettaire en VEGF des patients HTAPi est également augmenté par rapport aux sujets témoins (Eddahibi *et al.* 2000). Les données obtenues au travers des modèles animaux sont beaucoup moins claires et soulèvent plusieurs interrogations. L'expression pulmonaire du VEGF est augmentée dans le modèle d'HTP induite par hypoxie chronique chez le rat (Christou *et al.* 1998), mais c'est plutôt une diminution de l'expression du VEGF qui a été montrée dans les poumons des rats présentant une HTP induite par l'injection de monocrotaline (Partovian *et al.* 1998). La surexpression du VEGF protège de l'HTP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Partovian *et al.* 2000; Louzier *et al.* 2003) et par injection de monocrotaline (Campbell *et al.* 2001). L'expression du VEGF et de son récepteur VEGFR-2 est également augmentée dans deux autres modèles d'HTAP : un modèle d'HTP sur défaillance cardiaque induite par *overpacing* chez le chien (Ray *et al.* 2008) et le modèle d'HTP induite chez les porcelets avec un shunt cardiaque (Rondelet *et al.* 2003). Dans le cœur droit, l'expression du VEGF est accrue dans le modèle hypoxique alors qu'elle est diminuée dans le modèle par injection de monocrotaline (Partovian *et al.* 1998).

Les isoformes VEGF-A et B sont largement étudiées dans l'HTAP et un rôle protecteur leur a été attribué (Partovian *et al.* 2000; Campbell *et al.* 2001; Louzier *et al.* 2003). Dans le modèle d'HTP induite par la monocrotaline, une thérapie cellulaire sur-exprimant le VEGF-A protège contre le développement de la maladie. Dans le modèle d'HTP induite par exposition de rats à une hypoxie chronique, Louzier *et al.* ont montré que la surexpression de VEGF-B à l'aide d'adénovirus est également protecteur. Cependant, les souris déficientes en VEGF-B ont une susceptibilité au développement de l'HTP hypoxique identique aux souris sauvages. Ces données expérimentales suggèrent que le VEGF ne jouerait pas un rôle central dans le développement de la maladie mais qu'il pourrait être utile pour limiter sa

progression (Louzier *et al.* 2003). D'autre part, l'association du blocage du VEGFR-2 (SU5416) et de l'hypoxie chronique induit une dysfonction endothéliale, associée à une mort cellulaire permettant de sélectionner un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose parmi les CE des artères pulmonaires. La conséquence de ce traitement est le développement d'une HTP sévère (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001). Ces résultats présentent l'apoptose des CE comme l'origine d'une susceptibilité au développement des maladies vasculaires (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001; Sakao *et al.* 2007).

3.3.5. Voie de signalisation de la sérotonine (5-HT)

Le système sérotoninergique a longtemps été suspecté comme participant activement à la progression de la maladie et à son initiation. En effet, les taux plasmatiques de 5-HT sont anormalement élevés chez les patients HTAP et restent élevés même après transplantation pulmonaire, suggérant que cette anomalie n'est pas une conséquence de la maladie (Herve *et al.* 1995). Le 5-HTT est surexprimé dans les CML d'artères pulmonaires HTAP *in situ* et *in vitro* et corrèle avec la sévérité de la maladie (Eddahibi *et al.* 2001; Eddahibi *et al.* 2002; Marcos *et al.* 2004). La TPH est elle-même également surexprimée dans les CE pulmonaires de patients HTAPi (Eddahibi *et al.* 2006). Des défauts de stockage en 5-HT ou une consommation excessive de plaquettes par le poumon pourraient mener au développement de la maladie (Herve *et al.* 1990; Herve *et al.* 1995; Eddahibi *et al.* 2000). D'autre part, les anorexigènes, fenfluramine et dexfenfluramine, ont été associés à un plus grand risque de développement de la maladie (Douglas *et al.* 1981; Brenot *et al.* 1993; Abenhaim *et al.* 1996). De plus, des phénomènes de sérotonylation de RhoA ont pu être mis en évidence, un phénomène impliqué dans l'activation constitutive de la voie Rho/ROCK (Guilluy *et al.* 2009). Enfin, des liens directs entre le 5-HTT et l'expression/ activité des Kv1.5 ont émergé (Guignabert *et al.* 2006; Guignabert *et al.* 2009).

Les modèles animaux d'HTP ont pu renforcer et aider à mieux comprendre le rôle du système sérotoninergique. En effet, les rongeurs exposés aux anorexigènes (Eddahibi *et al.* 1998), à la monocrotaline ou exposés à l'hypoxie chronique possèdent des taux élevés de 5-HT circulante. L'infusion chronique de 5-HT à l'aide de pompes osmotiques permet également de renforcer la gravité de l'HTP induite par l'hypoxie (Eddahibi *et al.* 1997). Les souris déficientes en BMPR-II sont également plus sensibles à l'infusion de 5-HT (Long *et al.*

2006). Les rats «*fawn-hooded*» qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la sérotonine dans les plaquettes développent lentement une HTP en vieillissant (Sato *et al.* 1992). Ces rats FHR possèdent également des niveaux de 5-HTT plus élevés que des animaux témoins (Sato *et al.* 1992). De même, les rats surexprimant l'Ang-I synthétisent plus de 5-HT et développent un phénotype HTP (Sullivan *et al.* 2003). Des travaux dans le laboratoire ont également pu mettre en évidence une augmentation très précoce de l'expression de 5-HTT avant même les modifications des paramètres hémodynamiques dans le modèle monocrotaline, suggérant un rôle central du 5-HTT dans la maladie (Guignabert *et al.* 2005). D'ailleurs les inhibiteurs de la recapture de la 5-HT (comme la Fluoxétine) protègent et régressent l'HTP induite par la monocrotaline (Wang *et al.* 1999; Marcos *et al.* 2003; Guignabert *et al.* 2005; Guignabert *et al.* 2009). Les souris transgéniques déficientes en 5-HTT sont protégées contre le développement de l'HTP induite par l'hypoxie chronique (Eddahibi *et al.* 2000). Ceci est également vrai pour les souris déficientes en TPH (Izikki *et al.* 2007). Enfin, des évidences directes de son rôle dans la maladie sont venues de la démonstration que la surexpression du 5-HTT induisait un phénotype d'HTP spontanée chez la souris : 1) souris SM22 5-HTT+ sur-exprimant le 5-HTT sélectivement dans les CML sous le contrôle du promoteur SM22 (Guignabert *et al.* 2006) ; 2) souris SERT+ sur-exprimant de manière ubiquitaire le 5-HTT grâce à une construction de type «*yeast artificial chromosome*» (YAC) (MacLean *et al.* 2004).

Des quatorze récepteurs 5-HTR, le 5-HT-2A, -2B et -1B semblent particulièrement intéressants dans la maladie. De fortes expressions des récepteurs 5-HT-1B, -2A, et -2B ont pu être notées par l'immunohistochimie dans les artères pulmonaires de patients HTAPi (Marcos *et al.* 2005). De plus, des liens étroits entre le 5-HTT et les 5-HTR ont pu être mis en évidence et encouragent des études supplémentaires pour mieux comprendre ce réseau complexe (Lawrie *et al.* 2005). L'inhibition du 5-HT2A inhibe le remodelage artériel pulmonaire et l'HTP induite par la monocrotaline pyrrole chez la souris (Hironaka *et al.* 2003) et la vasoconstriction induite par la 5-HT chez des rats sains ou exposés à l'hypoxie (Cogolludo *et al.* 2006). Cependant des effets systémiques ont été reportés avec la kétansérine (un inhibiteur sélectif du 5-HT2B) qui limite son utilisation dans l'HTP (Frishman *et al.* 1995). Les souris déficientes en 5-HT2B sont protégées contre le développement de la maladie et l'administration d'un inhibiteur 5-HT2B (RS-127445) limite le développement de

la maladie dans le modèle hypoxique (Launay *et al.* 2002). D'autre part, il aurait été démontré que le 5-HT_{2B} contrôle les niveaux de 5-HT circulante et cette perte de fonction prédisposerait au développement de la maladie par les fenfluramines (Blanpain *et al.* 2003). Des inhibiteurs à plus large spectre d'action 5-HT_{2A}/5-HT_{2B} sont aussi efficaces et permettent de protéger contre le développement de l'HTP induite par la monocrotaline chez le rat (Dumitrascu *et al.* 2011). Le 5-HT_{1B} est impliqué dans la vasoconstriction des artères pulmonaires (Morecroft *et al.* 1999) et dans le développement de l'HP induite par l'exposition à l'hypoxie chronique (Keegan *et al.* 2001). Récemment, Morecroft *et al.* ont pu montrer que la co-inhibition du récepteur 5-HT_{1B} et du 5-HTT avec le LY393558 serait plus effective dans la prévention et la réversion de la maladie, ce qui ouvre un nouveau champ d'exploration de ces molécules (Morecroft *et al.* 2010).

3.3.6 Autres voies de signalisation émergentes

Plusieurs autres études ont également obtenu quelques évidences supportant le rôle d'autres facteurs de croissance pour l'HTAP, dont : le *connective tissue growth factor* (CTGF) (Lee *et al.* 2005), le *hepatocyte growth factor* (HGF) (Ono *et al.* 2004), le *nerve growth factor* (NGF) (Ieda *et al.* 2004) et le *placenta growth factor* (PIGF) (Sundaram *et al.* 2010).

3.4. Les cellules progénitrices

Le rôle des cellules progénitrices dans l'HTAP reste à élucider, car les données actuelles restent controversées et requièrent des études supplémentaires. Des essais de thérapie génique à l'aide de cellules endothéliales progénitrices (EPC) autologues programmées pour sur-exprimer la eNOS sont en cours d'évaluation dans un essai clinique. Les EPC ont été choisies dans cet essai clinique car elles représentaient une catégorie de cellules progénitrices prometteuses. Cependant, les cellules souches mésenchymateuses pourraient être tout aussi intéressantes du fait de leur multipotence et de leur tendance à s'accumuler aux niveaux de sites lésés et inflammés (Ozawa *et al.* 2008; Myers *et al.* 2010). Par conséquent, la compréhension des mécanismes de différenciation est requise pour développer de nouveaux outils et de potentielles stratégies dans le traitement de l'HTP.

3.5. Les acteurs moléculaires impliqués dans les changements métaboliques

Contrairement à la cellule normale, qui dépend principalement de la phosphorylation oxydative mitochondriale pour générer son énergie, la plupart des cellules cancéreuses et des cellules vasculaires pulmonaires HTAP utilisent la glycolyse même en présence d'oxygène. Ce phénomène de détournement métabolique a été décrit par Otto Warburg en 1924 et se nomme « effet Warburg ». Bien que moins efficace que la phosphorylation oxydative pour produire l'adénosine 5'-triphosphate (ATP), la glycolyse aérobie semble toutefois avantageuse pour les cellules à fort pouvoir prolifératif. Ce paradoxe apparent a fait l'objet de très nombreux travaux ces dernières années (Michelakis *et al.* 2002; Bonnet *et al.* 2006; Archer *et al.* 2008). En fait, l'effet Warburg faciliterait la captation et l'incorporation d'éléments nécessaires au renouvellement cellulaire (par exemple, les nucléotides, acides aminés et lipides) plutôt que le rendement énergétique. Cependant les mécanismes de ce shift métabolique sont méconnus. Dans les cellules cancéreuses, ce changement métabolique a été démontré comme étant sous le contrôle de plusieurs oncogènes et suppresseur de tumeur, incluant entre autres : *hypoxia inducible factor* (HIF) (Goda and Kanai 2012), p53 (Puzio-Kuter 2011), *E2F transcription factor 1* (Blanchet *et al.* 2011) et *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) (Garcia-Cao *et al.* 2012). Grâce à l'utilisation de plusieurs stratégies, les effets bénéfiques de la restitution d'un métabolisme oxydatif contre le développement et la progression de l'HTP ont pu être montrés : (1) premièrement, au travers de l'utilisation de la dichloroacétate (DCA), un inhibiteur de la pyruvate déshydrogénase kinase mitochondriale (PDK) (Michelakis *et al.* 2002; Guignabert *et al.* 2009). La PDK inhibe le pyruvate dehydrogenase (PDH) qui est l'enzyme responsable de l'oxydation du pyruvate en acétyl-CoA, qui initie la phosphorylation oxydative par le cycle de Krebs ; (2) deuxièmement, par inhibition de l'oxydation aérobie des acides gras (effet « Randle »), qui est connu pour inhiber la phosphorylation oxydative par le cycle de Krebs. La prévention de ce shift métabolique semble être prometteuse pour prévenir le développement de la maladie mais requiert plus de travaux avant de pouvoir être testé chez l'Homme.

3.6. Aspects Génétiques et Environnementaux

3.6.1 Le Gène *BMPR2*

3.6.1.1 Fonction cellulaire et la voie de signalisation *BMPR-II*

Les ligands du récepteur *BMPR-II*, les BMP (*bone morphogenetic proteins*), sont des cytokines dont le rôle est de réguler la croissance, la différenciation et l'apoptose de divers types cellulaires, dont les CE et les CML. Les BMP ont également un rôle dans la différenciation cellulaire lors de l'embryogénèse, et dans le maintien et la réparation des tissus adultes. Un ligand BMP se lie à deux récepteurs de type 1 (ACVRL-I, ACVR-I, *BMPR-IA*, and *BMPR-IB*), entraînant leur hétéro-polymérisation avec deux récepteurs de type 2 (*BMPR-II*, ActR-IIA, and ActR-IIB). Ce complexe est stabilisé par une protéine accessoire endogène. Suite à cette hétéro-polymérisation, les récepteurs *BMPR-II* phosphorylent les récepteurs de type I, entraînant la phosphorylation de protéines cytoplasmiques appelées Smads (Smad1, Smad5, Smad8). Ces protéines Smad 1/5/8 s'associent alors à une protéine Smad4, et ce nouveau complexe est transloqué dans le noyau et module l'expression de gènes cibles.

Le récepteur *BMPR-II* est exprimé dans les CE pulmonaires et les macrophages, et dans une moindre mesure dans les CML et les fibroblastes. Il a été montré que l'expression pulmonaire de ce récepteur était diminuée chez les patients présentant une HTAP héréditaire ainsi que chez ceux présentant une HTAP idiopathique par rapport à des sujets sains (Atkinson *et al.* 2002). Plusieurs groupes se sont ainsi intéressés à l'implication du gène *BMPR2* et de ses mutations sur la dysfonction cellulaire observée dans l'HTAPi et l'HTAPh. Il a été observé que les CML HTAP, ayant ou non une mutation du gène *BMPR2* ont une diminution de leur capacité à activer la voie des Smads 1/5 (Yang *et al.* 2005). Ceci a pour conséquence une réduction de la capacité à inhiber la prolifération des CML, expliquant les lésions observées dans les artères pulmonaires des patients HTAPi ou HTAPh. De plus il a été montré qu'en réponse aux facteurs de croissance, les CE HTAPi proliféraient et migraient de manière plus importante que les CE de sujets contrôles (Masri *et al.* 2007). Enfin, les BMP protégeraient les CE de l'apoptose (Teichert-Kuliszewska *et al.* 2006). En effet, il a été observé que les CE pulmonaires des souris déficientes en gène *Bmpr2*, étaient plus sensibles à l'apoptose. L'hypothèse émise est que le taux élevé d'apoptose dans l'endothélium

favoriserait le développement de CE résistantes à l'apoptose, formant par la suite les lésions plexiformes caractéristiques de l'HTAP.

Les modèles animaux ont pu confirmer l'implication des mutations du gène *BMPR-2* dans le développement de l'HTAP. En effet, West et al. (West *et al.* 2004) ont démontré le développement d'une HTP chez les souris ayant une mutation du gène *Bmpr2* dans leurs CML. En effet, ces souris présentaient une augmentation de la PAPm, un remodelage vasculaire et une hypertrophie ventriculaire droite. Plus récemment, Hong *et al.* (Hong *et al.* 2008) ont montré que les souris ayant une délétion du gène *Bmpr2* dans leurs CE, présentaient des lésions artérielles pulmonaires distales compatibles avec une HTAP. Néanmoins, aucun de ces modèles ne reproduit des formes d'HTAP sévères caractérisant les formes héritables de la maladie chez l'Homme.

3.6.1.2 Les mutations *BMPR2* dans l'HTAP

Une origine génétique de l'HTAP a été suspectée en 1954 lorsque Dresdale a décrit la première forme familiale de la maladie (Dresdale *et al.* 1954). Au cours des 50 années qui suivirent, de plus en plus de familles ont été décrites, et en 2006 dans le registre Français de l'HTAP, les HTAP évoluant dans un contexte familial représentaient 3.9% de l'ensemble des HTAP du groupe 1 (Humbert *et al.* 2006). L'étude des familles a permis de comprendre le mode de transmission des HTAPh, et ainsi en 1995 il était reconnu que l'HTAP se transmettait sur un mode autosomique dominant avec une pénétrance incomplète (seuls 20% des sujets porteurs d'une mutation développeront la maladie). Il est également suspecté un phénomène d'anticipation génétique, caractérisé par des âges de survenue de la maladie significativement moins élevés au fil des générations (Loyd *et al.* 1995). Cependant, aucune explication biomoléculaire n'explique celle observée dans l'HTAP à ce jour.

Les recherches du locus en cause dans l'HTAP ont été entreprises. En 1997, l'analyse des marqueurs microsatellites et les analyses de liaison génétique au sein des familles affectées par la maladie, ont permis aux équipes de Nichols et de Morse de localiser sur le bras long du chromosome 2, la région en cause dans l'HTAP (Morse and Barst 1997; Nichols *et al.* 1997). L'analyse des gènes candidats a permis aux équipes de Lane et Deng d'identifier

chez les sujets atteints de la maladie, des mutations germinales présentes à l'état hétérozygote sur le gène *BMPR2* (Deng *et al.* 2000; Lane *et al.* 2000).

A l'heure actuelle, une mutation du gène *BMPR2* est retrouvée chez 58 à 74% des patients ayant une histoire familiale d'HTAP et 3,5 à 40% des patients ayant une HTAP considérée comme idiopathique (Cogan *et al.* 2006; Sztrymf *et al.* 2008; Machado, *et al.* 2009; Girerd *et al.* 2010). Des mutations du gène *BMPR2* ont été décrites dans l'ensemble des exons, exception faite de l'exon 13. Les mutations retrouvées sont des mutations ponctuelles des exons ou des sites donneurs et accepteurs d'épissage (non-sens et faux-sens), des grands réarrangements et des mutations du promoteur. Elles sont présentes seulement à l'état hétérozygote, et les souris KO pour le gène *BMPR2* ne sont pas viables et meurent avant la gastrulation (Beppu *et al.* 2000).

Deux études publiées par Rudarakanchana et Nishihara en 2002 (Nishihara *et al.* 2002; Rudarakanchana *et al.* 2002) montrent que les mutations du gène *BMPR2* interrompent la voie de signalisation des BMP/Smad de manière hétérogène. En effet, ces auteurs montrent qu'une substitution d'un résidu cystéine du domaine de fixation du ligand ou du domaine kinase diminue l'export du récepteur à la membrane cellulaire. Dans ce cas-là, le phénotype malade est dû à une haplo-insuffisance. En revanche les gènes possédant des mutations ne touchant pas un résidu cystéine du domaine kinase, permettent la création d'une protéine capable d'atteindre la surface cellulaire mais ayant perdu la capacité de phosphoryler les récepteurs de type 1. Dans ce cas là, le phénotype malade est dû à un effet dominant négatif du récepteur muté sur le récepteur sauvage. De plus, les protéines codées par un gène *BMPR2* ayant une mutation faux-sens de la région codant pour la queue cytoplasmique, sont capables d'atteindre la surface cellulaire mais sont déficientes pour activer la voie des Smads (Yu *et al.* 2005). La pénétrance des mutations du gène *BMPR2* est la fréquence d'apparition d'une HTAP chez les personnes porteuses d'une mutation de ce gène. Il est estimé que seuls 20% des porteurs de mutation du gène *BMPR2* développent la maladie au cours de leur vie (Machado *et al.* 2006). De plus, il a été montré par immunomarquage que les CE des vaisseaux pulmonaires des sujets sains exprimaient le récepteur BMPR-II. En revanche, l'expression de ce récepteur est diminuée chez les patients atteints d'HTAPh, et dans une moindre mesure chez ceux atteints d'HTAPi (Atkinson *et al.* 2002). Ces observations plaident en faveur du rôle joué par le récepteur BMPR-II dans le

développement de la maladie, mais, même si une diminution de l'expression du récepteur BMPR-II est nécessaire, elle ne semble pas suffisante au développement d'une HTAP. D'autres facteurs, pouvant être génétiques ou environnementaux, contribueraient au développement de la maladie.

3.6.2. Les autres gènes impliqués dans l'HTAP

3.6.2.1 Les gènes *ACVRL1* et *ENG*

La maladie de Rendu-Osler (ou HHT pour *hereditary haemorrhagic telangiectasia*) est une dysplasie vasculaire caractérisée par des épistaxis, des télangiectasies et des malformations artério-veineuses en particulier pulmonaires, hépatiques ou cérébrales, des accidents vasculaires cérébraux et des abcès cérébraux. Les malformations artério-veineuses pulmonaires peuvent créer des shunts droit-gauches, provoquant une hypoxie, des embolies paradoxales, des accidents vasculaires cérébraux et des abcès cérébraux. Les patients atteints de la maladie de Rendu-Osler peuvent développer une HTP post-capillaire, en raison d'un état hyperkinétique aboutissant à une insuffisance cardiaque gauche. Cependant, l'HHT peut aussi être associée à des HTAP pré-capillaires qui sont histologiquement indiscernables des HTAPi. La maladie de Rendu-Osler est une maladie à transmission autosomique dominante, avec une pénétrance quasi complète à l'âge de 60 ans (97%). Plusieurs gènes ont été impliqués dans le développement de la maladie de Rendu-Osler, dont le gène *ACVRL1* (ou *ALK1*) localisé sur le chromosome 12, *ENG* localisé sur le chromosome 9, *MADH4* (ou *SMAD4* : *Mothers against decapentaplegic homologue 4*, dont les mutations prédisposent aussi pour la polypose juvénile), et deux nouveaux *loci* (HHT3 et HHT4) ont été identifiés sur les chromosomes 5 et 7 respectivement. Récemment, l'association d'une HTAP et d'une maladie de Rendu-Osler a permis de mettre en évidence que les gènes *ACVRL1* et *ENG* appartenant à la famille des récepteurs du TGF- β au même titre que le gène *BMPR2*, pouvaient être impliqués dans le développement de l'HTAP. Le gène *ACVRL1* code pour un récepteur de type I, tandis que le gène *ENG* code pour une protéine accessoire stabilisant la fixation du ligand sur les récepteurs. Les mutations de ces deux gènes sont toutefois peu fréquentes dans le cadre de l'HTAP alors qu'elles sont prédominantes dans la maladie de Rendu-Osler (Trembath *et al.* 2001; Abdalla *et al.* 2004; Chaouat *et al.* 2004; Girerd *et al.* 2010).

3.6.2.2 Le gène *Smad9*

Le gène *Smad9* code pour la protéine Smad8 qui est une receptor regulated Smads (R-Smad), protéine régulée par les récepteurs de la famille du TGF- β . Tout comme Smad1 et Smad5, la protéine Smad8 est phosphorylée par un récepteur de type I. Une fois phosphorylée, Smad8 s'associe avec la co-Smad, Smad4 et ce complexe est transloqué dans le noyau où il régule la transcription de gènes cibles. Shintani et al. (Shintani *et al.* 2009) ont décrit pour la première fois la présence d'une mutation non-sens du gène *Smad9* chez un patient atteint d'une HTAPi diagnostiquée à l'âge de 8 ans. De plus, un contexte familial peut être suspecté. En effet, deux de ses frères et sœurs seraient décédés d'une maladie pulmonaire à l'âge de 2 et 13 ans. Il est notable que le père du patient décrit par Shintani et al., bien que porteur de la mutation familiale du gène *Smad9*, était asymptomatique lors de l'étude, laissant supposer une pénétrance incomplète des mutations du gène *Smad9*. Des mutations de ce gène n'avaient jamais été reportées dans l'HTAP ou dans d'autres pathologies. Enfin, Huang et al. (Huang *et al.* 2009) ont souligné le rôle possible des mutations du gène *Smad9* dans le développement de l'HTAP, en démontrant que les souris porteuses d'une mutation du gène *Smad9* présentaient un remodelage vasculaire avec un épaissement de la média des artères pulmonaire distales.

Des mutations et des polymorphismes ont également été identifiés pour d'autres gènes impliqués dans le développement de l'HTAP, comme les récepteurs (5-HT_{2B}), le transporteur de la sérotonine (5HTT) (Blanpain *et al.* 2003; Eddahibi *et al.* 2003), l'enzyme de conversion pour l'angiotensine (ACE) (Abraham *et al.* 2003) ou encore le canal potassique Kv1.5 (Remillard *et al.* 2007). Plus récemment, des études ont décrits des mutations de Caveolin-1 (Austin *et al.* 2012). De manière intéressante, une étude a même décrit un remaniement chromosomique au niveau des cellules vasculaires (Aldred *et al.* 2010).

3.6.3 Les facteurs environnementaux

Nous avons vu que des gènes sont associés au développement de l'HTAP mais ils ne semblent pas suffisants au développement d'une HTAP. D'autres facteurs, pouvant être ou environnementaux, contribueraient comme un « second hit » au développement de la maladie.

Il est maintenant reconnu que l'exposition à la dexfenfluramine est un facteur de risque d'HTAP. De manière intéressante, l'exposition à ces anorexigènes est plus courte chez les patients ayant une mutation du gène *BMPR2* par rapport aux sujets chez lesquels aucune mutation n'a été identifiée. Cette observation pourrait indiquer que les sujets porteurs d'une mutation du gène *BMPR2* ont un risque plus important de développer une HTAP suite à la prise d'anorexigènes (Humbert *et al.* 2002).

Plusieurs études sont en faveur de l'implication de facteurs génétiques additionnels dans le développement de l'HTAPi et HTAPh. Hamid *et al.* ont montré une diminution de l'expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR2* chez les patients affectés par la maladie et porteurs d'une mutation du gène *BMPR2*, par rapport aux personnes non atteintes mais porteuses d'une mutation *BMPR2* (Hamid *et al.* 2009). Ainsi, une faible expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR2* serait associée au développement clinique de la maladie. Un mécanisme post-transcriptionnel par micro-RNA (miRNA), ARN simple brin se fixant spécifiquement à un ARN messager (ARNm) pour guider sa dégradation, a été suspecté pour être impliqué dans la diminution de l'expression de l'allèle sauvage du gène *BMPR2*. De la même manière, Brock *et al.* (Brock *et al.* 2009) ont montré l'implication des miR-17/92 dans la reconnaissance et la dégradation des ARNm du gène *BMPR2*, et ont montré que ces miR-17/92 étaient régulés par l'IL-6, cytokine incriminée dans le développement de l'HTAP.

Le métabolisme des oestrogènes, puissant mitogène des CML, a également été incriminé dans le développement de la maladie. En effet, l'enzyme cytochrome P450 1B1 (*CYP1B1*), qui est exprimée dans les poumons, particulièrement par les CE, et dont la diminution entraîne une augmentation de la concentration des oestrogènes, est diminuée chez les patientes atteintes d'HTAP porteuses de mutation du gène *BMPR2*, alors que son taux est normal chez les femmes non atteintes porteuses d'une mutation *BMPR2*. Austin *et al.* (Austin *et al.* 2009) ont démontré une pénétrance 4 fois supérieure des mutations du gène *BMPR2* chez les personnes porteuses à l'état homozygote du polymorphisme Asn453Ser du gène *CYP1B1*.

D'autres facteurs environnementaux semblent également être impliqués dans la survenue et le développement de l'HTAP. Des études épidémiologiques ont permis de mettre en évidence l'implication de la consommation de certains anorexigènes dans le

risque de développer une HTAP. L'aminorex et plus récemment la fenfluramine/dexfenfluramine, (Abenhaim *et al.* 1996), le Benflorex ou le Dasatinib (Savale *et al.* 2012 ; Montani *et al.* 2012) ont été incriminés. Les facteurs de susceptibilité individuelle jouent aussi un rôle important, lié entre autres à la vitesse de métabolisation du dérivé (Higenbottam *et al.* 1999). En effet, le risque absolu dans la population générale est relativement faible. La proportion d'individus développant une HTAP parmi tous les individus ayant consommé de la fenfluramine ou ses dérivés est estimé à 1/10 000 pour une consommation de 12 mois (Abenhaim *et al.* 1996). Cette proportion est probablement encore plus faible pour les patients ayant eu une exposition plus courte.

4. Modèles animaux d'étude l'HTAP

Un modèle animal a été défini par l'« *American National Research Council Committee on Animal Models for Research and Aging* » comme étant un modèle permettant l'étude de données de référence sur la biologie ou le comportement, ou chez lequel on peut étudier un processus pathologique spontané ou induit, celui-ci ayant un ou plusieurs aspects communs avec un phénomène équivalent chez l'humain. Leur utilisation en recherche biomédicale est essentielle non seulement pour l'étude et la compréhension de la physiopathologie de maladie, mais également pour l'évaluation de la tolérance et de l'efficacité des traitements. Cependant leur utilisation doit être effectuée avec prudence puisqu'il ne s'agit que de modèles qui ne reflètent que partiellement les lésions et anomalies humaines et car les différences inter-espèces limitent très souvent les données ainsi obtenues.

Un bon modèle animal d'étude de l'HTAP devrait réunir idéalement un ensemble de caractéristiques comprenant entre autres :

- une évolution progressive/chronique et sévère ;
- des atteintes structurelles et fonctionnelles des artérioles pulmonaires résistives (<500 m) avec un remodelage intense associé à une hypertrophie médiale, des nécroses fibrinolytiques, des micro-thromboses et des lésions de type plexiforme ;
- une inflammation chronique avec des infiltrations péri-vasculaires ;

- des anomalies biologiques du même ordre que chez l'Homme : diminution des voies de signalisation du NO, de la prostacycline, du BMPR-II, et augmentation de la production d'ET-1, de facteurs de croissance clés comme PDGF, FGF-2, EGF, 5-HT;

- Une réponse similaire aux traitements.

Plusieurs modèles animaux de la maladie ont été développés et ont permis d'importants progrès aussi bien dans la compréhension de la physiopathologie de l'HTAP que dans la maîtrise et le développement de différentes molécules (Stenmark *et al.* 2009). Cependant, ces modèles animaux restent largement imparfaits et actuellement des efforts importants sont entrepris pour développer de nouveaux modèles encore plus proches de la maladie. En attendant et pour pallier le manque de modèle animal idéal pour l'HTAP, la plupart des équipes de recherche associe plusieurs modèles animaux différents dans leur études pour valider leurs observations.

4.1. Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (MCT) chez le rat

La mise en place de ce modèle consiste en l'administration unique sous-cutanée de monocrotaline à la dose de 60mg/kg chez le rat avec un suivi sur 3 à 4 semaines. La monocrotaline est un alcaloïde de la famille de la pyrrolizidine qui se trouve dans les tiges, feuilles et graines de *Crotalaria spectabilis*, une plante à floraison annuelle distribuée dans les régions tropicales et sous-tropicales, et introduite aux Etats-Unis en 1924 (Kay *et al.* 1969).

Le modèle d'HTP induite par la monocrotaline est un des modèles classiques d'étude de la maladie car l'HTP expérimentale induite ressemble à la forme humaine de par sa gravité hémodynamique et histopathologie, et de par sa mortalité naturelle particulièrement élevée. Cependant, cette HTP expérimentale diffère de l'HTAP par sa forte composante inflammatoire, la présence d'anomalies multi-organes avec une toxicité hépatique majeure, une perte précoce de la barrière endothéliale, une évolution très rapide sur quelques semaines et l'absence de lésions plexiformes. Une augmentation significative des PAPm est constatée dès la deuxième semaine suivant l'administration de cette drogue qui s'aggrave très rapidement (chez des rats de 100-150g : 30 à 50mmHg à la 3ème/4ème semaine contre

16-18mmHg chez des rats contrôle). Une importante hypertrophie ventriculaire droite, avec doublement de l'indice de Fulton, est constatée. Dès la fin de la 3^{ème}/4^{ème} semaine suivant l'injection de monocrotaline, une importante mortalité est souvent notée. D'importantes variations existent en fonction du lot et de l'âge des animaux utilisés, sachant que des animaux jeunes développent des HTP plus sévères que des animaux plus âgés. Le(s) mécanisme(s) précis de la mise en place de cette HTP expérimentale reste encore très obscur(s) (Gomez-Arroyo *et al.* 2012). Il serait admis que la monocrotaline est tout d'abord métabolisée dans le foie par les cytochromes P450 en monocrotaline pyrrole (MCTP), qui serait le métabolite actif responsable des lésions vasculaires pulmonaires et du développement de l'HTP expérimentale. Le fait que les souris ne peuvent convertir la monocrotaline en MCTP expliquerait pourquoi l'administration de monocrotaline chez la souris ne conduit pas au développement de la maladie comme chez le rat. Les métabolites actifs de la monocrotaline seraient donc ensuite à l'origine d'atteintes et/ou nécroses endothéliales accompagnées d'un œdème pulmonaire visible les deux premières semaines après l'injection. La résolution de cet œdème en présence d'une forte inflammation péri-vasculaire participerait au remodelage progressif des artérioles pulmonaires et à l'installation d'une défaillance cardiaque droite. Cependant, de grandes pièces de ce puzzle restent encore mystérieuses. Plusieurs anomalies biologiques similaires à l'HTAP humaine ont été décrites et comprennent entre autres des altérations de la voie du NO, de l'ET-1, de la 5-HT, du PDGF, du FGF-2. De plus, une diminution de l'activité de la voie du BMPR-II a été décrite. Au niveau des média des artérioles pulmonaires, des diminutions d'expression des canaux potassiques Kv1.5 et une surexpression du 5-HTT sont constatées. Une forte surexpression de plusieurs cytokines inflammatoires clefs ont été aussi notées : IL-1 β , IL-6, MCP-1. Cependant, plusieurs différences avec la physiopathologie de l'HTAP humaine sont également constatées. L'HTP induite à la monocrotaline peut être prévenue et/ou améliorée par une large gamme de traitements, incluant les corticoïdes (Langleben and Reid 1985), les analogues de la prostacycline (Schermuly *et al.* 2005), l'inhalation continue de NO (Roberts *et al.* 2000), les inhibiteurs de la PDE-5 (Ghofrani *et al.* 2004), les antagonistes non sélectifs ou sélectifs pour le récepteur ET-A à l'ET-1 (Jasmin *et al.* 2001), les inhibiteurs du 5-HTT (Guignabert *et al.* 2005), les antagonistes du PDGF (Schermuly *et al.* 2005) de l'EGF (Dahal *et al.* 2010) et les cellules souches, plus particulièrement celles qui sur-expriment la NOS (Zhao *et al.* 2005). Cependant, les agonistes du récepteur ET-B aggravent l'HTP due à la

monocrotaline (Nishida *et al.* 2004). Enfin, la sur-expression d'Ang-I protège de l'HTP due à la monocrotaline, alors qu'elle participe à l'HTAP (Sullivan *et al.* 2003; Dewachter *et al.* 2006). Cet effet protecteur de l'angiopoïétine-1 serait attribuable à ses propriétés anti-apoptotiques (Rudge *et al.* 2003).

Ce modèle animal d'HTP reste un modèle très utilisé bien que très imparfait de par ses différences avec l'HTAP humaine et de par sa grande variabilité. Les lots de monocrotaline, l'âge/poids des animaux/conditions d'élevage sont d'importants facteurs perturbant fortement la sévérité du modèle. De nombreux autres modèles ont été développés sur la base de ce modèle et inclus :

- monocrotaline + pneumonectomie : modèle plus sévère avec une forte inflammation. Des lésions plexiformes ont été décrites dans ce modèle
- monocrotaline + pneumonectomie chez le jeune rat : modèle encore plus sévère

4.2. Hypertension pulmonaire hypoxique chez les rongeurs (rats/souris)

Ce modèle consiste en l'exposition à l'hypoxie (10% FiO₂) normobare ou hypobare de manière chronique (3 semaines au minimum). Il s'agit d'un modèle particulier d'HTP expérimentale puisqu'il est réversible en quelques semaines (3 à 4 semaines) lors de la remise des animaux dans un environnement normoxique. Ce modèle est plus ou moins sévère en fonction des espèces animales utilisées et nécessite un équipement particulier.

L'exposition à l'hypoxie induit une vasoconstriction pulmonaire initiale qui serait sur le long terme responsable de l'hyperplasie du muscle lisse et du remodelage vasculaire pulmonaire. De fortes différences inter-espèces sont constatées : on retrouve parmi les hypo-répondeurs la chèvre, le lapin, le chien et le cobaye, parmi les répondeurs modérés le rat et parmi les hyper-répondeur le veau et le cochon (Naeije and Dewachter 2007).

Une augmentation significative de la PAPm est constatée dès la 2^{ème} semaine suite à l'exposition à cette hypoxie et qui évolue de manière modérée au fil du temps (30mmHg à la 3^{ème}/4^{ème} semaine chez la souris; contre 18-21mmHg chez des souris contrôles). Une hypertrophie ventriculaire droite est retrouvée lors des mesures de l'indice de Fulton.

Aucune mortalité n'est constatée et la reproductibilité de ce modèle est très satisfaisante. Cependant, les animaux en croissance sont plus sensibles que les animaux adultes.

Le remodelage artériel pulmonaire fait rapidement suite à la constriction hypoxique initiale avec très certainement un rôle important joué par l'inflammation. Cependant, ce remodelage constaté est souvent très limité à une hypertrophie médiale et adventitielle. Contrairement au modèle induit à la monocrotaline, l'inflammation est très légère et aucune micro-thrombose ou lésion plexiforme n'a été reportée. Plusieurs anomalies biologiques similaires à l'HTAP humaine ont été notées dans ce modèle. Des altérations de la voie du NO, de la prostacycline, de l'ET-1 et du PDGF ont été décrites. On retrouve également des atteintes de la voie de signalisation du BMPR-II. L'HTP hypoxique peut être prévenue et partiellement reversée par l'administration de NO (Kouyoumdjian *et al.* 1994), d'activateurs du GMP cyclique (Dumitrascu *et al.* 2006) ou d'inhibiteurs de PDE-5 (Zhao *et al.* 2003), d'analogues de la prostacycline (Geraci *et al.* 1999) d'inhibiteurs du 5-HTT (Marcos *et al.* 2003) d'antagonistes sélectifs ou non sélectifs de l'ET-1 et d'imatinib, (Schermuly *et al.* 2005). L'inhibition des MMP aggrave l'HTP hypoxique (Vieillard-Baron *et al.* 2000). Ce modèle animal d'HTP reste un modèle également très utilisé (essentiellement pour l'utilisation de souris transgéniques) bien que très imparfait de par ses différences avec l'HTAP humaine et de par sa réversibilité. Tout comme pour le modèle monocrotaline, ce modèle comporte des atteintes multi-organes aux rôles méconnus. D'autres modèles ont été développés sur la base de ce modèle et inclus le modèle Sugén (inhibiteur du VEGF récepteur) + Hypoxie (SuHx): modèle très sévère avec une forte inflammation qui ne reverse pas et qui présente des lésions plus sévères et proches de celles observées chez l'homme (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001).

4.3. Modèle d'HTP induite par le SUGEN 5416 + Hypoxie (SuHx)

Ce modèle consiste en l'administration unique de 20 mg/kg de SU 5416 (un antagoniste du VEGF récepteur) avant une exposition à l'hypoxie (10% FiO₂) de manière chronique (2 à 3 semaines), suivi d'un retour en normoxie (3 à 4 semaines au minimum) (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2001). Il s'agit d'un modèle sévère d'HTP expérimentale qui démontre un remodelage intense des artères pulmonaires. Encore très peu de données sont

disponibles concernant ce modèle et sa physiopathologie reste très obscure. Des lésions très sévères avec un remodelage intense touchant aussi bien la media que l'adventice et l'intima sont clairement visibles. Une forte hypertrophie cardiaque est aussi constatée. Cependant, le manque de reproductibilité, l'atteinte de plusieurs organes et une mortalité quasi absente sont parmi les principaux points faibles de ce modèle expérimental.

4.4. Modèles animaux d'hypertension pulmonaire sur shunt

L'HTP sur cardiopathie à shunt est le plus souvent réalisée chez le gros animal : porc, agneau et veau, bien que quelques travaux ont été reportés chez le rat (Stenmark *et al.* 2009). Les HTP expérimentales sur shunt se limitent à une hypertrophie médiale, avec peu ou pas de modifications intimaux ou adventitielles. Ceci serait lié à des durées d'observation limitées à 2 à 4 mois, imposées par la croissance rapide d'animaux de grande taille, tels que le porcelet ou l'agneau, difficile à gérer dans la plupart des animaleries.

Une anastomose aorto-pulmonaire synthétique chez le porcelet reproduit en 3 mois d'évolution une HTP sévère, avec hypertrophie médiale. Cette HTP expérimentale est clairement liée à l'hyper débit. Comme le diamètre du shunt possiblement réalisable est limité, une anastomose entre l'artère innominée sur le tronc commun des artères pulmonaires ou une ligature d'une des artères pulmonaires peut être également effectuée (modification du shunt de Blalock et Taussig). L'ajout du shunt qui va grandir avec l'animal, expose la circulation pulmonaire à des agressions mécaniques croissantes qui permettent d'obtenir des HTP modérées à grave en 3 à 4 mois (30 à 40 mmHg). Quelques travaux ont reporté la présence de lésions complexes proches de lésions plexiformes dans ces modèles. Cependant ces modèles dits d'hyper-débit ne sont généralement pas très inflammatoires et sont des hypertensions pulmonaires réversibles.

4.5 Animaux transgéniques et hypertension pulmonaire

Plusieurs travaux ont reporté des HTP spontanées chez des animaux génétiquement modifiés. Les rats «*fawn-hooded*» qui présentent un désordre hérité dans le stockage de la 5-HT dans les plaquettes développent lentement une HTP. Le développement de l'HTP peut

être accéléré par une exposition à l'hypoxie/altitude. De même, les rats transgéniques sur-exprimant l'angiotensine-1 développent une hypertrophie intimale et une HTP (Chu *et al.* 2004). A l'inverse, le transfert génique d'un antagoniste du récepteur Tie-2 chez le rat prévient l'HTP induite par monocrotaline ou par sur-expression de l'angiotensine-1, mais ne prévient pas l'HTP hypoxique (Kido *et al.* 2005). Des souris sur-exprimant le 5-HTT, le facteur S100A4/mts1, l'IL-6 ou des souris déficientes en PPAR γ , le facteur vasoactif intestinal (VIP), endogline, et ALK1 développent spontanément une HTP en conditions normoxiques (MacLean *et al.* 2004; Said *et al.* 2007; Jerkic *et al.* 2011). Plusieurs autres types de souris transgéniques ont été reportés comme soit plus sensibles soit plus résistantes au développement de l'HTP expérimentale induite par exemple à l'hypoxie chronique : souris déficientes en *Bmpr2*, en TPH1, en PKC-epsilon, prostacycline, eNOS, smad8, uPA, MCP1 (Stenmark *et al.* 2009). De manière surprenante, les souris transgéniques pour le *Bmpr2* ne développent pas d'HTP de manière spontanée. Cependant, ces souris déficientes en *Bmpr2* sont plus susceptibles à développer une HTP lorsqu'elles sont soumises à une deuxième « challenge/hit », comme une administration de 5-HT ou de l'hypoxie chronique (Long *et al.* 2006).

Les observations effectuées au travers de ces animaux transgéniques sont informatives puisqu'elles permettent de valider l'importance fonctionnelle d'un facteur ou d'une voie de signalisation dans la physiopathologie de l'HTAP. A quelques exceptions près (souris S100A4/mts1), aucune de ces souches de souris ne peut être considérée comme un modèle d'étude de l'HTP mais plutôt comme des outils d'étude de l'implication de certaines voies liées à la maladie, car tous les aspects de la maladie ne sont clairement pas présents dans la même souris.

C. SYSTEME IMMUNITAIRE ET AUTOIMMUNITE DANS L'HTAP

1. Système immunitaire

L'immunité peut être définie comme l'ensemble des mécanismes biologiques permettant à un organisme de reconnaître et de tolérer ce qui lui appartient en propre (le soi) et de reconnaître et de rejeter ce qui lui est étranger (le non soi) : les substances étrangères ou les agents infectieux auxquels il est exposé, mais aussi ses propres constituants altérés (comme des cellules tumorales). Le soi est défini par les protéines membranaires du complexe majeur d'histocompatibilité ou *human leucocytes antigens* (HLA). Le système immunitaire est un ensemble complexe de cellules, d'organes et de molécules.

L'organisme dispose de deux systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée, encore appelée naturelle ou naïve, correspond à une réponse constitutive d'action immédiate, non spécifique de l'agent pathogène, non adaptative. Elle repose sur une distinction globale du soi et du non-soi. Elle repose sur des mécanismes humoraux (complément, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation, etc) et cellulaires (cellules à fonction phagocytaire ou lytique, telles que les polynucléaires, les cellules tueuses naturelles, ou NK pour "*Natural Killer* », macrophages, etc). Son activation constitue la réponse inflammatoire.

L'immunité adaptative ou acquise est spécifique de l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, portent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique (encore appelé épitope). Les lymphocytes B et T sont respectivement responsables de l'immunité humorale et cellulaire. Les lymphocytes B peuvent reconnaître les épitopes dans leur forme native alors que les lymphocytes T reconnaissent les épitopes sous forme de peptides et à condition qu'ils soient présentés par des molécules du complexe HLA. La réponse adaptative est limitée dans le temps à l'éradication de l'agresseur dont elle garde la mémoire. Elle repose sur une distinction très fine du non soi parce qu'au cours de leur fabrication dans les organes lymphoïdes primaires,

la majeure partie des cellules de l'immunité adaptative reconnaissant des antigènes du soi est éliminée.

Le système lymphoïde est composé d'organes lymphoïdes centraux ou primaires, lieu de maturation des lymphocytes où ils acquièrent un récepteur propre à chaque cellule (constitution du répertoire), et d'organes lymphoïdes secondaires ou périphériques, où ont lieu les coopérations cellulaires aboutissant à une réponse immunitaire spécifique. Les lymphocytes T sont produits par le thymus alors que les lymphocytes B sont produits dans la moelle osseuse. Les organes lymphoïdes secondaires assurent aussi une partie du renouvellement des lymphocytes au cours des divisions cellulaires qui sont déclenchées par la reconnaissance de l'antigène et ont pour but d'amplifier la réponse immunitaire une fois qu'elle a été initiée.

2. Les cellules de l'immunité

Les cellules de l'immunité proviennent toutes d'un précurseur commun, la cellule souche hématopoïétique pluripotente de la moelle osseuse capable d'auto-renouvellement et de différenciation en progéniteurs. Classiquement, les progéniteurs peuvent être classés en deux familles : (1) ceux qui proviennent d'une cellule souche myéloïde et donnent naissance aux polynucléaires, aux monocytes/macrophages et aux cellules dendritiques ; (2) ceux qui proviennent d'une cellule souche lymphoïde donnant naissance aux lymphocytes T, B et NK.

2.1. Cellules de l'immunité innée

On distingue des cellules capables de capter et de détruire les éléments étrangers (implication surtout des phagocytes polynucléés comme les polynucléaires neutrophiles ou granulocytes et des phagocytes mononucléés comme les monocytes/macrophages) et des cellules capables de capter d'apprêter et de présenter l'antigène (implications surtout des cellules dendritiques mais aussi des monocytes/macrophages). Les lymphocytes NK font aussi partie de l'immunité non spécifique et tuent par lyse les cellules infectées par certains virus ou les cellules tumorales grâce à un récepteur membranaire qui détecte l'absence de

molécules HLA de classe I à la surface des cellules cibles : c'est l'effet cytotoxique direct sur les cellules anormales.

Le système du complément est un des mécanismes de défense contre les infections des plus anciens dans l'évolution. Il intervient non seulement dans la destruction des agents infectieux et dans l'élimination des complexes immuns, mais aussi dans le contrôle des réponses inflammatoires et la modulation des réponses immunes spécifiques. C'est un ensemble de protéines à synthèse hépatique sous forme circulante dans le plasma et sous forme de récepteurs membranaires présents à la surface de nombreux types cellulaires. Ce système fait partie de l'immunité innée impliquant une activation, sans reconnaissance spécifique d'une cible, qui repose sur des liaisons physico-chimiques.

2.2. Cellules de l'immunité adaptative

Il s'agit des lymphocytes T et B : les lymphocytes B sont responsables de la réponse humorale (production d'anticorps), les lymphocytes T sont responsables des réponses cellulaires (régulation ou cytotoxicité). Les lymphocytes T et les lymphocytes B ont une morphologie similaire avec un rapport nucléocytoplasmique élevé. Ils sont capables de reconnaître spécifiquement des antigènes par leurs immunorécepteurs BCR des lymphocytes B et TCR des lymphocytes T. Les lymphocytes B le font sans intermédiaire (reconnaissance de l'antigène natif). Les lymphocytes T ont besoin que les antigènes leur soient présentés par une cellule présentatrice d'antigène (reconnaissance d'un antigène apprêté). Il existe des souspopulations fonctionnelles de lymphocytes T et B définies par leur immunophénotype (ensemble de caractéristiques moléculaires membranaires) et par leur capacité à produire différentes cytokines.

2.2.1. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15% des lymphocytes circulants et sont définis par la présence d'immunoglobulines (Ig) de surface. Ces immunoglobulines, produites par la cellule elle-même, jouent le rôle de récepteur spécifique pour l'antigène (B cell receptor ou BCR). Le BCR est une immunoglobuline membranaire (IgM). A la surface de chaque lymphocyte B, on trouve environ 10^5 molécules de BCR. Toutes ces molécules sont

identiques : chaque lymphocyte B ne synthétise qu'une seule variété d'IgM. Par leur BCR, les lymphocytes B reconnaissent directement les antigènes, qu'ils soient solubles et circulants dans le milieu intérieur ou qu'ils soient particuliers (parasite, bactérie, virus ou cellule). Les lymphocytes B expriment les molécules HLA de classe I (ce sont des cellules nucléées) et les molécules HLA de classe II, ce qui en fait des cellules présentatrices d'antigènes. Après avoir rencontré l'antigène, les lymphocytes B activés forment des centres germinatifs dans lesquels ils prolifèrent et se différencient en plasmocytes à longue durée de vie, sécréteurs d'immunoglobulines de classe IgG, IgA et IgE, ou en cellules B mémoire.

2.2.2. Les lymphocytes T

Tous les lymphocytes T expriment à leur surface la molécule CD3, étroitement associée au récepteur spécifique pour l'antigène (*T cell receptor* ou TCR).

2.2.2.1. Les lymphocytes CD4⁺ et CD8⁺

On distingue deux populations principales de lymphocytes T d'après la présence de protéines membranaires spécifiques :

- les **lymphocytes T CD4⁺** qui représentent les lymphocytes *helpers* ou Th : ils reconnaissent l'antigène si celui-ci leur est présenté par une molécule HLA de classe II. Les antigènes présentés sont des antigènes exogènes qui ont été endocytés par certaines cellules : les cellules présentatrices d'antigènes. Ils ont pour rôle d'activer des cellules de la réaction immunitaire : les macrophages, les lymphocytes B mais aussi les lymphocytes T CD8⁺.

Selon l'environnement dans lequel ils se trouvent, les lymphocytes Th se différencient soit en lymphocytes Th1 soit en lymphocytes Th2 :

- les lymphocytes Th1 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation cellulaire (lymphocytes T CD8⁺)
- les lymphocytes Th2 orientent la réponse immunitaire vers l'immunité à médiation humorale (production d'anticorps)

- les **lymphocytes T CD8⁺** qui sont des lymphocytes cytotoxiques : ils reconnaissent l'antigène présenté par une molécule HLA de classe I. Les antigènes présentés sont des antigènes endogènes, produits par la cellule. La reconnaissance est le premier signal

d'activation. Un second signal permet l'expression du pouvoir cytotoxique du lymphocyte CD8⁺.

2.2.2.2. Les lymphocytes T NK (NKT)

Les lymphocytes NKT représentent un groupe hétérogène de lymphocytes T. Comme leur nom l'indique, ils possèdent des caractéristiques phénotypiques propres aux lymphocytes T (notamment un TCR et la présence de CD3) mais également aux lymphocytes NK (expression des molécules CD56 et CD16). La fréquence dans le sang des lymphocytes NKT est assez variable (0,001 à 3% des lymphocytes circulants). Ces cellules jouent un rôle important dans la régulation des réponses immunitaires et leur absence, ou dysfonction, est à l'origine de pathologies autoimmunes, inflammatoires ou tumorales.

2.2.2.3. Importance des lymphocytes T régulateurs dans l'immunité

2.2.2.3.1. Tolérance du soi et autoimmunité

La tolérance immunitaire se définit par la capacité du système immunitaire à ne pas manifester de réaction agressive vis-à-vis de certains antigènes avec lesquels il a été au préalable en contact. Une tolérance immunitaire spécifique s'exerce vis-à-vis de constituants du soi. Les mécanismes de tolérance immunitaire sont multiples et ont pour objectif de prévenir les réactions d'autoimmunité. La tolérance centrale aboutit à la délétion clonale de lymphocytes réactifs vis-à-vis d'antigènes du soi, au niveau du thymus pour les lymphocytes T, ou au niveau de la moelle osseuse pour les lymphocytes B. La tolérance périphérique repose sur plusieurs mécanismes dont, notamment, la suppression de la réponse immune par les lymphocytes T régulateurs (Wing and Sakaguchi 2010).

La rupture de cette tolérance dérègle ce système et provoque l'apparition d'autoanticorps ou de cellules (lymphocytes cytotoxiques) dirigés contre l'organisme qui les produit, favorisant ainsi le développement d'une maladie autoimmune. Il existe des facteurs génétiques prédisposant à l'autoimmunité mais cette prédisposition ne suffit pas : des facteurs extérieurs (substances médicamenteuses, micro-organismes infectieux, rayons ultraviolets ou hormones) doivent aussi intervenir dans le développement de l'autoimmunité (Chervonsky 2010).

2.2.2.3.2. Les lymphocytes T régulateurs (Treg)

Les T régulateurs naturels ont été identifiés en 1995 chez la souris (Sakaguchi *et al.* 1995) puis en 2001 chez l'homme comme une sous-population lymphocytaire T CD4+ exprimant constitutivement et fortement la chaîne alpha du récepteur à l'interleukine 2, CD25 (Wildin RS *et al.* 2001 ; Bennett *et al.* 2001). Les T régulateurs naturels expriment le facteur de transcription *Forkhead box3* (FoxP3) dont le niveau et la stabilité d'expression corrélient avec leur fonction suppressive (Chatila *et al.* 2000). Ils n'expriment pas ou peu le récepteur à l'interleukine-7, CD127 (Liu *et al.* 2006).

Les lymphocytes T régulateurs sont une sous-population de lymphocytes T (ils représentent 4 à 10% des lymphocytes T CD4+) ayant la capacité d'inhiber la prolifération d'autres lymphocytes T effecteurs. Les Treg sont donc nécessaires au maintien de la tolérance immunitaire et aident à prévenir l'activité des cellules de l'immunité, soit autoimmune, soit en fin de réaction immunitaire, et à réprimer l'induction et la progression de maladies autoimmunes (Sakaguchi *et al.* 2006): une diminution en nombre et/ou un dysfonctionnement des Treg ont été observés chez des patients atteints de lupus érythémateux disséminé, d'arthrite juvénile idiopathique, de néoplasie endocrinienne multiple de type II et de sclérose en plaques (Crispin *et al.* 2003; de Kleer *et al.* 2004; Kriegel *et al.* 2004; Vigiotta *et al.* 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

La fonction principale des Treg est de supprimer les cellules T effectrices ou d'inhiber leur prolifération à travers quatre mécanismes principaux : par production de cytokines immunosuppressives, par cytolysse, par induction de troubles métaboliques ou encore par contact cellulaire direct (Figure 4) (Sakaguchi *et al.* 2008 ; Vignali *et al.* 2008).

Il a récemment été montré qu'il existe deux différents sous-types de Treg : les Treg naturels (*natural* Treg ou nTreg) et les Treg induits (*inducible* Treg ou iTreg) (Figure 5). Même si le rôle joué par les Treg reste le contrôle de l'autoimmunité, les sous-types nTreg et iTreg diffèrent par leur origine, leurs marqueurs de surface et leur mode d'action (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009).

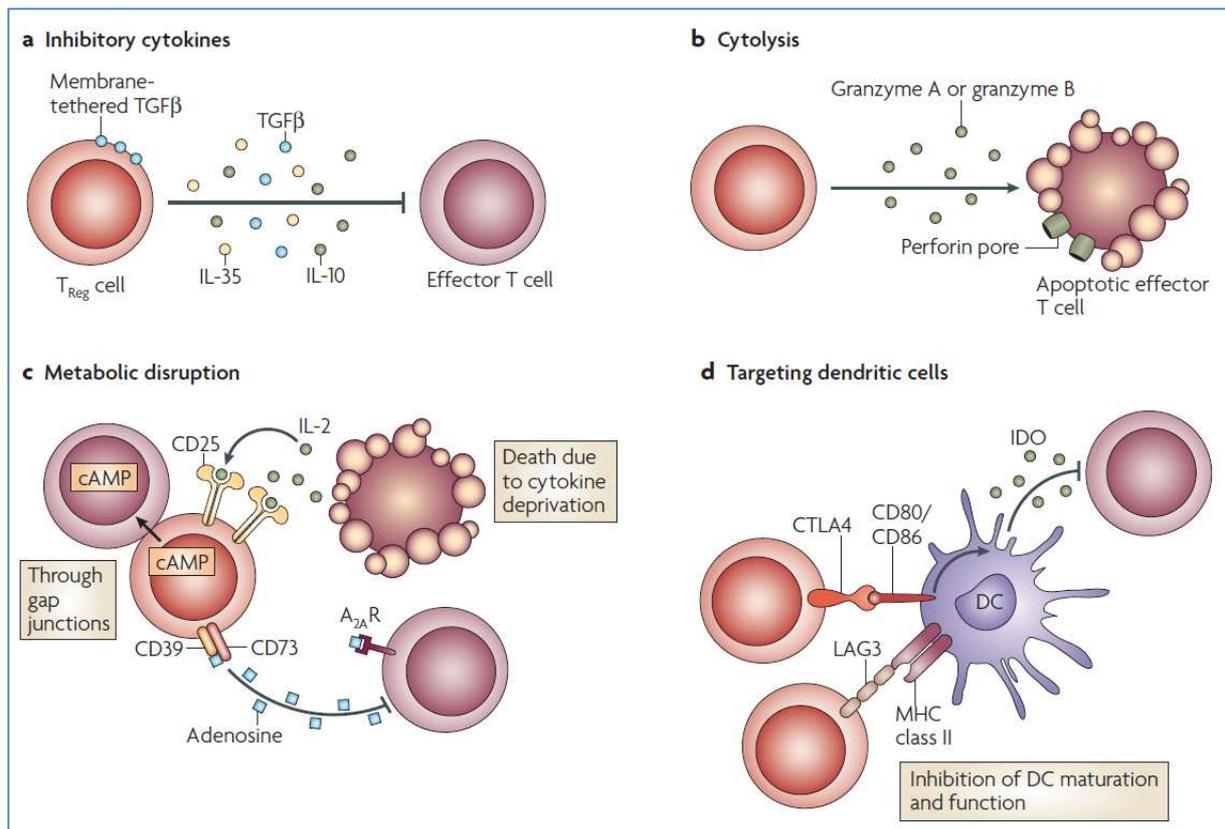


Figure 4 : Mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs (Vignali DA, et al. Nat Rev Immunol. 2008)

- **nTreg**

Chez l'homme, les T régulateurs naturels se développent dans le thymus, mais les étapes précises de leur développement sont peu connues. Les nTreg sont présents dès la naissance dans le sang veineux du cordon ombilical, ce qui montre que ces cellules se développent pendant la vie fœtale (Ng *et al.* 2001). Les nTreg jouent en effet un rôle important dans le contrôle de l'autoimmunité ainsi qu'un rôle précoce dans le maintien de la tolérance foetale et l'établissement de la tolérance foeto-maternelle.

Les nTreg expriment CD4, CD25 et FoxP3, même si l'expression de FoxP3 chez l'homme n'est pas limitée aux nTreg. En effet, les lymphocytes T activés peuvent exprimer faiblement et transitoirement FoxP3 sans avoir pour autant de fonction suppressive. Le facteur FoxP3 est important pour la fonction suppressive des nTreg : des mutations du gène de FoxP3 aboutissant à sa perte de fonction entraînent chez la souris des manifestations auto-immunes sévères (souris Scurfy), et chez l'homme le syndrome IPEX (*Immune dysregulation, Polyendocrinopathy, autoimmune Enteropathy, X-linked*) caractérisé par des atteintes

polyendocriniennes et des entéropathies sévères ainsi que des allergies alimentaires multiples, ce qui souligne le rôle prépondérant des cellules nTreg dans la régulation de l'autoimmunité (Sakaguchi *et al.* 1982; Wildin *et al.* 2002).

Les nTreg sont donc définis par le phénotype suivant : $CD4^+CD25^+CD127^{low}FoxP3^+$ (Liu *et al.* 2006).

Leur fonction suppressive implique un contact cellulaire direct, par cytolysse directe.

Il est important de souligner que l'activation des T régulateurs naturels dépend de l'environnement cytokinique et de la force du signal TCR qu'ils reçoivent. Leurs fonctions suppressives dépendent également de la force des signaux reçus par les cellules effectrices. Si le signal des molécules co-stimulatrices est fort, les cellules deviennent réfractaires à l'effet supprimeur des nTreg. Ceci suggère que les nTreg ne peuvent pas supprimer la prolifération de lymphocytes T effecteurs fortement activés ni la production de cytokines pro-inflammatoires (Sakaguchi *et al.* 2008).

- **iTreg**

Contrairement aux nTreg, les iTreg, définis plus récemment (Curotto de Lafaille and Lafaille 2009), se développent dans la périphérie à partir notamment de lymphocytes T $CD4^+$ naïfs. Ils ont pour rôle de contrôler les lymphocytes T naïfs autoréactifs ayant échappé à la sélection thymique. Ils sont également caractérisés par le phénotype $CD4^+CD25^+$ mais n'expriment pas forcément FoxP3 et leur modalité d'action ne passe pas par le contact cellulaire mais par la sécrétion de cytokines suppressives : l'IL-10 (Vieira *et al.* 2004), l'IL-35 et le TGF- β . Le TGF- β serait surtout produit et sécrété par des iTreg spécifiques du système immunitaire muqueux, appelés aussi les Th3, qui sont capables de supprimer ou de contrôler les réponses immunitaires qui pourraient se déclencher au niveau de la barrière muqueuse au contact de la flore microbienne. La perte de ces cellules est associée à des maladies auto-immunes et inflammatoires chroniques du tube digestif. Un autre mécanisme d'inhibition serait la consommation d'IL-2, ce qui limiterait la prolifération des lymphocytes effecteurs par un effet de compétition (Sakaguchi *et al.* 2009).

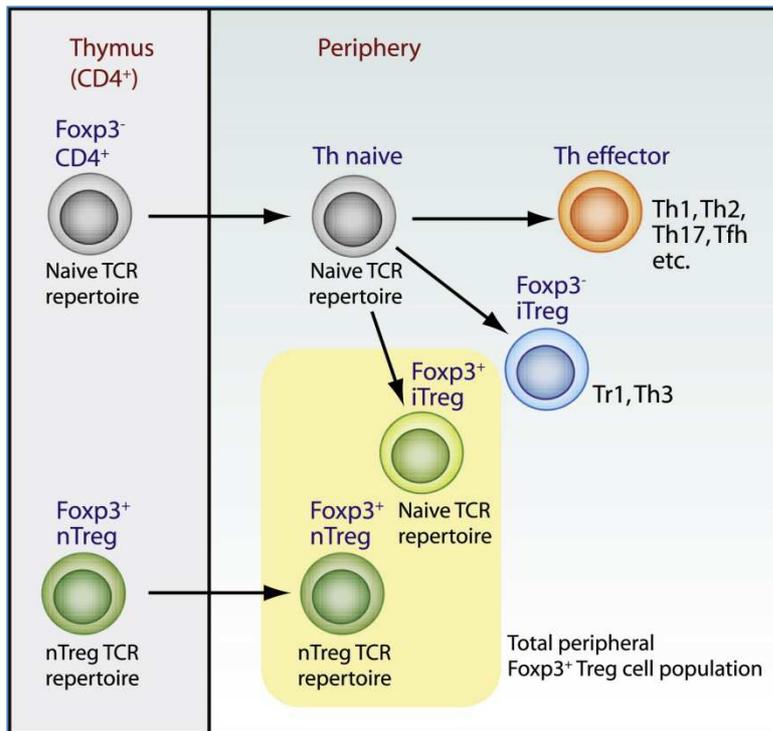


Figure 5 : Origine et différenciation des lymphocytes T régulateurs naturels, ou nTreg, et induits, ou iTreg (Curotto de Lafaille MA & Lafaille JJ. *Immunity* 2009)

3. Les molécules de l'immunité

3.1. Les molécules d'adhésion

Les cellules de l'immunité expriment en surface diverses molécules d'adhésion. Certaines sont exprimées en permanence, d'autres sont induites par l'activation de la cellule ou par l'action de cytokines. Les molécules d'adhésion cellulaire interviennent dans la migration, l'activation et les fonctions effectrices des lymphocytes. Elles appartiennent à diverses classes moléculaires : aux sélectines, aux intégrines ou à la superfamille des immunoglobulines (Ig).

Les sélectines engagent l'interaction entre le leucocyte et l'endothélium vasculaire : la fixation est le prélude à la traversée de l'endothélium pour la localisation du leucocyte dans un tissu spécifique. Elles peuvent être exprimées soit sur les leucocytes, soit sur l'endothélium vasculaire.

Les intégrines et les membres de la superfamille des Ig vont faire passer la cellule vers le tissu lymphoïde. Ces deux familles vont également jouer un rôle important dans les interactions des lymphocytes avec les cellules présentatrices d'antigènes et, plus tard, avec les cellules cibles.

3.2. Les cytokines

Les cytokines peuvent être décrites comme les hormones du système immunitaire puisqu'elles interviennent dans le dialogue entre lymphocytes, macrophages et autres cellules intervenant au cours de la réaction inflammatoire et des réponses immunitaires. Elles exercent leurs effets sur les cellules qui les ont produites (effet autocrine), sur d'autres cellules (effet paracrine) ou encore agissent à distance sur des organes ou tissus (effet endocrine). Ce sont des petites glycoprotéines, d'un poids moléculaire situé entre 10 et 50 kDalton (kDa). Il n'y a pas d'homologie dans leur structure. Elles sont toutes synthétisées *de novo*. On ne les trouve généralement pas dans les cellules au repos et elles ne sont produites qu'à la suite d'une activation. Les lymphocytes Th sont les principales cellules productrices, mais d'autres cellules en produisent également : les macrophages, les cellules présentatrices d'antigène, les fibroblastes, les cellules de l'endothélium vasculaire et les cellules épithéliales.

Impliquées dans la régulation des fonctions immunitaires, elles interviennent aussi dans l'hématopoïèse, l'hémostase, le métabolisme.

La simplification est d'autant plus difficile que les cytokines agissent " en cascade ", qu'elles sont pléiotropes et redondantes. Qui plus est, une même cytokine peut être produite par différents types cellulaires et une cellule donnée produit le plus souvent plusieurs cytokines distinctes.

Elles se fixent à des récepteurs membranaires spécifiques, plus ou moins abondants. L'expression de ces récepteurs est souvent soumise à l'action des cytokines elles-mêmes.

Les principales cytokines aujourd'hui connues sont les interleukines (IL), les interférons (IFN α , β et γ), les facteurs de croissance hématopoïétiques (les "CSF"), les facteurs de nécrose des tumeurs, TNF- α et TNF- β), le facteur de croissance des tumeurs, TGF- β , ainsi que les chimiokines.

L'IL-1, le TNF- α et IL-6 (principalement sécrétés par les macrophages) jouent un rôle majeur dans l'inflammation. L'IL-1 est aussi un cosignal d'activation des lymphocytes Th : elle stimule leur prolifération, favorise l'expression du récepteur d'IL2 (CD25) et augmente leur production de cytokines. L'IL-2 est avant tout un puissant stimulant des lymphocytes T, qui

en expriment le récepteur spécifique lorsqu'ils sont activés (CD25). Les IL-4, 5 et 6 sont principalement des activateurs des cellules B, et sont produites notamment par les cellules Th : elles favorisent la différenciation des lymphocytes B et, en contribuant au "switch" (ou "commutation isotypique"), à la synthèse d'anticorps de différentes classes.

3.3. Les chimiokines

Les chimiokines doivent leur nom à leur capacité à induire le chimiotactisme, qui se définit comme une migration cellulaire dirigée et dépendante d'un gradient de chimiokines. On en compte actuellement une cinquantaine chez l'homme (Zlotnik and Yoshie 2000). Ces molécules sont divisées en quatre sous-familles sur la base du nombre et de l'espacement de cystéines conservées au niveau de leur région N-terminale : les CXC (ou α -chimiokines), les CC (ou β -chimiokines), les C (ou γ -chimiokines) et les CX₃C (ou δ -chimiokines) représentées uniquement par la fractalkine. Ces molécules agissent sur des cellules cibles par fixation à des récepteurs, les CXCR, les CCR, les XCR et le CX₃CR, respectivement.

4. Dysfonction immunitaire et HTAP

Il est actuellement clairement établi que les réponses immunes jouent un rôle central dans la genèse et la progression de la maladie, en recrutant activement des cellules immunitaires au niveau vasculaire, en relargant différentes cytokines cruciales, en participant au remodelage vasculaire et en induisant des réponses autoimmunes. De plus, de nombreuses évidences indiquent aussi qu'il existe une réelle dysfonction immunitaire dans l'HTAP.

4.1. Dysfonction de l'immunité innée

Il est clairement établi qu'une forte augmentation de facteurs de l'inflammation, au niveau circulant et au niveau pulmonaire est présente chez les patients atteints d'HTAP. En effet, on retrouve des niveaux anormalement élevés de plusieurs cytokines et chimiokines clefs comme par exemple, l'IL-1 β , l'IL-6, le MCP-1 (CCL2), RANTES, la fractalkine, l'IL-13 et le

facteur MIF (facteur inhibiteur de la migration des macrophages) (Humbert *et al.* 1995 ; Dorfmueller *et al.* 2003 ; Price *et al.* 2012). MIF est constitutivement exprimé par plusieurs types cellulaires et de forts taux sériques et urinaires peuvent être retrouvés. Les monocytes et macrophages expriment fortement MIF qu'ils libèrent en grande quantité lors de leur exposition à différentes toxines bactériennes et cytokines. MIF agit en se liant à son récepteur protéique membranaire, le CD74, qui joue rôle clef dans plusieurs voies de signalisation cruciales pour la prolifération et la survie cellulaire. De plus, il a été récemment démontré que le CD74 modulait la synthèse endothéliale de l'IL-6, du VEGF et de MCP-1 (Veillat *et al.* 2010). Des travaux ont également montré que le blocage de MIF durant les étapes précoces de la cancérisation inhibait la prolifération des CE et réduisait la taille de la tumeur (Chesney *et al.* 1999), ce qui suggère que MIF agit comme un facteur de croissance et peut promouvoir la cancérisation et servir de cible anticancéreuse.

L'ensemble de ces observations soutient fortement l'idée d'un rôle clef de MIF dans la dysfonction endothéliale. Nous avons donc émis l'hypothèse que MIF pouvait être à l'origine ou participer à la dysfonction endothéliale dans l'HTAP, et représenter ainsi une nouvelle cible thérapeutique. Les résultats de cette étude font l'objet du 3^{ème} travail de cette thèse.

Certaines de ces anomalies sembleraient aussi corrélées avec la sévérité de quelques formes d'HTP (Soon *et al.* 2010; Montani *et al.* 2011). Il a été également démontré que ces facteurs participent directement à la pathogénèse de l'HTAP : en effet, la surexpression d'IL-6 chez des souris transgéniques est à l'origine d'un remodelage artériel pulmonaire et cause une HTP spontanée (Steiner *et al.* 2009). D'autre part, la déficience en IL-6 protège contre le développement de la maladie (Savale *et al.* 2009). Ces molécules de l'inflammation jouent un rôle prédominant dans le recrutement des cellules immunes et sont principalement sécrétées par les cellules inflammatoires mais aussi par les composants de la paroi vasculaire pulmonaire. Par exemple, l'IL-6 a de nombreux effets sur les cellules inflammatoires et vasculaires qui peuvent favoriser le remodelage vasculaire : ceux-ci comprennent l'accumulation de lymphocytes T péri-vasculaires, la stimulation de la CE pour produire des chemokines, la prolifération des CML et des CE (Imaizumi *et al.* 2004). De plus, il est probable que l'augmentation de l'expression de CX3CR1 au niveau des CML d'artère pulmonaire des patients HTAP contribue au recrutement péri-vasculaire de cellules

inflammatoires. La fractalkine peut également induire la prolifération des CML d'artères pulmonaires isolées de rats (Balabanian *et al.* 2002; Perros *et al.* 2007). Les thérapies ciblant spécifiquement les médiateurs de l'inflammation sont indéniablement d'un grand intérêt. Cependant, ils n'ont pas encore été testés chez l'homme. Au niveau du tissu pulmonaire remodelé, les lésions vasculaires sont caractérisées par des infiltrats inflammatoires transmuraux et périvasculaires, incluant la présence de lymphocytes T et B, de macrophages, de cellules dendritiques, ainsi que des cellules mastocytaires (Taraseviciene-Stewart *et al.* 2007; Hoffmann *et al.* 2011).

Il a également été montré que les cellules NK présentent un phénotype dysfonctionnel chez les patients atteints d'HTAP idiopathique et héritable. Ces mêmes cellules, ainsi que les cellules T CD8⁺ cytotoxiques et les NKT pourraient contribuer au remodelage vasculaire de l'HTAP. Dans une étude collaborative, nous avons pu montrer que les populations de lymphocytes T CD8⁺ et de NKT étaient diminuées dans la maladie veino-occlusive, alors que les NK étaient augmentés. Les cellules immunes joueraient donc un rôle physiopathologique spécifique à la forme d'HTAP (Perros *et al.* 2013).

Malgré les nombreuses évidences montrant un rôle primordial de l'inflammation dans la pathogénèse de l'HTAP, seuls quelques patients répondent aux traitements anti-inflammatoires et/ou immunosuppresseurs, surtout dans les cas d'HTAP associée à des maladies autoimmunes (Sanchez *et al.* 2006 ; Montani *et al.* 2005 ; Jaïs *et al.* 2008).

4.2. Dysfonction de l'immunité adaptative : l'autoimmunité dans l'HTAP

Plusieurs arguments sont également en faveur de l'hypothèse de désordres immunologiques, voire autoimmuns chez les patients atteints de d'HTAP : des autoanticorps circulants anti-nucléaires, anti-endothélium et anti-fibroblastes ont été retrouvés chez des patients porteurs d'HTAP (Isern *et al.* 1992; Tamby *et al.* 2005; Terrier *et al.* 2008). De plus, ces autoanticorps pourraient induire l'expression des molécules d'adhérence ou l'apoptose des CE et participer ainsi à l'émergence du phénotype résistant à l'apoptose des CE HTAP (Carvalho *et al.* 1996; Bordron *et al.* 1998). Plus récemment, il a été décrit que des IgG des

patients HTAP peuvent se lier aux CML d'artères pulmonaires et induire ainsi une contraction cellulaire (Bussone *et al.* 2012).

Des structures très particulières appelées « foyers d'inflammation chronique ou tissu lymphoïde tertiaire » ont même été récemment décrites dans les stades tardifs de la maladie par notre groupe (Perros *et al.* 2012). On retrouve également des anomalies fonctionnelles importantes des certaines cellules inflammatoires, dont les cellules T régulatrices, qui normalement protègent l'endothélium et les vaisseaux contre les agressions (Tamosiuniene *et al.* 2011; Huertas *et al.* 2012). Il a également été montré que l'inflammation pulmonaire d'origine allergique augmente la sensibilité vasculaire pulmonaire à la 5-HT, au thromboxane, à l'Ang-II et à l'ET-1 (Witzenrath *et al.* 2006; Daley *et al.* 2008; Mushaben *et al.* 2012). L'inflammation pourrait donc favoriser l'HTAP chez des sujets prédisposés, en augmentant la réactivité du lit vasculaire pulmonaire. Cependant, à ce jour, aucun outil thérapeutique ne vise réellement directement à corriger ces anomalies et des travaux supplémentaires sont donc requis.

D. COMMUNICATION ENTRE ENDOTHELIUM PULMONAIRE ET SYSTEME IMMUNITAIRE

Malgré nos connaissances sur la dysfonction endothéliale et l'altération des réponses immunes dans l'HTAP, l'interaction entre ces deux systèmes est peu connue. En particulier, la nature du lien entre endothélium pulmonaire et système immunitaire, ainsi que les mécanismes précis qui le régule, n'ont pas encore été complètement éclaircis. Au vue du phénotype anormal des CE HTAP, on peut penser qu'il y ait non seulement un recrutement excessif de cellules inflammatoires au niveau des lésions vasculaires, mais aussi une communication aberrante entre endothélium et système immunitaire dans l'HTAP. Des études suggèrent que l'endothélium peut être à la fois la cible d'un système immunitaire altéré, et également acteur actif de ce dérèglement (Figure 6).

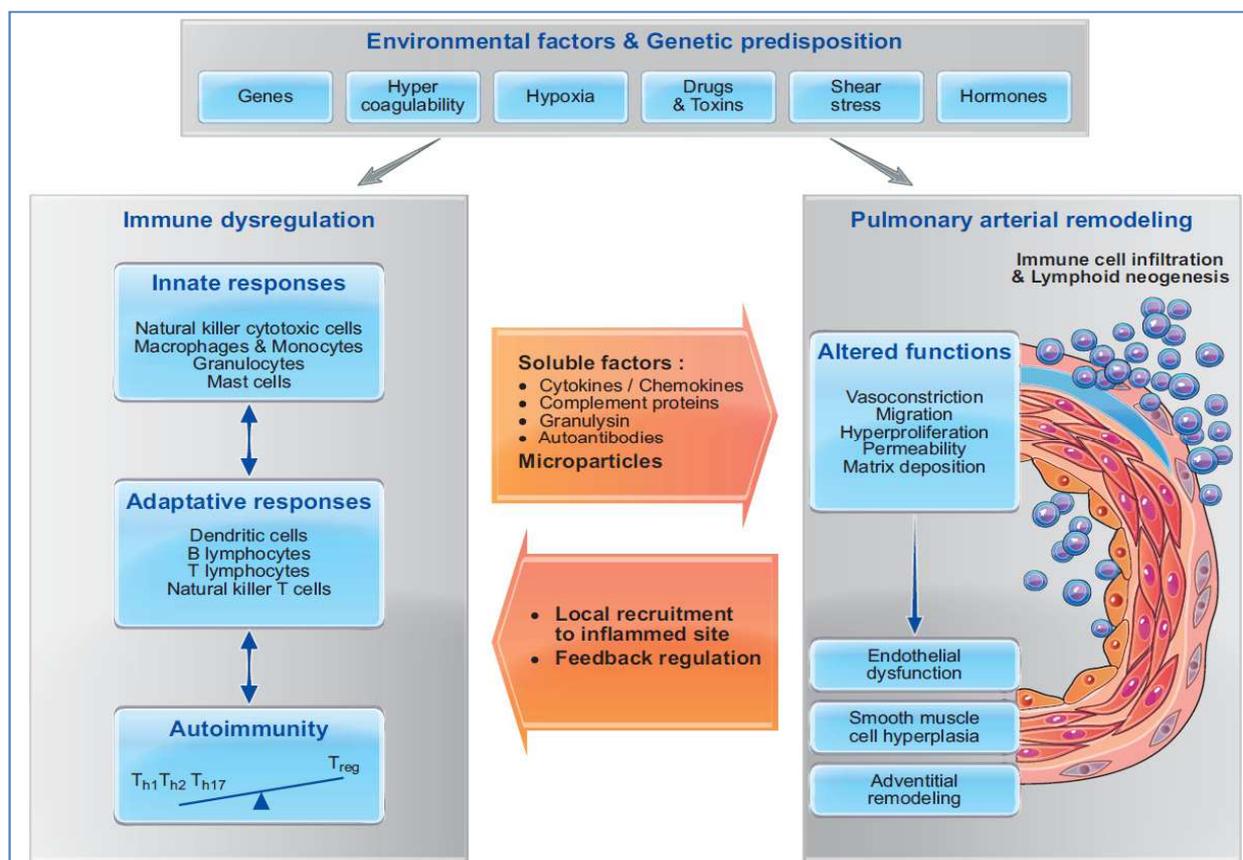


Figure 6: Schéma illustrant la communication entre système immunitaire et éléments de la paroi vasculaire dans la pathogénèse de l'HTAP (Huertas A. et al. CIRCULATIONAHA/2013/004555)

Les données disponibles sur ce sujet ont fait l'objet d'une review soumise à *Circulation*, actuellement en révision (A. Huertas, *et al.* Immune Dysregulation and Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension: a complex interplay. *Manuscript number: CIRCULATIONAHA/2013/004555*).

1. Communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules inflammatoires

Le rôle de l'inflammation dans le développement de la HTAP a été plusieurs fois décrit et les CE jouent clairement un rôle important dans les processus inflammatoires (Tuder *et al.* 1994; Humbert *et al.* 1995; Fartoukh *et al.* 1998; Voelkel *et al.* 1998). Nous avons vu que les cellules inflammatoires, y compris les macrophages et les lymphocytes, sont fortement présentes dans les lésions artérielles et plexiformes dans l'HTAP. Les niveaux de protéines inflammatoires de l'IL-1 β et de l'IL-6 sont également augmentés dans le sérum des patients HTAP. Bien que la source principale de ces cytokines ou chemokines soit les cellules inflammatoires elles-mêmes, comme les monocytes/macrophages ou les lymphocytes B et T, il est à noter que les CE sont capables de produire ces médiateurs, notamment l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8, le MCP-1, le CCL5, CXCL10 et la Fracktalkine et participent donc activement à l'inflammation. En effet, Sanchez *et al.* (Sanchez *et al.* 2007) ont montré que les CE HTAP, par rapport aux CE témoins, sécrètent plus de MCP-1 et recrutent de façon anormale les monocytes. D'autre part, les CE ont à leur surface des protéines membranaires, comme la P-sélectine dont les ligands se trouvent au niveau des leucocytes et des plaquettes. Cette protéine P-sélectine est augmentée chez les patients HTAPi (données préliminaires non publiées – troisième travail de cette thèse). Ces données montrent que les CE HTAP peuvent favoriser le recrutement des cellules inflammatoires au niveau de la lésion vasculaire expliquant la présence d'infiltrats de cellules inflammatoires autour des vaisseaux (Sakamaki *et al.* 2000). Une étude, menée par Wright *et al.*, montre une augmentation de l'expression de la 5-lipoxygénase (5-LO) et de la protéine *5-lipoxygenase activating protein* (FLAP), au niveau de l'endothélium des artères pulmonaires des patients HTAP. Ces 2 médiateurs sont impliqués dans la synthèse des leucotriènes qui vont activer et recruter les cellules sur le site de l'inflammation. De plus, la délétion de l'enzyme 5-LO ou l'inhibition de FLAP protège la souris contre le développement de l'HTP induite par l'hypoxie chronique

(Voelkel *et al.* 1996; Wright *et al.* 1998). Non seulement, les CE sécrètent des cytokines et des chemokines de façon à recruter des cellules inflammatoires, mais il existe également un lien étroit entre les CE et les cellules inflammatoires du fait de leur localisation privilégiée dans la paroi vasculaire (Figure 6).

2. Communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules de l'immunité adaptative : exemple des lymphocytes T régulateurs

Il a récemment été démontré que les lymphocytes T régulateurs, ou Treg, étaient régulés par la leptine dans de nombreuses maladies autoimmunes (Lam and Lu 2007). En effet, il a été montré que, dans des maladies autoimmunes chroniques comme la sclérose en plaques, la concentration de leptine circulante corrélait de façon significative avec le pourcentage de Treg circulants (Matarese *et al.* 2005).

2.1. La leptine

La leptine (du grec *λεπτος*, *leptos*, qui signifie mince) est parfois dite « hormone de la faim » pour son rôle de régulateur de la sensation de satiété, de l'appétit et donc du poids corporel. Le gène *Ob* (de l'anglais *obese*) codant pour la leptine, a été découvert en 1994 par Jeffrey M. Friedman et Rudolph Leibel à New York, permettant la synthèse de cette hormone un an plus tard (Zhang *et al.* 1994). Friedman et Leibel se sont appuyés sur les découvertes de Douglas Coleman, qui, dans les années '60, avait montré qu'un facteur soluble agissait au niveau de l'hypothalamus et régulait l'appétit chez les souris *ob/ob*, développées dès 1949 au sein des laboratoires *Jackson* (Coleman 1978).

2.1.1. Structure, récepteurs et voies de signalisation

La leptine, ou protéine *Ob*, est une hormone peptidique non glycosylée de 16kDa, constituée de 167 acides aminés, qui possède une structure à longue chaîne hélicoïdale comprenant quatre hélices alpha, semblable, au niveau de leur structure tertiaire, à différentes cytokines de type I à longues chaînes hélicoïdales, telles que certaines interleukines (IL-6, -12 et -15), la prolactine ou l'hormone de la croissance. La leptine agit en

se liant à son récepteur spécifique, appelé ObR, qui fait partie de la famille des récepteurs de cytokines de type I et dont la structure rappelle celle des récepteurs de l'IL-6, -12 ou de la prolactine. De par sa structure et son récepteur, la leptine est une hormone qui agit de façon similaire aux cytokines (Ihle 1995).

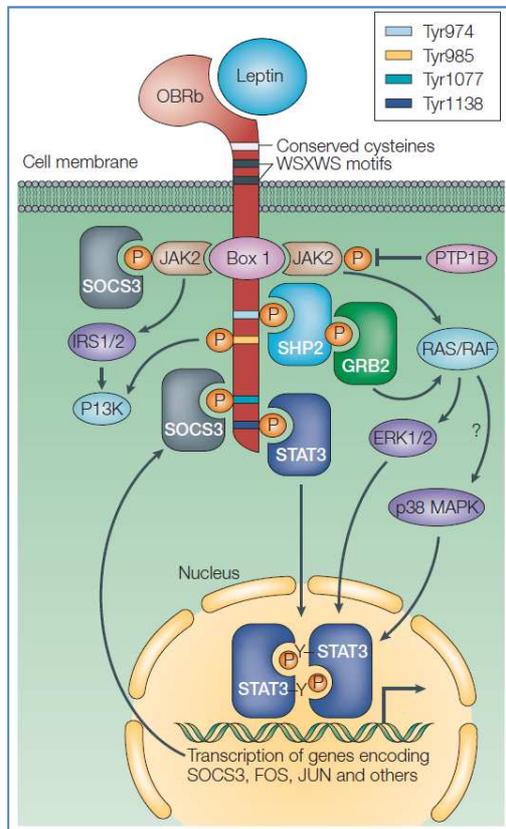


Figure 7 : Voies de signalisation activées par la leptine via son récepteur ObRb (La Cava A & Matarese G. Nat Rev. 2004)

Le récepteur ObR est une glycoprotéine transmembranaire dont il existe six isoformes (de ObRa à ObRf), caractérisé par des domaines cytoplasmiques de longueurs différentes. Le seul isoforme actif, qui présente des motifs d'activation et de transduction du signal est l'isoforme **ObRb**, dont la longueur totale est de 1162 acides aminés (Figure 7). Ce récepteur est fortement exprimé dans l'hypothalamus, médiant ainsi le rôle principal de la leptine au niveau du contrôle central de la satiété, mais est également présent dans plusieurs tissus périphériques, tels que les cellules β pancréatiques, les cellules endothéliales et les cellules hématopoïétiques : les plaquettes et les lymphocytes. ObRb forme un homodimère en l'absence de ligand qui se tétramérise en présence d'une molécule de leptine pour chaque récepteur, conformation nécessaire à la signalisation (Frühbeck 2006). Comme tout récepteur de cytokines de type I, ObRb ne possède pas d'activité tyrosine kinase intrinsèque et requiert l'activation de tyrosines kinases associées au récepteur, le

Janus-family tyrosine kinase 2 (JAK2). Une fois phosphorylé et donc activé, JAK2 phosphoryle au niveau des résidus tyrosines le domaine intracellulaire du récepteur. Ceci va entraîner la mobilisation du facteur *signal transducer and activator of transcription (STAT)3*, qui à son tour, après homodimérisation, transloque dans le noyau et induit l'expression de gènes comme *JUN* et *FOS*. De plus, un contrôle négatif se met en place par expression du gène de la protéine *suppressor of cytokine signaling (SOCS)3*, un inhibiteur endogène de STAT3. Parallèlement à la voie principale JAK2-STAT3, ObRb active également d'autres voies de signalisation, en particulier la voie du *phosphatidyl-inositol 3 kinase (PI3K)*, la voie de l'*inuline receptor substrate 1 (IRS1)* et la voie des MAPK avec activation des kinases ERK et p38 MAPK, via la phosphorylation de *Src homology 2 (SH2) domain-containing phosphatase 2 (SHP2)* (La Cava and Matarese 2004).

Les isoformes ObRa, ObRc, ObRd et ObRf sont appelés isoformes courts, en opposition à l'isoforme ObRb, sont constitués de 34 acides aminés et joueraient un rôle dans le transport et la dégradation de la leptine. Ils sont exprimés par différents tissus périphériques non immuns, notamment le rein, le poumon, le foie et le plexus choroïdien dans lequel l'isoforme ObRa serait impliquée dans le passage de la leptine à travers la barrière hémato-encéphalique (Frühbeck 2006).

Enfin, l'isoforme ObRe constitue une forme sécrétée, pouvant se lier à la leptine circulante et qui peut se présenter sous forme libre ou liée. La leptine circule essentiellement sous forme libre chez les sujets obèses, alors que cette forme ne représente que la moitié de la leptine circulante chez les sujets minces (Frühbeck 2006).

2.1.2. Biosynthèse

La leptine est essentiellement sécrétée par les adipocytes, de façon proportionnelle à la masse corporelle adipeuse, mais elle est également produite, en plus faible quantité, par le fondus gastrique, l'intestin, les muscles squelettiques, le placenta, l'épithélium mammaire et le cerveau (La Cava and Materese 2004 ; Flier 2004; Ahima and Flier 2000).

Les taux sériques physiologiques de la leptine s'élèvent à 5-8 ng/ml mais varient en fonction du poids, du genre et de la prise alimentaire. L'expression du gène *Ob* est en effet régulée par de nombreux facteurs comme la prise alimentaire, à laquelle s'associe une

augmentation du taux sérique de la leptine. En effet, la leptine est sous contrôle direct de l'insuline, dont l'augmentation stimule la sécrétion de leptine pendant les repas et dont la diminution réduit les taux de leptine durant le jeûne. La leptine varie aussi en fonction du genre car sa sécrétion est augmentée par les hormones stéroïdiennes féminines, alors que la testostérone en inhibe la sécrétion. L'expression du gène de la leptine est augmentée par les corticoïdes. La sécrétion de leptine augmente aussi en réponse aux infections aiguës et à la sécrétion de médiateurs de l'inflammation. Il a été en effet montré que l'IL-1 β , le TNF- α et le leukemia inhibitory factor (LIF) stimule la sécrétion de leptine (Otero *et al.* 2005). Enfin, il a été démontré qu'une région fonctionnelle hypoxia response element (HRE) était présente au niveau du gène *Ob*, ce qui montre que la leptine est également sous contrôle transcriptionnel du facteur HIF-1 α (Ambrosini *et al.* 2002).

2.1.3. Fonctions

Depuis sa découverte en 1994 comme hormone de la satiété, de nombreuses études ont montré que cette hormone n'avait pas seulement des effets au niveau du système nerveux central mais jouait également d'importants rôles physiologiques au niveau périphérique (Figure 8). Même si le rôle principal de la leptine reste celui du contrôle de la prise alimentaire et donc du poids corporel, les études effectuées sur les souris déficientes en leptine (*ob⁻/ob⁻*) ou en récepteur de la leptine (*db⁻/db⁻*) ont montré que ces souris n'étaient pas seulement obèses mais qu'elles présentaient également de nombreuses anomalies au niveau de l'hématopoïèse, de la reproduction, de l'angiogenèse, de la sécrétion d'insuline, du métabolisme osseux, lipidique et glucidique, et de l'immunité innée et adaptative.

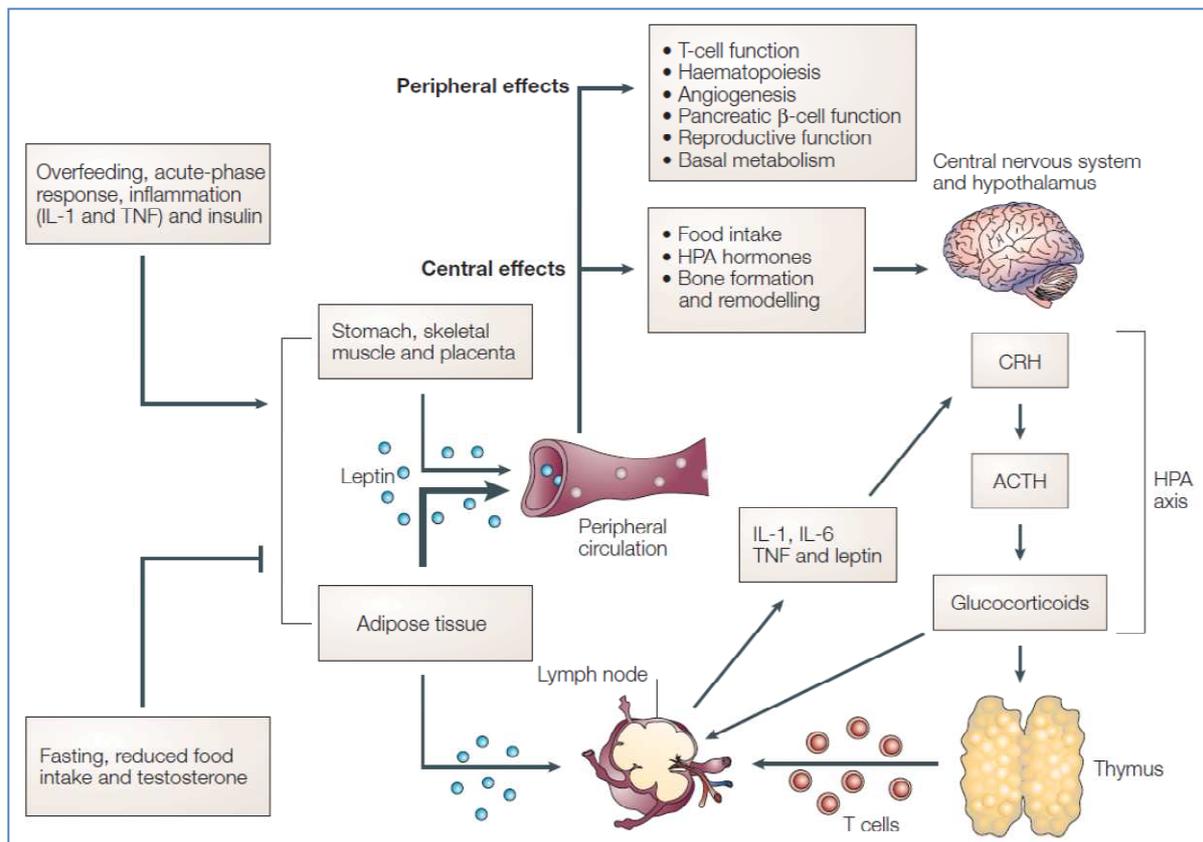


Figure 8: Rôles neuroendocriniens centraux et périphériques de la leptine (La Cava A. & Matarese G. Nat Rev. 2004)

2.1.4. Mécanismes centraux

- **Régulation de l'appétit**

La fonction essentielle de la leptine consiste à réguler la prise alimentaire, principalement par ses effets sur l'hypothalamus. L'appétit est contrôlé par deux systèmes distincts mais interconnectés, l'homéostasie et la régulation hédonique, systèmes sur lesquels agit la leptine. Dans l'homéostasie, des taux élevés de leptine signale la présence de réserves énergétiques suffisantes à l'hypothalamus, qui répond en réduisant l'appétit et en augmentant les dépenses énergétiques, ce qui prévient la prise de poids. La leptine provoque donc une réduction de la prise alimentaire, une augmentation de la thermogenèse et une augmentation du métabolisme basal. A l'inverse, la diminution des réserves de matières grasses, qui a pour conséquence de réduire la sécrétion de leptine, commande donc une reprise de l'alimentation et une diminution des dépenses énergétiques. Au niveau hédonique, la leptine intervient sur plusieurs signaux du système limbique en contrôlant le

comportement alimentaire, notamment à travers la perception olfactive, le goût, la satisfaction et la motivation, lié à la nourriture (Pénicaud *et al.* 2012).

Il existe de rares cas chez l'homme de syndromes de déficience de leptine, comme l'obésité congénitale, la lipoatrophie ou la dysfonction hypothalamo-hypophysaire. Ces patients répondent au traitement par leptine exogène par une diminution drastique de l'appétit, de la prise alimentaire et donc à une perte de poids radicale.

De façon surprenante, l'obésité est le plus souvent liée à des taux élevés de leptine, ce qui suggère une résistance à la leptine chez ces patients, dont le mécanisme exact n'est pas encore clairement établi. Tout comme pour la résistance à l'insuline, des hypothèses d'anomalies du transport de la leptine au niveau de la barrière hémato-encéphalique, des altérations du récepteur de la leptine ou de sa signalisation, ou encore l'induction d'une inhibition de la leptine par SOCS3 ont été émises (Pénicaud *et al.* 2012).

➤ **Métabolisme osseux**

Il a été montré que la leptine agit sur le métabolisme osseux mais il existe de nombreuses controverses sur les mécanismes impliqués dans cette régulation et sur leur importance physiologique. La leptine agirait directement, en augmentant la prolifération et la différenciation des ostéoblastes, ou indirectement en inhibant la sécrétion de la sérotonine au niveau de l'hypothalamus (Ducy *et al.* 2000).

➤ **Axe endocrinien**

La répartition ubiquitaire des récepteurs de la leptine suggère que la leptine ait une grande influence sur différents axes endocriniens, notamment sur l'axe hypothalamo-hypophysio-surrénalien. Chez la souris, l'administration de la leptine atténue l'augmentation de l'hormone adrénocorticotropique (ACTH) et de la corticostérone induite par le jeûne. Il a également été montré que la leptine, comme d'autres cytokines de la phase aiguë de la réponse inflammatoire, notamment IL-1, IL-6 et TNF- α , influence la sécrétion du *corticotrophin-releasing hormone* (CRH) et donc de l'ACTH et des glucocorticoïdes, qui d'autre part, augmentent l'expression du gène de la leptine (La Cava and Materese 2004 ; Haynes *et al.* 1997) L'administration de leptine atténue la diminution de TSH induite par le jeûne chez la souris et augmente la synthèse de la thyroïdostimuline (ou *thyroid stimulating hormone* ou TRH) (Legradi *et al.* 1997).

2.1.5. Mécanismes périphériques

Les fonctions de la leptine sont très nombreuses au niveau périphérique. En particulier, le récepteur ObRb étant exprimé à la surface des cellules endothéliales, la leptine jouerait un rôle dans l'angiogénèse : la leptine induit la prolifération des kératinocytes *in vitro* et permet la ré-épithélisation des plaies *in vivo*. De plus, les souris déficientes en leptine sont caractérisées par un retard important de cicatrisation des plaies. En raison de ses propriétés mitogènes et angiogéniques, la leptine pourrait jouer un rôle important dans la régénération tissulaire au cours des réponses inflammatoires (Faggioni *et al.* 2001 ; Sierra-Honigmann *et al.* 1998; Bouloumié *et al.* 1998).

La leptine est également impliquée dans l'hématopoïèse, à travers la régulation de la prolifération, la différenciation et l'activation des cellules hématopoïétiques (Gainsford and Alexander 1999), dans la reproduction (les souris *ob⁻/ob⁻* dépourvues de leptine sont stériles) (Ahima *et al.* 1997; Chehab *et al.* 1996) et dans le risque cardiovasculaire. En effet, la leptine module l'homéostasie glucidique en contrôlant les flux intra-hépatiques de glucose et donc la production de glucose endogène d'une part, et en favorisant la néoglucogénèse et la glycogénolyse au niveau central. La leptine jouerait également un autre rôle important en orientant massivement le stockage des lipides sous forme de triglycérides vers les adipocytes, diminuant les taux circulants de triglycérides et protégeant ainsi les autres types cellulaires d'une accumulation de triglycérides aux effets potentiellement nocifs. La leptine est également connue pour être associée à l'insulinorésistance : des études épidémiologiques ont montré une corrélation entre l'hyperinsulinémie caractéristique de l'insulinorésistance et une hyperleptinémie. L'association de ces deux facteurs conduit directement au développement non seulement d'un diabète non insulino-dépendant mais aussi au syndrome métabolique (obésité centrale, intolérance au glucose, hypertension, hyperlipidémie) prédisposant fortement aux maladies cardiovasculaires (Morton *et al.* 2005 ; Mutch and Clément 2006).

2.1.6. Effets de la leptine sur le système immunitaire inné

Le rôle de la leptine dans l'immunité a été découvert plus récemment (Figure 9). Ainsi, une altération des réponses immunitaires et une susceptibilité aux infections ont été rapportées chez les animaux déficients en leptine ou en son récepteur, chez les sujets

déficients en leptine ainsi que lors des situations de malnutrition, où l'on observe des taux faibles de leptine (Ozata *et al.* 1999 ; Faggioni *et al.* 2001 ; La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005). Dans ce dernier cas, la leptine semble être un signal pour l'adaptation à l'état de jeûne, permettant de conserver l'énergie pour les muscles et l'activité cérébrale (Faggioni *et al.* 2001). De plus, plusieurs études ont montré une augmentation des taux circulants de leptine au cours de certaines infections bactériennes ou de réactions inflammatoires. Ainsi, les taux de leptine sont augmentés sous l'action de différents médiateurs de la phase aiguë de l'inflammation tels que le TNF, l'IL-6 et l'IL-1 ou après stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) (Loffreda *et al.* 1998 ; Santos-Alvarez *et al.* 1999 ; Zarkesh-Esfahani *et al.* 2001 ; La Cava and Matarese 2004). De même, les taux de leptine sont augmentés au cours de péritonites expérimentales ou de modèles d'inflammation aiguë chez le rat (Gualillo *et al.* 2000). Il est reconnu que la leptine facilite la réponse de l'hôte à l'inflammation et à l'infection en stimulant la réparation tissulaire via ses effets mitogènes et angiogéniques sur l'épithélium et l'endothélium (Sierra-Honigmann *et al.* 1998; Frank *et al.* 2000). La leptine peut également représenter un facteur clé dans l'induction de réponses pro-inflammatoires en agissant en tant que cytokine sur l'homéostasie thymique (Howard *et al.* 1999) ou en sécrétant des substances caractéristiques de la phase aiguë. La leptine peut également stimuler la chimiotaxie des neutrophiles et des macrophages (La Cava and Matarese 2004) en augmentant leurs capacités fonctionnelles à la phagocytose (Moore *et al.* 2003), la sécrétion de cytokines (Loffreda *et al.* 1998 ; Santos-Alvarez *et al.* 1999) ou encore leur capacité à la réaction oxydante (Caldefie-Chezet *et al.* 2003).

Ces résultats suggèrent un rôle de la leptine dans les mécanismes de défense de l'hôte. La leptine agirait en effet au niveau de l'activation et la prolifération des monocytes/macrophages par l'augmentation de l'expression à la surface des monocytes de marqueurs d'activation, tels CD38, CD25 (chaîne α du récepteur à l'IL-2) ou CD71 (récepteur de la transferrine), et d'autre part de certaines molécules d'adhérence (CD11b/CD18, CD11c/CD18) et des molécules HLA (Santos-Alvarez *et al.* 1999). Par ailleurs, la leptine régule les fonctions des macrophages, telles la phagocytose (les macrophages de souris *ob/ob* ou *db/db* présentent en effet une fonction phagocytaire altérée, restaurée par l'administration de leptine recombinante), l'expression de la cyclooxygénase 2 et la sécrétion de leucotriène B4 ou de NO (Loffreda *et al.* 1998 ; Raso *et al.* 2002; Otero *et al.* 2005). Enfin, il a été montré

que la leptine exerce un effet sur la survie des monocytes, en prévenant leur apoptose, via l'activation des MAPK (Sanchez-Margalet *et al.* 2003).

La leptine jouerait également un rôle dans le développement, la différenciation, la prolifération, l'activation et la cytotoxicité des cellules NK, augmentant leur sécrétion de perforine et d'IL-2 (Lam and Lu 2006; Mattioli *et al.* 2009 ; La Cava and Matarese 2004 ; Otero *et al.* 2005) et dans la survie des polynucléaires éosinophiles, en exerçant un effet anti-apoptotique sur ces cellules, médié par l'activation des MAPK et de la PI3K (Conus *et al.* 2005).

2.1.7. Effets de la leptine sur les réponses immunes de type adaptatif

Ces effets concernent essentiellement les lymphocytes T CD4+ et se jouent à plusieurs niveaux (Figure 9). Il a été montré que la leptine joue un rôle dans la génération, la maturation et la survie des thymocytes, en retardant leur entrée en apoptose. En effet, au cours du jeûne, une diminution brutale du nombre de calories absorbées provoque une diminution rapide des taux sériques de leptine, accompagnée d'une atrophie thymique, réversible avec l'administration de leptine (La Cava and Matarese 2004). De plus, les souris ob/ob, déficitaires en leptine, présentent également un thymus de petite taille, renfermant de nombreux thymocytes apoptotiques. Cette atrophie thymique affecte le cortex du thymus, où se trouvent la plupart des thymocytes double positifs CD4+CD8+, et l'apport de leptine permet de réduire le taux d'apoptose de ces cellules (Howard *et al.* 1999). La leptine apporterait donc un signal de survie aux thymocytes double positifs CD4+CD8+ et simple positifs durant la maturation des lymphocytes T. Elle exerce également des effets anti-apoptotiques sur les cellules T matures. Ces effets peuvent résulter de son aptitude à augmenter l'expression des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL, qui protègent les cellules T et les thymocytes de l'apoptose (La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

La leptine jouerait également un rôle dans la prolifération et l'activation lymphocytaire T. L'addition de concentrations physiologiques de leptine lors d'une réaction lymphocytaire mixte (LMR) induit une prolifération dose dépendante des lymphocytes T CD4+. Néanmoins, la leptine présente des effets différents sur la prolifération et la production de cytokines par les cellules T CD4+ naïves (CD45RA+) et mémoires (CD45RO+).

Ainsi, la leptine augmente la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les cellules T naïves alors qu'elle possède de très faibles effets sur la prolifération des cellules T mémoires, voire un effet inhibiteur (La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

La leptine augmente également l'expression de molécules d'adhérence à la surface des lymphocytes T CD4+, telles que l'ICAM1 ou le *very late antigen 2* (VLA2), pouvant permettre l'activation et la migration des cellules immunitaires vers les sites de l'inflammation (Faggioni *et al.* 2001 ; La Cava and Matarese 2004).

Enfin, la leptine induit une polarisation Th1 des réponses immunitaires. En effet, elle augmente la production d'IFN- γ et de TNF- α par les lymphocytes T, conduisant de ce fait à une augmentation de la production d'IgG par les cellules B, des réactions d'hypersensibilité retardée et de l'activation des macrophages. A l'inverse, elle inhibe les réactions de type Th2, diminuant ainsi la production d'IL-4 et d'immunoglobulines d'isotype IgG1 (Faggioni *et al.* 2001 ; La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

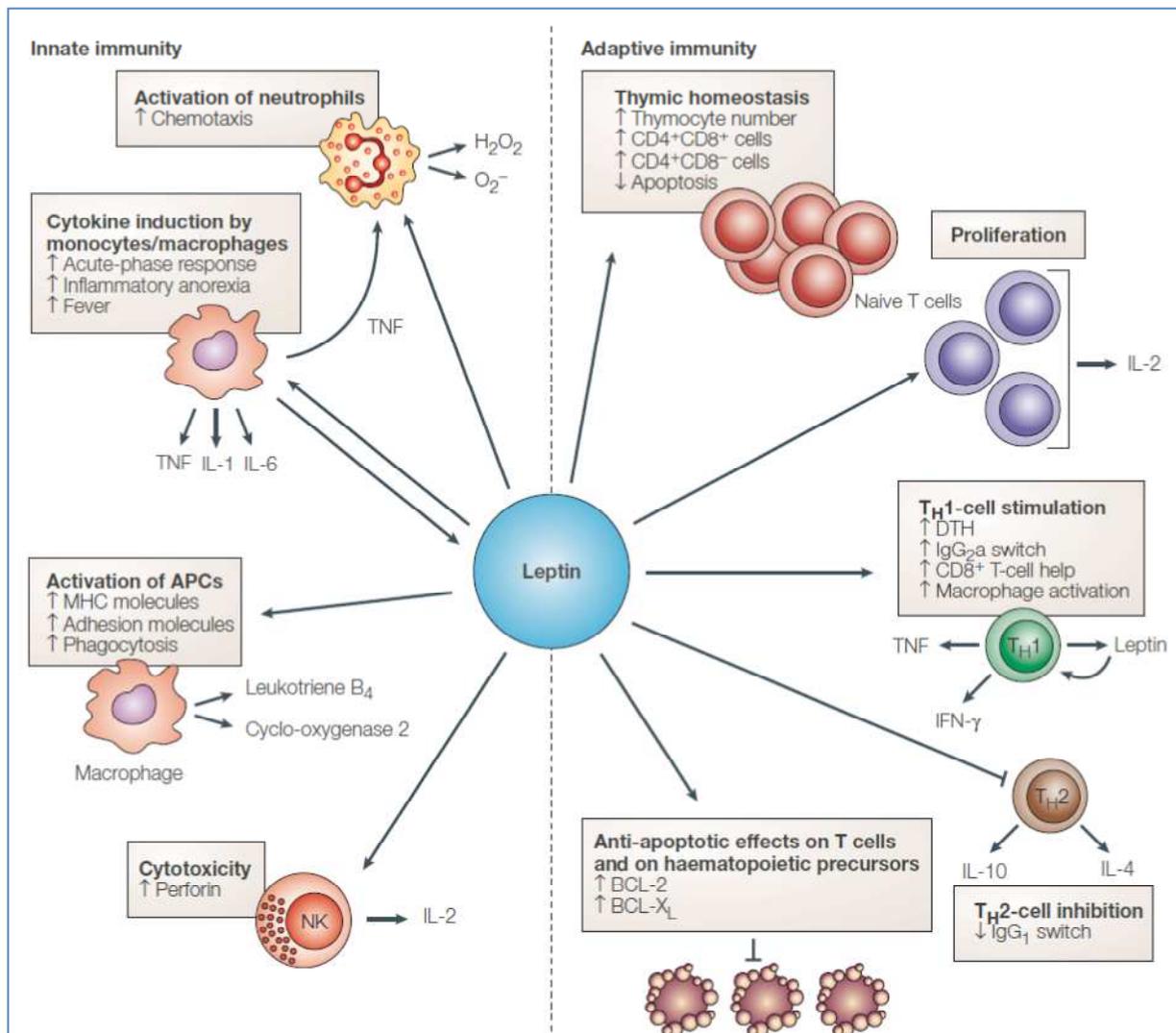


Figure 9: Effets de la leptine sur le système immunitaire inné et adaptatif (La Cava A. & Matarese G. Nat Rev. 2004)

2.2. Implication de la leptine au cours de certaines situations pathologiques

Parallèlement à son rôle physiologique dans la régulation des réponses immunitaires, la leptine a été impliquée dans la physiopathologie de certaines maladies inflammatoires chroniques et autoimmunes.

2.2.1. Rôle de la leptine au cours de certaines maladies inflammatoires chroniques

Une augmentation de la sécrétion périphérique de leptine a été associée à de nombreuses situations d'inflammation chronique, telles les stéatoses hépatiques non

alcooliques, la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) et les maladies inflammatoires intestinales (Uygun *et al.* 2000 ; Schols *et al.* 1999). Néanmoins, d'autres études effectuées chez l'homme ont rapporté des concentrations de leptine dans les limites de la normale au cours de ces différentes situations inflammatoires (Chalasanani *et al.* 2003 ; Takabatake *et al.* 1999 ; Anders *et al.* 1999). Ces résultats contradictoires pourraient s'expliquer par des caractéristiques différentes des patients étudiés, en particulier selon le stade de la maladie (La Cava and Matarese 2004).

Les maladies inflammatoires intestinales, comme la colite ulcéreuse, sont souvent associées à l'anorexie et à une perte de poids marquée, associée à des taux élevés de leptine (Barbier *et al.* 1998, Otero *et al.* 2005). Très récemment, il a été découvert que les cellules épithéliales gastriques du rat et de l'homme produisaient de la leptine. La leptine gastrique, résistante à la dégradation protéolytique, peut, de ce fait, atteindre l'intestin sous une forme active et ainsi agir sur d'éventuelles cibles lumineuses. Les récepteurs de la leptine ont par ailleurs été décrits au niveau de la bordure en brosse des entérocytes mais aussi à la membrane apicale des cellules épithéliales coliques (Sitaraman *et al.* 2004). La leptine gastrique peut également agir sur l'intestin grêle mais il semble peu probable qu'elle puisse avoir une action sur le colon. Néanmoins, chez les patients présentant une colite ulcéreuse modérée à sévère, ou chez les patients atteints de maladie de Crohn, des taux élevés de leptine ont été observés au niveau du colon. La leptine pourrait être libérée par les cellules en nécrose ou en apoptose au cours des maladies inflammatoires intestinales. De plus, la leptine plasmatique pourrait traverser les épithéliums et se retrouver au niveau de la lumière intestinale. Par ailleurs, si la leptine n'est pas détectée au niveau des cellules épithéliales coliques normales, les cellules épithéliales coliques inflammatoires expriment de fortes quantités de leptine, concentrée au niveau de leur partie apicale. Ces résultats suggèrent que les cellules épithéliales coliques inflammatoires puissent constituer l'une des principales sources de leptine lumineuse chez les patients atteints de maladies inflammatoires intestinales. En outre, la leptine lumineuse induit l'activation du facteur de transcription NF- κ B, cette activation étant impliquée dans la pathogénèse des maladies inflammatoires intestinales. *In vivo*, la leptine induit également des dommages de la paroi épithéliale colique : la leptine est considérée de ce fait comme une cytokine pro-inflammatoire au niveau du colon (Sitaraman *et al.* 2004).

Enfin, chez les sujets obèses, non déficients en leptine, les taux élevés de leptine reflètent une résistance à la leptine, provoquée par une sous-expression du récepteur ObR. Ceci pourrait conduire à une dérégulation immunitaire et à une altération de la balance Th1/Th2, entraînant une susceptibilité aux infections et une réponse inflammatoire anormale. L'obésité est en effet considérée comme un état pro-inflammatoire, étant associée à une infiltration progressive des tissus adipeux par des macrophages, qui sécrètent des cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL-1 β , IL-6). Ces dernières vont stimuler les adipocytes pour sécréter davantage de leptine et de cytokines pro-inflammatoires, telles que le TNF- α (Matarese *et al.* 2005).

2.2.2. Rôle de la leptine au cours de certaines maladies autoimmunes

Différents arguments plaident en faveur de l'implication de la leptine dans les processus autoimmuns, en agissant sur les Treg (Lam and Lu 2007):

- Les souris ob/ob présentent une diminution de sécrétion d'IL-2, d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-18, associée à une production augmentée de cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-10. Ces souris sont résistantes à l'induction expérimentale de différentes maladies autoimmunes (La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

- Dans l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), modèle murin de sclérose en plaques, la survenue de la maladie est précédée d'une augmentation des taux sériques de leptine. En outre, le jeûne, qui réduit les taux de leptine, retarde la survenue de la maladie et atténue les symptômes. Enfin, les souris ob/ob sont résistantes à l'induction de l'EAE, cette résistance étant abolie par l'administration de leptine (avec un switch vers la production de cytokines de type Th1) (Otero *et al.* 2005). Chez l'homme, une diminution du nombre de calories ingérées ou des changements diététiques peuvent améliorer les symptômes de la sclérose en plaque. De plus, la concentration de leptine circulante est corrélée de façon significative avec le pourcentage de Treg circulants (Matarese *et al.* 2005).

- La leptine a également été impliquée dans le diabète de type 1, où les cellules β pancréatiques sont détruites par un processus inflammatoire immun. En effet, les souris femelles *non obese diabetic* (NOD) (qui constituent l'un des meilleurs modèles animaux de diabète de type 1) ont des taux sériques de leptine augmentés avant la survenue de la

maladie. De plus, l'administration de leptine exogène accélère la survenue et la progression de la maladie, en accélérant la destruction auto-immune des cellules β pancréatiques et en augmentant la sécrétion d'INF- γ par les cellules T périphériques. La leptine interviendrait donc dans le développement du diabète de type 1 via des réponses Th1 (La Cava and Matarese 2004 ; Otero *et al.* 2005).

- Un autre élément en faveur de l'implication de la leptine dans l'autoimmunité est le dimorphisme sexuel observé au niveau des concentrations sériques de leptine, plus élevées chez les femmes que chez les hommes de même âge et de même indice de masse corporelle. La leptine pourrait donc s'ajouter aux autres hormones telles l'oestradiol ou la prolactine, connues pour participer à la prédisposition féminine aux maladies autoimmunes. Ainsi, seules les souris femelles hyperleptinémiques développent des maladies auto-immunes alors que les souris hypoleptinémiques sont protégées. Le traitement des souris mâles résistantes à l'EAE par de la leptine recombinante les rend susceptibles à cette maladie (La Cava and Matarese 2004 ; Matarese *et al.* 2005).

En conclusion, la leptine joue un rôle majeur dans la régulation de l'immunité, permettant de maintenir une réponse immunitaire optimale et de protéger ainsi les individus des infections. Néanmoins, elle est également impliquée dans la physiopathologie de l'inflammation et des maladies autoimmunes. Des perspectives thérapeutiques, visant à contrecarrer l'action néfaste de la leptine, pourraient ainsi être envisagées au cours des maladies inflammatoires ou autoimmunes. Il serait ainsi possible d'utiliser un récepteur soluble capable de se lier avec une forte affinité à la leptine, permettant ainsi de contrôler la quantité de leptine disponible. Une autre perspective thérapeutique consisterait en l'utilisation d'anticorps monoclonaux humanisés anti-leptine ou de mutants de leptine présentant des propriétés antagonistes, capables de se lier au récepteur de la leptine sans l'activer (Otero *et al.* 2005).

Review series: Basic Science for clinicians

Immune Dysregulation and Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension: a complex interplay

Huertas: Immune/endothelial dysregulation in PAH

Alice Huertas, MD^{1,2,3,4}, Frédéric Perros, PhD^{1,2,3,4}, Ly Tu, PhD^{1,2,3,4}, Sylvia Cohen-Kaminsky, PhD^{1,2,3,4}, David Montani, MD, PhD^{1,2,3,4}, Peter Dorfmüller MD, PhD^{1,2,3,4}, Christophe Guignabert, PhD^{1,2,3,4} and Marc Humbert, MD, PhD^{1,2,3,4}

Affiliations:

¹ Univ. Paris-Sud, Faculté de médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France;

² AP-HP, Service de Pneumologie, DHU "Thorax Innovation", Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France;

³ INSERM UMR_S 999, LabEx LERMIT, Le Plessis-Robinson, France;

⁴ Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

Correspondence:

Pr. Marc Humbert

Service de Pneumologie

Hôpital Bicêtre

78, rue du Général Leclerc

94270 Le Kremlin-Bicêtre

France

Tel: +33 1 45 21 79 72

Fax: +33 1 45 21 79 71

marc.humbert@bct.aphp.fr

Total word count: 6418

Subject code: 18-Pulmonary circulation and disease

1

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) has a complex and multifactorial pathogenesis in which excessive migration and proliferation of pulmonary vascular wall cells contribute to an inappropriate vascular remodeling leading to persistent elevation of pulmonary vascular resistance and in turn right heart failure. It is now widely accepted that altered immune mechanisms play a significant role in PAH by recruiting inflammatory cells, remodeling the pulmonary vasculature and promoting autoimmune responses. Despite this knowledge, the exact mechanisms are still unclear and several questions remain unanswered on how innate and adaptive immune dysregulation could contribute to PAH initiation, perpetuation and/or worsening. According to current knowledge, it is particularly difficult to assess whether altered immune responses represent a cause or an effect of the disease. This review highlights the important role of immune mechanisms in PAH pathogenesis and, in particular, the central role of endothelial dysfunction in both altered immunity and pulmonary vascular remodeling. A better understanding of the crosstalk between immune mediators and the components of the pulmonary vascular wall could help to identify novel PAH therapeutical targets.

Key words: pulmonary hypertension, immune system, pulmonary vascular remodeling, endothelial dysfunction, autoimmunity

1. Introduction

Pulmonary arterial hypertension (PAH) corresponds to a heterogeneous group of severe clinical conditions characterized by precapillary pulmonary hypertension diagnosed when mean pulmonary artery pressure (mPAP) equals or exceeds 25 mmHg at rest with a normal pulmonary artery wedge pressure (≤ 15 mmHg). According to the current clinical classification, PAH can be idiopathic (IPAH), heritable, drug- or toxin-induced, associated with other diseases (connective tissue diseases (CTD), congenital heart diseases, human immunodeficiency virus (HIV) infection, portal hypertension...) ¹. PAH has a complex and multifactorial pathogenesis in which excessive migration and proliferation of pulmonary vascular cells (i.e. endothelial (ECs) and smooth muscle cells (SMCs)) and dysregulated immune responses are critical contributors to the inappropriate pulmonary vascular remodeling. PAH is a fatal condition leading to right heart failure and death within 2–3 years after diagnosis, if left untreated. During the last decade, therapeutic options for the treatment of this disease have improved exercise capacity and quality of life and long-term outcomes. However, there is currently no cure available and further insight into disease pathophysiology is needed in order to advance drug development and improve patients' management.

It is now widely accepted that altered immune mechanisms play a significant role in PAH by recruiting inflammatory cells, remodeling the pulmonary vasculature and promoting autoimmune responses. Inflammation is a general term for the local accumulation of fluid, plasma proteins and white blood cells that is initiated by physical injury, infection, or a local immune response: these phenomena represent the innate immune response. The innate immune response contributes to the activation of adaptive immunity which is the response of antigen-specific lymphocytes to antigen, including the development of immunological memory. The unique features of adaptive immunity, based on clonal selection of lymphocytes

bearing antigen-specific receptors, provide the abilities to recognize all pathogens specifically and enhanced protection against reinfection. When adaptive immunity attacks the self, because of a breakdown of self-tolerance, an autoimmune response develops (i.e. directed against self antigens) that can give rise to an autoimmune disease. The pathophysiology of autoimmune diseases involves an aberrant interplay between the innate and adaptive immune systems, culminating in a loss of self-tolerance. Dysregulation of these processes results in T cell-mediated autoimmune responses and autoantibody formation. Normal inflammatory/immune responses proceed through initiation, effector, and resolution phases. In contrast to normal responses, there is sustained cellular activation in autoimmune diseases, resulting in chronic inflammation with concomitant tissue damage and remodeling.

It currently remains unclear how altered immune responses may contribute to PAH initiation, perpetuation and/or worsening. This review will highlight the central role of dysregulated immune mechanisms in PAH pathogenesis.

2. Clinical evidences for altered immune responses in PAH

2.1. Innate responses

It is now well established that a wide array of inflammatory markers are increased in the serum and lungs of patients with PAH. Circulating levels of cytokines including interleukin (IL)-1-beta, IL-6² and chemokines such as CCL2 (CC chemokine ligand 2)/MCP-1 (Monocyte chemotactic protein)³, CCL5/RANTES (Regulated upon Activation, Normal T cell Expressed and Secreted)⁴ and CX(3)C fractalkine⁵ are elevated in IPAH, CTD- and HIV- associated PAH patients⁶. Increasing data are indicating that inflammation is involved in PAH pathophysiology and it has been shown that circulating levels of inflammatory mediators correlate with patient survival^{7, 8}. These inflammatory mediators play a role in leukocyte recruitment and trafficking and are predominantly produced by inflammatory cells

of the innate immune system, but can also be produced by any of the cellular components of the vascular wall or adventitia⁹. Classical arteritic PAH lesions comprise pulmonary transmural inflammatory cell infiltrates with focal vessel wall necrosis and fibrinoid insudation, a histological pattern which has been etiologically linked with particularly severe forms of PAH. The histological 'inflammatory mark', which is much more frequent, corresponds to pulmonary perivascular inflammatory infiltrates, mainly constituted of T and B lymphocytes, mast cells, dendritic cells (DC) and macrophages¹⁰⁻¹² (Figure 1). Interestingly, it has been recently shown, by analyzing 62 PAH explanted lungs, that marked perivascular inflammation is present in a high number of PAH lungs and correlated with intima and media remodeling¹³. Despite these data, whether such inflammatory infiltrates are involved in the pathobiology of PAH or whether they are only epiphenomena linked to other pathologic mechanisms leading to pulmonary vascular remodeling is still unclear. However, according to the experience gained in our national pulmonary hypertension (PH) reference center which gives us access to a large collection of pulmonary samples from severe PAH, inflammatory lesions seem more often associated to 'active' and cellular arterial remodeling, rather than cicatricial-like fibrotic lesions⁹.

Innate responses and effectors, such as natural killer (NK) cells may also play an important role in PAH pathogenesis. It has been shown in IPAH and heritable PAH, as well as in animal PH models, that NK cells display an altered and impaired phenotype¹⁴. Furthermore, cytotoxic T, NK, and NKT cells may contribute to vascular remodeling in different physiological and pathological conditions. We have recently shown that immune regulation of cytotoxic, NK and NKT cells could contribute differently to the pathophysiology of pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) and PAH. We found that, in PVOD, there was a decrease in populations and subpopulations of cytotoxic and NKT cells, whereas there was an increase of NK populations. We assessed their function through their

capacity to produce granulysin (GNLY) and found that peripheral blood mononuclear cells and explanted lungs display lower levels of *GNLY* demethylation in PVOD compared to PAH patients. Furthermore, despite the reduced GNLY-containing cells in patients with PVOD, GNLY serum levels were higher, suggesting that these cells were secreting their content ¹⁵. These results suggest that pulmonary vascular remodeling in PAH or PVOD might be linked to alterations of the circulating and pulmonary compartment of immune cells.

Although increased inflammatory mediators and cell infiltrates represent a common feature of various forms of PAH, only a small percentage of patients with established PAH respond to anti-inflammatory drugs. Complete reversibility of PAH has been exceptionally reported, mostly in the setting of active autoimmune diseases treated with corticosteroids and/or immunosuppressive agents. In a retrospective study, Sanchez and coworkers were able to distinguish a small subgroup of patients with CTD-associated PAH who responded to anti-inflammatory therapies with hemodynamic improvement (8 patients out of 28 and none with systemic sclerosis or SSc) ¹⁶. Another study performed by our group showed that only 50% of CTD-associated PAH patients treated by immunosuppressants (cyclophosphamide and glucocorticoids) had a significant improvement. Interestingly, this study highlighted that the patients who could benefit from the immunosuppressive therapy could be those who have less severe disease at baseline ¹⁷. Furthermore, Montani et al. reported that a patient displaying PAH associated with multicentric Castleman's disease, HIV-1 and human herpesvirus-8 infections, responded dramatically to anti-inflammatory treatment with complete reversibility of PAH, allowing weaning of continuous specific PAH therapy ¹⁸.

2.2. Adaptive responses

Fine targeted immune mechanisms are characterized by a specific response to an antigen; they are favored by an inflammatory background and refer to adaptive immunity. In

the last decade, increasing evidence has highlighted the presence of dysregulated immune mechanisms in PAH patients. A role for autoimmune processes has been first proposed in the context of CTD-associated PAH, in particular in patients with SSc. In the French PAH registry, connective tissue disease (mainly represented by SSc) account for 15.3% of PAH cases, whereas the prevalence of PAH in SSc ranges between 7.8 and 12%^{19, 20}. It is well known that PAH-SSc patients display circulating autoantibodies but interestingly, it has been reported that a subset of patients with IPAH also display circulating immunoglobulin (Ig) G type autoantibodies directed against different components of the vascular wall, endothelial cells, fibroblasts and smooth muscle cells²¹⁻²⁴. A recent study has confirmed the prevalence of anti-endothelial cell autoantibodies that recognize cell surface components in patients with IPAH (62% prevalence) or associated PAH (prevalence 78%)²⁵. It is also estimated that 30-40% of patients with IPAH present anti-nuclear antibodies and 10-15% of these patients have anti-phospholipid antibodies²⁶.

The main effectors of the adaptive immune response are the T and B lymphocytes which are selected in the thymus and in the bone marrow, respectively, to react against the non-self, and are activated only in the presence of foreign antigens from pathogens and/or different from self-antigens. The self-tolerance is controlled in the periphery by a particular population of T lymphocytes called regulatory T lymphocytes (Treg), which develops in the thymus and plays a role in the pathogenesis of several inflammatory and autoimmune diseases. Treg are involved in the feedback control of the immune response and in the return to homeostasis. They are also known to dampen autoreactive responses and may delay the onset and progression of autoimmune disorders²⁷. Reduced Treg count and/or defective suppressor function have been observed in humans displaying several autoimmune diseases such as SSc²⁸. Little is known about the role of Treg in pulmonary diseases, particularly in PAH. Two studies showed an increase in Treg number in peripheral blood in PAH patients²⁹.

³⁰, whereas we recently reported, with more specific markers, that IPAH and PAH-SSc patients display a normal Treg cell count but with an altered function ³¹.

Another key cell type is represented by DC. Their function is not primarily to destroy pathogens but to carry pathogen antigens to peripheral lymphoid organs and present them to T lymphocytes. DC do not only represent simple antigen-presenting cells responsible for the initiation of inflammatory responses, but also key modulators of the whole immune process. In IPAH and in PH animal models, we showed that immature DC accumulate in remodeled pulmonary vessels and hence could be involved in the pathobiology of PAH ¹¹.

In vascular lesions, all effectors of a local immune response are present around the remodeled vessels in patients with IPAH: macrophages, monocytes, mast cells, DC, CD3⁺ T lymphocytes, CD8⁺ cytotoxic T cells, CD4⁺ helper T cells and few CD20⁺ B lymphocytes that could contribute to disease pathobiology ³². It is important to point out that patients with an associated immune disorder present pulmonary lesions that cannot be discriminated from those encountered in patients with IPAH.

We have recently shown that tertiary (ectopic) lymphoid tissues (tLTs) accumulate along the remodeled pulmonary vasculature of IPAH patients, suggesting the presence of local autoimmune responses in IPAH ¹². Lymphoid neogenesis in the target organ is considered to be a major element of autoimmune diseases ³³ and it has been suggested it correlates with local autoantibody production.

Despite increasing clinical evidence, it is still unclear how immune dysregulation could contribute to PAH pathogenesis. According to current knowledge, it is particularly difficult to assess whether altered immune responses represent a cause or an effect of the disease.

3. Contribution of dysregulated immunity to PAH pathogenesis

3.1. Endothelial dysfunction leading to vascular remodeling as the result of altered immunity

Recently, there has been increasing evidence for inflammatory involvement in the initiation of pulmonary vascular remodeling in PH animal models. Transgenic mice overexpressing specifically in the lung the proinflammatory cytokine IL-6 spontaneously develop PH whereas knockout mice for IL-6 are protected against PH^{34, 35}. In a rat model of PH induced by monocrotaline, a number of immunosuppressive and anti-inflammatory approaches have been successful in treating or preventing the development of the disease^{36, 37}.

It has been shown that pulmonary vasculature is sensitive to inflammation and can respond to inflammatory stimuli by abnormal proliferation and/or migration and apoptotic-resistant phenotype³⁸. These aberrant responses can lead to the formation of plexiform lesions characterized by smooth muscle cell hyperplasia, adventitial remodeling and endothelial dysfunction. More generally, in systemic vessels, chronic arteritis, causes intimal thickening, leading to stenosis or occlusion. For example, in giant cell arteritis (GCA), inflammatory infiltrates are located in all three tunics of the arterial wall with giant cells forming granulomas in the media, particularly at the intima–media border (Figure 2). The arterial lumen can be partially or completely occluded due to intimal hyperplasia, fibrosis, stenosis, and thrombus formation (in particular in large vessels such as the aorta and its branches) which lead to ischemic complications commonly observed in GCA. Inappropriate activation, maturation and retention of DC in the adventitia may constitute one of the earliest steps in the pathogenesis of GCA. Subsequent events, such as T cell activation, cytokine secretion and macrophage activation, could be DC-dependent. Thus, an abnormal crosstalk between altered immunity and vascular wall dysfunction may lead to subsequent vessel remodeling³⁹.

It has been shown that pulmonary ECs and SMCs proliferate and/or migrate *in vitro*, in response to proinflammatory cytokines/chemokines and growth factors such as serotonin, platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor-2 (FGF2)^{40,41}. We recently showed that EGF, FGF2 and PDGF signaling pathways converge to p130^{Cas}, an adaptor protein modulating several signaling pathways that controls cell migration and proliferation, which acts as an amplifier of downstream signals⁴². We showed that p130^{Cas} is increased in IPAH (in serum, in human isolated pulmonary arteries and in cultured pulmonary ECs and SMCs) as well as in experimental models of PH. We also reported that p130^{Cas} deficiency by RNA interference causes attenuated ERK 1/2 activation and normalized migration and proliferation of pulmonary SMCs and ECs derived from IPAH⁴².

An important player of the innate immunity is represented by the complement system, constituted by three distinct pathways that all converge to C3 activation. Interestingly, it has been shown that the complement system, in particular C3, plays a role in the development of PH in a mouse model, promoting pulmonary vascular remodeling and a pro-thrombotic phenotype. Furthermore, increased C3 deposition was observed in human lung sections compared to controls⁴³. Since the complement system is a major component of the innate immunity and can be brought into action by the adaptive immune system, these results highlight the possible link between innate and adaptive altered responses in PH pathogenesis.

It has been proposed that antibodies directed to vascular endothelium could promote EC apoptosis, and that endothelium aggression could initiate a dysfunction leading to uncontrolled proliferation⁴⁴. Dib and coworkers were recently able, using a proteomic approach, to identify target antigens for anti-endothelial cell antibodies (AECAs) in IPAH, which include lamin A/C and tubulin β -chain, major components of the inner nuclear membrane and microtubules, respectively²². These proteins identified as targets of AECAs

are ubiquitous and play key roles in different cell types as they are involved in cell metabolism, morphology and protein folding, but the exact role of AECAs in patients with IPAH remains unclear. It is known that AECAs can activate ECs and induce apoptosis in SSc patients⁴⁵, but it needs further investigation in IPAH. Terrier et al. also showed that the target antigens recognized by anti-fibroblast antibodies (AFAs) present in IPAH, are ubiquitous proteins involved in the main cellular systems: regulation of cytoskeletal organization (vimentin, calumenin and phosphatidylinositol 3-kinase), cell contraction (tropomyosin 1), oxidative stress (heat shock protein (HSP)-27, -70 and glucose-6-phosphate dehydrogenase) and protein metabolism²⁴. Of note, although several potentially important target antigens have been identified, the technical approach used does not allow for identifying target antigens at the cell membrane, while such cell membrane targets may be of importance in the immunopathology of PAH. Nevertheless, the identification of target antigens suggests that they may contribute to EC apoptosis and fibroblast dysfunction in IPAH patients. Functional analyses are still needed to better define the potential role of AECAs and AFAs antibodies in IPAH. Recently, the presence of autoantibodies against vascular SMCs has also been demonstrated in IPAH²¹. Interestingly, these antibodies can modulate SMC contraction and they bind mainly to two target antigens involved in vascular remodeling: stress-induced phosphoprotein 1 and α -enolase. Although this is the first evidence of a clear functional role of autoantibodies in IPAH, further investigations are still needed to identify the potential pathogenic contribution of autoantibodies in IPAH.

Among all the autoantibody targets identified, it remains difficult to define which ones are recognized by pathogenic antibodies that would influence vascular dysfunction and/or play a role in remodeling. One may hypothesize that autoantibodies directed against cytoplasmic or nuclear components could emerge following initial EC aggression inducing EC apoptosis and neoantigen exposure. Thus, these autoantibodies argue in favor of humoral

mechanisms in the pathogenesis of PAH. Taken together, these data suggest that altered immunity may initiate and/or contribute to endothelial dysfunction in PAH, leading to pulmonary vascular wall remodeling, the hallmark of the disease.

3.2. Endothelial dysfunction perpetuates altered immune responses

It is also known that genetic predisposition and environmental factors, such as hypoxia, may trigger and/or contribute to endothelial aberrant immune responses. In particular, it has been recently shown that cellular microparticles contribute to the endothelial production of various pro-inflammatory cytokines and chemokines, such as IL-1 β , IL-6 and CCL2, and expression of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and E-selectin⁴⁶. Microparticles are plasma membrane vesicle fragments released from various cell types during activation by agonists or physical or chemical stress. Interestingly, their role is a function of the parent cell they stem from, as well as the stimulus used for their generation. Furthermore, erythrocytes are responsible for pulmonary endothelial proinflammatory transcriptional responses to hypoxia, such as endothelial nuclear factor (NF)- κ B activation and hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α stabilization, leading to upregulation of endothelial leukocyte adhesion receptors, E-selectin and ICAM-1⁴⁷. It is also known that this PAH proinflammatory environment, with increased production of IL-1 and IL-6^{2, 8} represents a favorable condition to activation, proliferation and differentiation of B lymphocytes⁴⁸. Local autoimmunity is also suggested by the presence of mast cells in and around vascular lesions as a source of IL-4 needed for local B cell expansion: this cytokine production represents another important link between innate and adaptive immune responses, within the context of vascular lesions. Mast cells are bone marrow-derived cells which contain large granules rich in histamine and heparin and that are resident in many tissues. These cells are important in hypersensitivity reactions, wound

healing and defense against pathogens. Mast cell accumulation has been described in several types of PAH and animal models^{49, 50}. Our group has recently identified an increase in c-kit-positive cells (including mast cells) in remodeled vessels as well as mobilization of bone marrow-derived circulating progenitor cells⁵¹. How mast cells may contribute to PAH pathophysiology is not clear but proposed mechanisms include direct vasoactive effects and stimulation of remodeling by increased production of matrix metalloproteinases⁵².

Other proofs of altered immune responses in PAH come from the potential role of T lymphocytes, and in particular of Treg, in PAH pathogenesis. Taraseviciene-Stewart and coauthors showed that, in contrast to VEGF receptor blocker SU5416-treated euthymic rats that develop severe PH only in combination with chronic hypoxia, athymic nude rats developed severe PH and pulmonary vascular remodeling at normoxic conditions⁵³. It is therefore legitimate to hypothesize that altered immune responses, may indeed play a role in PAH. Interestingly, Tamosiuniene and coworkers have shown a link between immune dysregulation, due to T cell absence, and vascular injury⁵⁴. They demonstrated that immune reconstitution, performed by injecting intravenously T cells in athymic rats, attenuates early inflammation induced by VEGF receptor 2 inhibitor-dependent vascular injury. These data suggest that in normal conditions, T cells play an important role in protecting against vascular inflammation, secondary to a vascular injury, and possibly in preventing against PAH development.

Thus, identifying the functional status of Treg cells, key players in the autoimmunity onset, could help to better understand the potential mechanisms leading to PAH development and/or progression. As described above, we recently showed that IPAH patients display normal Treg cell count but with an altered function: we demonstrated that Treg cell function is inhibited in a leptin-dependent manner in IPAH³¹. Interestingly, the increased levels of circulating leptin in IPAH are endothelial-derived. These results not only suggest a possible

role for leptin and its receptor in PAH immunopathogenesis, but they highlight the existing link between immune dysregulation and endothelial dysfunction in IPAH.

Conclusion

There is strong evidence that immune dysregulation plays an important role in PAH pathogenesis and progression, promoting inflammatory cell recruitment, stimulating autoantibodies production and triggering vascular wall remodeling, leading to inappropriate interplay between immune system and pulmonary endothelium (Figure 32). Nevertheless, the exact mechanisms are still unclear and several questions remain unanswered. Whether immune dysregulation represents a cause or an effect of PAH onset is still unknown. Although PAH pathogenesis shares several characteristics with systemic autoimmune diseases, why PAH represents a lung-specific disease has not been elucidated yet. This review clearly shows that altered immune responses in PAH represent an important contribution to its pathogenesis. Further studies are clearly needed to assess the inadequate crosstalk between immune mediators and the components of the pulmonary vascular wall. Identification of these factors could lead to novel therapeutical targets. The current PAH therapies are essentially focused on decreasing pulmonary vascular resistance by stimulating pulmonary vasodilation (prostacyclin analogues, phosphodiesterase type 5 inhibitors and endothelin receptor antagonists)⁵⁵. These agents have some anti-remodeling properties but there is no current anti-remodeling strategy approved in PAH⁵⁶. Of note, some hemodynamic and clinical effects of tyrosine kinase inhibitor imatinib have been reported in severe PAH, but at the expense of severe side effects^{57, 58}. Since survival remains poor in the modern management era⁵⁹, new treatments targeting other PAH pathomechanisms would be useful to slow, stop or even reverse disease progression.

Therefore, additional data are needed about novel agents with anti-inflammatory properties and/or drugs that would be able to restore Treg cell function, which could play a positive role in PAH immunopathogenesis.

Acknowledgments: MR Ghigna assisted in preparation of the manuscript.

Funding sources: Dr. Huertas is supported by the *Josso Award* 2010 from the French Medical Research Foundation.

Disclosures: AH, FP, LT, SCK, PD, CG have no disclosure to declare. DM has relationships with drug companies including Actelion, AstraZeneca, Bayer Schering, GSK, Lilly, Novartis and Pfizer. In addition to being an investigator in trials involving these companies, relationships include consultancy service and membership of scientific advisory boards. MH has relationships with drug companies including Actelion, Bayer Schering, GSK, Lilly, Novartis, Pfizer and United Therapeutics. In addition to being an investigator in trials involving these companies, relationships include consultancy service and membership of scientific advisory boards.

References

1. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S43-54
2. Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 1995;151:1628-1631
3. Sanchez O, Marcos E, Perros F, Fadel E, Tu L, Humbert M, Darteville P, Simonneau G, Adnot S, Eddahibi S. Role of endothelium-derived cc chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1041-1047
4. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselini I, Monti G, Balabanian K, Garcia G, Capron F, Coulomb-Lhermine A, Marfaing-Koka A, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Chemokine rantes in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:534-539
5. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, Durand-Gasselini I, Capel F, Bouchet-Delbos L, Portier A, Marfaing-Koka A, Krzysiek R, Rimaniol AC, Simonneau G, Emilie D, Humbert M. Cx(3)c chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002;165:1419-1425
6. El Chami H, Hassoun PM. Immune and inflammatory mechanisms in pulmonary arterial hypertension. *Prog Cardiovasc Dis*. 2012;55:218-228
7. Quarek R, Nawrot T, Meyns B, Delcroix M. C-reactive protein: A new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2009;53:1211-1218
8. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2010;122:920-927
9. Dorfmueller P, Humbert M. Progress in pulmonary arterial hypertension pathology: Relighting a torch inside the tunnel. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:210-212
10. Dorfmueller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2003;22:358-363
11. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselini I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G, Humbert M. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007;29:462-468
12. Perros F, Dorfmueller P, Montani D, Hammad H, Waelput W, Girerd B, Raymond N, Mercier O, Mussot S, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Lambrecht BN. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;185:311-321
13. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tuder RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:261-272
14. Ormiston ML, Chang C, Long LL, Soon E, Jones D, Machado R, Treacy C, Toshner MR, Campbell K, Riding A, Southwood M, Pepke-Zaba J, Exley A, Trembath RC, Colucci F, Wills M, Trowsdale J, Morrell NW. Impaired natural killer cell phenotype

- and function in idiopathic and heritable pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2012;126:1099-1109
15. Perros F, Cohen-Kaminsky S, Gambaryan N, Girerd B, Raymond N, Klingelschmitt I, Huertas A, Mercier O, Fadel E, Simonneau G, Humbert M, Dorfmueller P, Montani D. Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187:189-196
 16. Sanchez O, Sitbon O, Jais X, Simonneau G, Humbert M. Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2006;130:182-189
 17. Jais X, Launay D, Yaici A, Le Pavec J, Tcherakian C, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Immunosuppressive therapy in lupus- and mixed connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension: A retrospective analysis of twenty-three cases. *Arthritis Rheum*. 2008;58:521-531
 18. Montani D, Achouh L, Marcelin AG, Viard JP, Hermine O, Canioni D, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Reversibility of pulmonary arterial hypertension in hiv/hhv8-associated castleman's disease. *Eur Respir J*. 2005;26:969-972
 19. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in france: Results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173:1023-1030
 20. Hachulla E, Gressin V, Guillevin L, Carpentier P, Diot E, Sibilia J, Kahan A, Cabane J, Frances C, Launay D, Mouthon L, Allanore Y, Tiev KP, Clerson P, de Groote P, Humbert M. Early detection of pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis: A french nationwide prospective multicenter study. *Arthritis Rheum*. 2005;52:3792-3800
 21. Bussone G, Tamby MC, Calzas C, Kherbeck N, Sahbatou Y, Sanson C, Ghazal K, Dib H, Weksler BB, Broussard C, Verrecchia F, Yaici A, Witko-Sarsat V, Simonneau G, Guillevin L, Humbert M, Mouthon L. Igg from patients with pulmonary arterial hypertension and/or systemic sclerosis binds to vascular smooth muscle cells and induces cell contraction. *Ann Rheum Dis*. 2012;71:596-605
 22. Dib H, Tamby MC, Bussone G, Regent A, Berezne A, Lafine C, Broussard C, Simonneau G, Guillevin L, Witko-Sarsat V, Humbert M, Mouthon L. Targets of anti-endothelial cell antibodies in pulmonary hypertension and scleroderma. *Eur Respir J*. 2012;39:1405-1414
 23. Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillevin L, Boissier MC, Mouthon L. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2005;60:765-772
 24. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Broussard C, Bussone G, Yaici A, Hotellier F, Simonneau G, Guillevin L, Humbert M, Mouthon L. Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1128-1134
 25. Arends SJ, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, Boomars K, Broers B, Tervaert JW, van Paassen P. Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2010;35:923-925
 26. Karmochkine M, Cacoub P, Dorent R, Laroche P, Nataf P, Piette JC, Boffa MC, Gandjbakhch I. High prevalence of antiphospholipid antibodies in precapillary pulmonary hypertension. *J Rheumatol*. 1996;23:286-290

27. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory t cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7-13
28. Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by cd4+cd25+ regulatory t cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med.* 2004;199:971-979
29. Austin ED, Rock MT, Mosse CA, Vnencak-Jones CL, Yoder SM, Robbins IM, Loyd JE, Meyrick BO. T lymphocyte subset abnormalities in the blood and lung in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2010;104:454-462
30. Ulrich S, Nicolls MR, Tarasviciene L, Speich R, Voelkel N. Increased regulatory and decreased cd8+ cytotoxic t cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration.* 2008;75:272-280
31. Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girend B, Perros F, Montani D, Fabre D, Fadel E, Eddahibi S, Cohen-Kaminsky S, Guignabert C, Humbert M. Leptin and regulatory t-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2012;40:895-904
32. Savai R, Pullamsetti SS, Kolbe J, Bieniek E, Voswinckel R, Fink L, Scheed A, Ritter C, Dahal BK, Vater A, Klusmann S, Ghofrani HA, Weissmann N, Klepetko W, Banat GA, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Immune and inflammatory cell involvement in the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:897-908
33. Aloisi F, Pujol-Borrell R. Lymphoid neogenesis in chronic inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol.* 2006;6:205-217
34. Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, Mark EJ, Hales CA, Waxman AB. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2009;104:236-244, 228p following 244
35. Savale L, Tu L, Rideau D, Izziki M, Maitre B, Adnot S, Eddahibi S. Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res.* 2009;10:6
36. Price LC, Montani D, Tcherakian C, Dorfmueller P, Souza R, Gambaryan N, Chaumais MC, Shao DM, Simonneau G, Howard LS, Adcock IM, Wort SJ, Humbert M, Perros F. Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Eur Respir J.* 2011;37:813-822
37. Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, Arend WP. Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1994;11:664-675
38. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J.* 2012;40:1555-1565
39. Ma-Krupa W, Jeon MS, Spoerl S, Tedder TF, Goronzy JJ, Weyand CM. Activation of arterial wall dendritic cells and breakdown of self-tolerance in giant cell arteritis. *J Exp Med.* 2004;199:173-183
40. Hassoun PM, Mouthon L, Barbera JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:S10-19
41. Tu L, Dewachter L, Gore B, Fadel E, Darteville P, Simonneau G, Humbert M, Eddahibi S, Guignabert C. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes

- to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;45:311-322
42. Tu L, De Man FS, Girerd B, Huertas A, Chaumais MC, Lecerf F, Francois C, Perros F, Dorfmueller P, Fadel E, Montani D, Eddahibi S, Humbert M, Guignabert C. A critical role for p130cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;186:666-676
 43. Bauer EM, Zheng H, Comhair S, Erzurum S, Billiar TR, Bauer PM. Complement c3 deficiency attenuates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *PLoS One.* 2011;6:e28578
 44. Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, Badesch DB, Voelkel NF. Autoimmunity and pulmonary hypertension: A perspective. *Eur Respir J.* 2005;26:1110-1118
 45. Pignone A, Scaletti C, Matucci-Cerinic M, Vazquez-Abad D, Meroni PL, Del Papa N, Falcini F, Generini S, Rothfield N, Cagnoni M. Anti-endothelial cell antibodies in systemic sclerosis: Significant association with vascular involvement and alveolo-capillary impairment. *Clin Exp Rheumatol.* 1998;16:527-532
 46. Amabile N, Guignabert C, Montani D, Yeghiazarians Y, Boulanger CM, Humbert M. Cellular microparticles in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* Published online Dec 20 2012 as doi: 10.1183/09031936.00087212
 47. Huertas A, Das SR, Emin M, Sun L, Rifkind JM, Bhattacharya J, Bhattacharya S. Erythrocytes induce proinflammatory endothelial activation in hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2013;48:78-86
 48. Nurieva RI, Chung Y, Hwang D, Yang XO, Kang HS, Ma L, Wang YH, Watowich SS, Jetten AM, Tian Q, Dong C. Generation of T follicular helper cells is mediated by interleukin-21 but independent of T helper 1, 2, or 17 cell lineages. *Immunity.* 2008;29:138-149
 49. Dahal BK, Kosanovic D, Kaulen C, Cornitescu T, Savai R, Hoffmann J, Reiss I, Ghofrani HA, Weissmann N, Kuebler WM, Seeger W, Grimminger F, Schermuly RT. Involvement of mast cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Respir Res.* 2011;12:60
 50. Mitani Y, Ueda M, Maruyama K, Shimpo H, Kojima A, Matsumura M, Aoki K, Sakurai M. Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax.* 1999;54:88-90
 51. Montani D, Perros F, Gambaryan N, Girerd B, Dorfmueller P, Price LC, Huertas A, Hammad H, Lambrecht B, Simonneau G, Launay JM, Cohen-Kaminsky S, Humbert M. C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;184:116-123
 52. Vajner L, Vytasek R, Lachmanova V, Uhlík J, Konradova V, Novotna J, Hampl V, Herget J. Acute and chronic hypoxia as well as 7-day recovery from chronic hypoxia affects the distribution of pulmonary mast cells and their mmp-13 expression in rats. *Int J Exp Pathol.* 2006;87:383-391
 53. Taraseviciene-Stewart L, Nicolls MR, Kraskauskas D, Scerbavicius R, Burns N, Cool C, Wood K, Parr JE, Boackle SA, Voelkel NF. Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175:1280-1289
 54. Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, Wang L, Sung YK, Gera L, Patterson AJ, Agrawal R, Rabinovitch M, Ambler K, Long CS, Voelkel NF, Nicolls MR. Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res.* 2011;109:867-879

55. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351:1425-1436
56. O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol*. 2011;8:526-538
57. Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galie N, Gomez-Sanchez MA, Grimminger F, Grunig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapson VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani HA. Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: Results of the randomized impres study. *Circulation*. 2013;127:1128-1138
58. Humbert M. Impression, sunset. *Circulation*. 2013;127:1098-1100
59. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza R, Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122:156-163

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review only, and not to be further disclosed.

Figure legends

Figure 1. Inflammation in pulmonary arterial hypertension

A: Representative CD3 immunohistochemistry staining of a human distal remodeled pulmonary artery. **B:** Representative hematoxylin and eosin staining of a distal remodeled pulmonary artery associated with a lymphoid infiltration. **C, D and E:** Representative immunostaining of precapillary pulmonary arteries showing progressive occlusion of the arteries (α -smooth muscle actin⁺ cells in white) associated with arterial infiltration/accumulation of CD11c⁺ dendritic cells (in red) in C; lymphoid neogenesis characterized by periarterial lymphatic dilation (D) and tertiary lymphoid follicle formation (E), associated with c-kit⁺ cells (in green in D and E) possibly supplied by Lyve-1⁺ lymphatic vessels (in red in D and E). Cells were counterstained with DAPI.

Figure 2. Examples of inflammation in systemic arteritis. A: Representative hematoxylin and eosin staining of temporal giant cell arteritis or Horton's disease showing the characteristic granulomatous arteritis with lymphocyte and giant cell infiltration. **B:** Representative hematoxylin and eosin staining of Takayasu arteritis showing the inflammatory pattern of the aorta.

Figure 3. Schematic overview of the crosstalk between immune system cells and pulmonary arterial wall components in pulmonary arterial hypertension pathogenesis.

Abnormal innate, adaptive and/or autoimmune responses can interact with pulmonary arterial wall components, through soluble factors, microparticles and local infiltration, contributing to pulmonary arterial altered functions, leading to endothelial dysfunction, smooth muscle cell hyperplasia and adventitial remodeling. Pulmonary arterial wall

remodeling may also perpetuate altered immune responses through immune cell recruitment and feedback regulation. Environmental factors, such as hypoxia, and genetic predisposition may trigger and/or contribute to immune dysregulation and pulmonary arterial remodeling. All these mechanisms lead to an inappropriate interplay between immune system and pulmonary arterial wall components, in particular the endothelium. Nevertheless, whether immune dysregulation represents a cause or an effect of pulmonary arterial hypertension onset is still unknown. A better understanding of the crosstalk between immune mediators and the components of the pulmonary vascular wall could help to identify novel PAH therapeutical targets.

Disclaimer: The manuscript and its contents are confidential, intended for journal review purposes only, and not to be further disclosed.

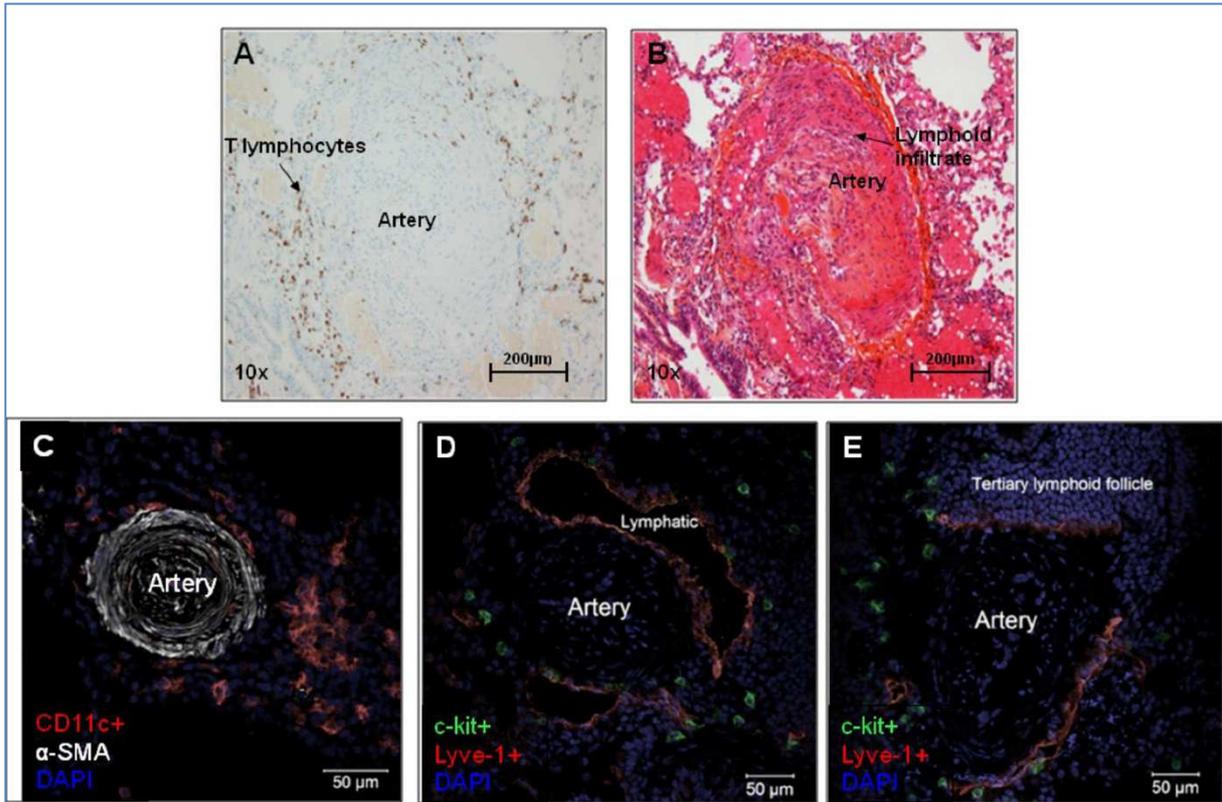


Figure 1

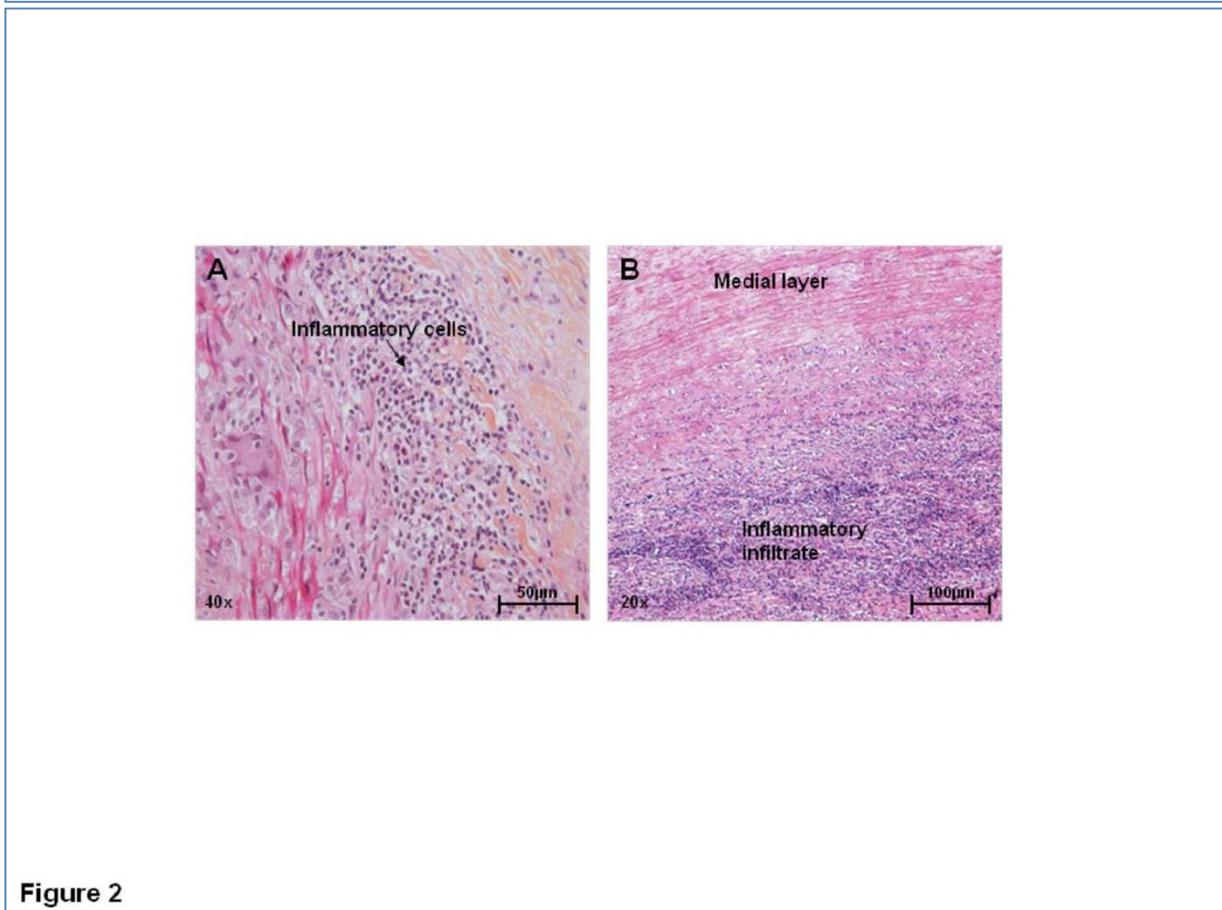
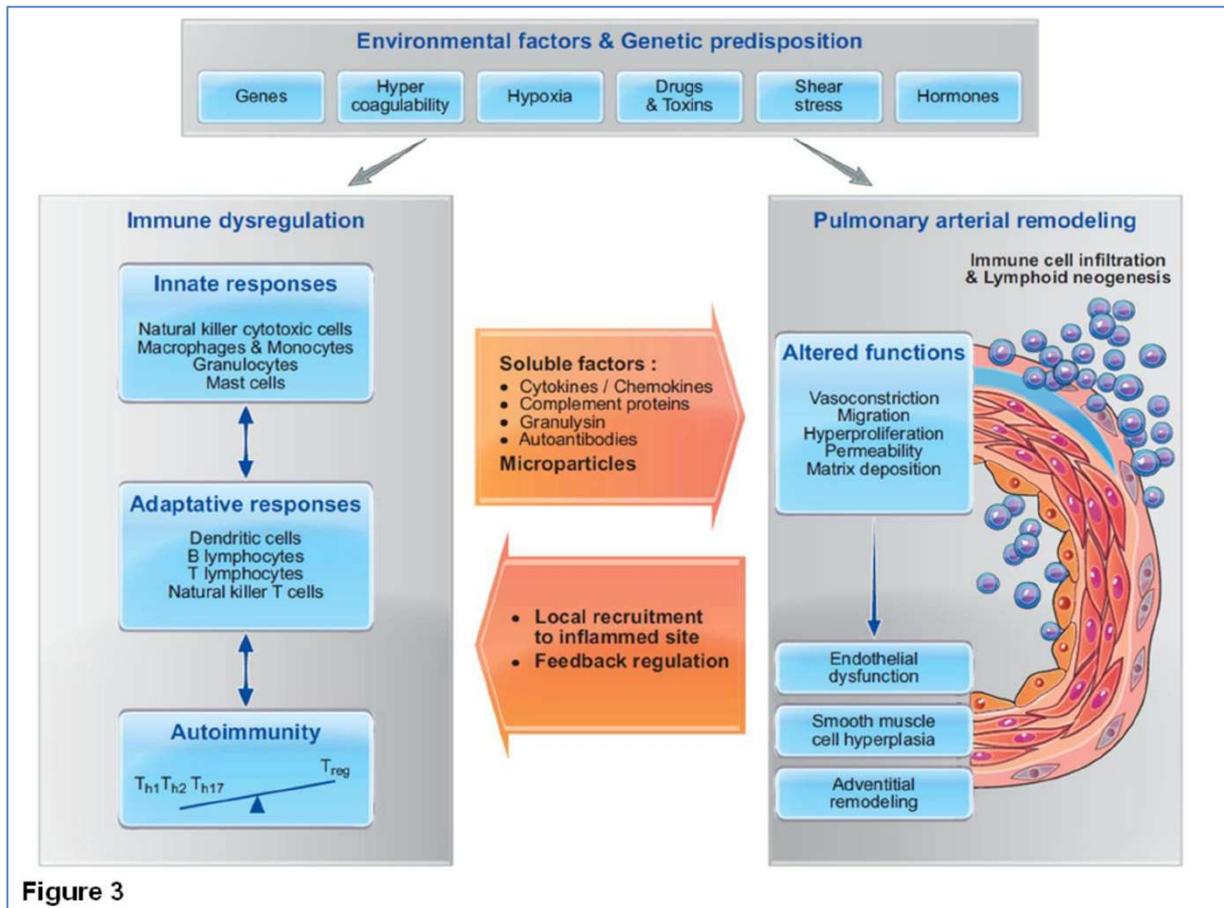


Figure 2



HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS

La communication aberrante entre cellules endothéliales pulmonaires et système immunitaire dans l'HTAP pourrait s'exprimer à deux niveaux : au niveau adaptatif, par une synthèse excessive de leptine de la part de l'endothélium, agissant ainsi sur les Treg ; et au niveau des réponses innées, en participant à la réponse inflammatoire dans l'HTAP.

HYPOTHESE DE TRAVAIL

Malgré les nombreuses évidences montrant une dysfonction immunitaire dans la pathogénèse de l'HTAP, les mécanismes exacts en sont peu connus. En particulier, il n'a pas encore été clairement établi si la dysfonction immunitaire représente une cause ou une conséquence de la maladie. De plus, les liens entre dysfonction endothéliale, facteur clé dans la pathogénèse de l'HTAP, et réponses immunes ne sont pas encore élucidés.

Nous émettons l'hypothèse que l'HTAP est caractérisée par une communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules immunes : la dysfonction endothéliale contribuerait en effet à l'immunopathogénèse de l'HTAP en régulant la fonction d'éléments clés des réponses immunes, adaptatives ou innées.

Une meilleure compréhension de ces mécanismes pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP.

OBJECTIFS DE TRAVAIL

L'objectif de ce travail a donc été d'étudier et mieux comprendre la nature et les conséquences d'une communication aberrante entre cellules endothéliales et système immunitaire dans la pathogénèse de l'HTAP, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous avons analysé **le rôle de la dysfonction endothéliale dans la régulation de deux processus de la dysfonction immunitaire : la régulation des Treg et de l'autoimmunité pour la réponse adaptative d'une part, et le développement d'un phénotype proinflammatoire en ce qui concerne la réponse innée d'autre part.**

AXES DE TRAVAIL

Ce travail s'est articulé autour de trois axes :

- 1. Etude des lymphocytes T régulateurs dans l'HTAP (1^{er} Travail)**
- 2. Etude de la contribution de l'endothélium à l'autoimmunité dans l'HTAP : mécanismes de contrôle des lymphocytes T régulateurs et identification de cibles thérapeutiques (2^{ème} Travail)**
- 3. Etude de la contribution de l'endothélium à la réponse innée dans l'HTAP : phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium sous contrôle de MIF circulant (3^{ème} Travail)**

MATERIELS ET METHODES

A. PRELEVEMENTS HUMAINS

1. Prélèvements sanguins

Les prélèvements sanguins effectués dans le cadre de ces travaux sont constitués de prélèvements de sang périphérique, pour l'étude des cellules mononuclées circulantes (PBMC : peripheral blood mononuclear cells) ainsi que pour l'obtention de sérum et de plasma.

Un consentement libre et éclairé est obtenu des sujets participant à ces études avant tout prélèvement. Les sujets en examen sont des patients atteints d'HTAP idiopathique ou d'HTAP associée à la sclérodermie et des sujets témoins. Les prélèvements sont effectués dans le cadre d'un suivi habituel chez les patients et au sein des donneurs de l'Etablissement Français du Sang (EFS) pour les témoins. Cette étude a été approuvée par le Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France).

2. Echantillons pulmonaires

Les prélèvements pulmonaires humains étudiés dans le présent travail incluent les tissus pulmonaires collectés lors de transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire de patients HTAP. Le tissu contrôle provient de biopsies pulmonaires effectuées lors d'intervention chirurgicale de pneumothorax, ou à distance des lésions lors de l'ablation de tumeurs pulmonaires localisées. Chez ces patients, des mesures écho-cardiographiques préopératoires ont été réalisées pour éliminer toute suspicion d'HTAP. Les prélèvements ont été obtenus au centre chirurgical Marie Lannelongue sont stockés dans la tissuthèque « HTAPthèque » gérée par le service d'anatomo-pathologie sous la responsabilité du Pr Marc Humbert. Afin de garantir l'intégrité nucléaire, protéique et morphologique des tissus utilisés, les poumons explantés par le chirurgien sont traités rapidement et stérilement. Les blocs de tissu pulmonaire ainsi obtenus servent en partie à isoler des cellules ou sont en partie stockés -80°C jusqu'à leur utilisation. Les études réalisées sur ces prélèvements ont reçu l'approbation du Comité de Protection des Personnes (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France). Un consentement libre et éclairé est obtenu des patients ou de leur famille, avant chaque prélèvement opéré à des fins de recherche médicale.

2.1. Isolement de cellules endothéliales micro-vasculaires

L'isolement des CE micro-vasculaires pulmonaires se fait en deux étapes : une dissociation tissulaire par une digestion enzymatique puis une sélection spécifique par un anticorps monoclonal anti-CD31 humain couplé sur à des billes ferromagnétiques. Brièvement, un parenchyme pulmonaire dépourvu de sa plèvre est mis en digestion. La suspension est ensuite filtrée et cultivée dans une boîte de pétrie préalablement coâtée avec 0,1% gélatine, avec du milieu complet : milieu MCDB-131, L-Glutamine, Héparine, Pénicilline/Streptomycine, Fungizone, Hepes, 10% sérum du veau foetal décomplémenté, 10 g/ml VEGF et 1 g/mL ECGS. Après 48h, une purification immunomagnétique des CE est réalisée avec des billes ferromagnétiques couplées avec un anticorps anti-CD31.

Afin d'évaluer et de caractériser les cultures primaires ainsi obtenues, les CE pulmonaires sont marquées sélectivement par incorporation de la lipoprotéine acétylée de basse densité couplée à une sonde carbocyanine fluorescente (Dil-Ac-LDL). Parallèlement, un co-marquage est effectué avec Ulex europaeus agglutinine-1 (UAE-1, Sigma Aldrich, France), une lectine conjuguée au FITC qui reconnaît spécifiquement un récepteur endothélial. L'évaluation de la pureté de nos cultures est effectuée à l'aide du rapport nombre de cellules positives au Dil-Ac-LDL divisé par le nombre total de cellules. Les cellules utilisées dans nos expériences sont positives au Dil-Ac-LDL à 97%. Les contaminants cellulaires observés ont le plus souvent une forme cellulaire proche des cellules mésenchymateuses.

2.2. Isolement de cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

La mise en culture des CML d'artères pulmonaires se fait par la technique d'explant à partir des artères pulmonaires obtenues lors de la chirurgie. Brièvement, les artères pulmonaires (3 à 5mm de diamètre) sont prélevées lors de la chirurgie. La couche adventitielle résiduelle est éliminée. La zone médiale, ainsi disséquée, est mise en culture dans une boîte de Pétri avec un milieu DMEM supplémenté de 1% de L-glutamine, 1% de pénicilline/streptomycine, 1% d'amphotéricine, de l'Hepes, 0.5% d'insuline, d'EGF et 15% de sérum de veau foetal décomplémenté. Les CML prolifèrent après 2 semaines puis elles sont trypsinées et amplifiées.

Pour caractériser les cultures primaires de CML d'artères pulmonaires obtenues, les cellules de chaque culture sont évaluées quant à leur expression en protéines du cytosquelette et en protéines responsables du phénotype contractile spécifique du muscle lisse, incluant l' α -smooth muscle actin (SMA), la desmine et la vinculine en utilisant un marquage immun-fluorescent.

B. MODELES EXPERIMENTAUX

Les études sur les animaux ont été approuvées par le comité d'éthique n°26 de l'Université Paris Sud, France.

1. Hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique chez le rat

Le modèle expérimental utilisé dans ce travail est le modèle d'HTP induite chez le rat par l'exposition à l'hypoxie normobare (FiO₂ 10%). Des groupes randomisés d'animaux sont placés en hypoxie pendant 21 jours alors les groupes témoins sont placés en normoxie (FiO₂ 21%) durant la même période. Trois types de rats Sprague-Dawley ont été utilisés dans cette étude (*Charles River Laboratories*): sauvages, déficients en récepteur de la leptine (ZDF, Zucker Diabetic Fatty, *ZDF/Lepr fa/fa*) ainsi que leur contrôle (*ZDF/Lean +/-*), âgés de 4 semaines.

2. Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat

Des rats de la souche Wistar âgés de 4 semaines (100-120g) ont été utilisés dans notre troisième étude (*Laboratoires Janvier*), suivant le protocole de l'HTP induite par l'injection de monocrotaline (60mg/kg) décrit dans la *section B* de ce chapitre.

3. Mesures hémodynamiques chez le rat

Les paramètres hémodynamiques mesurés comprennent la pression artérielle pulmonaire, la pression systolique du ventricule droit et le débit cardiaque. Les rats sont mis sous anesthésie gazeuse à l'isofurane (2-3 % isoflurane 3L/min O₂). L'animal est placé sur un tapis chauffant thermostaté (37°C) et sa température corporelle est surveillée en permanence. La veine jugulaire droite est disséquée et un cathéter polyvinyle 24 gauges est introduit pour atteindre le ventricule droit puis l'artère pulmonaire. Le débit cardiaque est

mesuré grâce à un procédé de thermodilution. Une sonde thermique est introduite via la carotide pour atteindre le cœur gauche. Cette sonde permet de mesurer la baisse de température apportée par l'injection d'une solution de sérum physiologique froide via la veine jugulaire. Les données sont intégrées à l'appareil PowerLab 4/35 (ADInstruments Limited, Oxford, Royaume-Unis) et sont analysées avec le logiciel LabChart Pro.

L'évaluation de l'HTP se fait sur trois critères indissociables :

- L'étude des paramètres hémodynamiques avec les mesures de pression artérielle pulmonaire moyenne et systolique du ventricule droit ;
- La quantification de l'hypertrophie ventriculaire droite avec le calcul de l'index cardiaque Fulton (rapport du poids du ventricule droit sur le poids du ventricule gauche + septum) ;
- L'étude histologique des coupes de poumon avec la quantification de la muscularisation des artères pulmonaires distales d'un diamètre inférieur à 200 μm .

4. Traitements

Deux groupes de rats sauvages ont été traités par dichloroacetate (DCA, 1g/L), diluée dans l'eau buvable, en traitement curatif pendant l'exposition à l'hypoxie chronique ou à la normoxie, de J7 à J21.

C. CYTOMETRIE EN FLUX

1. Principes de cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique qui consiste à faire défiler très rapidement (plusieurs milliers par seconde) les unes derrière les autres, des cellules en suspension monocellulaire devant un faisceau laser. Pour chaque cellule, sont mesurées très précisément : la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes (7 signaux de fluorescence analysés simultanément) et la lumière diffusée, recueillie dans 2 directions différentes (l'une peut être corrélée avec la taille, *Forward scatter* ou (FSC), et la seconde avec la réfringence et la granulosité de la cellule, *Side scatter* ou (SSC). L'appareil peut ainsi analyser les cellules selon plusieurs paramètres, et définir des "sous populations" homogènes pour les regrouper selon des critères choisis. Pour chaque sous population on peut calculer l'effectif, le

pourcentage qu'il représente par rapport à la population totale, la moyenne de chacun des paramètres ou encore les écarts standards.

Les résultats obtenus par cytométrie en flux sont exprimés en nombre absolu (nombre des cellules par mL du sang total), en pourcentage de cellules positives ou en intensité relative de fluorescence (MFI, Mean Fluorescence Intensity). Les cellules sont analysées sur le cymomètre MACSCount (Miltenyi Biotec) et analysées à l'aide de logiciel FlowJo (Tree Star Inc.). Un minimum de 200 000 événements a été collecté lors de chaque analyse.

Les populations lymphocytaires et monocytaires sont repérées en fonction de la taille et de la granulosité. Une fenêtre prenant en compte uniquement ces populations, est dessinée afin d'éliminer les débris cellulaires, les doublets de cellules et les cellules mortes ou apoptotiques.

2. Isolement des lymphocytes

Les lymphocytes circulants sont obtenus après isolement des cellules mononucléaires circulant dans le sang périphérique par la technique de séparation de gradients FICOLL. Le phénotypage des cellules Treg est effectué, chez l'homme, grâce aux marqueurs spécifiques de surface CD4 et CD25 et CD127 par cytométrie de flux. Les cellules CD4⁺CD25⁺CD127^{low} sont définies Treg (Liu *et al.* 2006). Chez le rat, les Treg sont identifiés grâce à la positivité des marqueurs de surface CD4 et CD25 et à l'expression intracellulaire de FoxP3 (CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺).

3. Analyse spécifique par immunofluorescence

Des marquages spécifiques, obtenus grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes, ont été effectués sur les PBMC et analysés en cytométrie en flux. Les anticorps utilisés dans cette étude sont des anticorps dirigés contre pSTAT3, Ob, ObR, IL-10, LAP (pro-TGF-β).

D. ETUDE DE L'EXPRESSION GENIQUE

L'expression génique est effectuée par la PCR quantitative en temps réel avec la technologie « Taqman » sur l'appareil StepOne Plus (Applied Biosystems).

1. Principe de la PCR Quantitative

Le principe de cette technique repose sur la fonction exonucléase 5'→3' de la Taq-polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique de la séquence amplifiée, placée entre les deux primers. La sonde est marquée en 5' par un fluorophore appelé «reporter» et en 3' par un autre type de fluorochrome appelé «quencher». Le spectre d'émission du reporter chevauche le spectre d'excitation du quencher. L'émission du reporter est atténuée ou «quenchée» par la proximité du quencher. Si la sonde est dégradée par l'activité exonucléase de la Taq, les fluorophores ne seront plus reliés entre eux et l'émission du reporter est alors détectable. L'augmentation du signal correspondant à l'émission du fluorophore reporter est proportionnelle au nombre de copies polymérisées à chaque cycle de la PCR.

2. Extraction d'ARNm et rétro-transcription

L'extraction d'ARNm s'effectue sur les tissus de poumons ou sur les cellules isolées à l'aide de kits en colonne de la société Qiagen. Brièvement, l'échantillon est lysé dans un tampon puis les acides ribonucléiques sont précipités à l'aide d'une solution d'alcool. Les ARN totaux sont filtrés puis élués. Pour vérifier leur intégrité, une migration sur gel d'agarose est réalisée. Les quantifications d'ARN sont faites par spectrométrie en UV sur le Nanodrop. Les échantillons dont le ratio 230/260nm est inférieur à 1,8 sont éliminés puis ré-extraient. Une quantité de 2 µg d'ARN est utilisée par la conversion d'ARN en ADN complémentaire (ADNc).

3. PCR et quantification

L'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée selon la méthode relative du $\Delta\Delta Ct$. Le 18S a été utilisé comme contrôle interne dans chaque réaction de PCR. Le gène cible normalisé par rapport au 18S correspond à ΔCt (Ct du gène d'intérêt – Ct du 18S). La différence d'expression de chaque échantillon est donné par la différence $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt de l'échantillon – ΔCt d'un échantillon de référence) Enfin, la quantité relative de chaque échantillon est donnée par l'équation $2(-\Delta\Delta Ct)$. La PCR est réalisée en duplicata avec 10ng d'ADNc et en duplex.

E. ETUDE DE L'EXPRESSION PROTEIQUE

L'évaluation des protéines d'intérêt se fait principalement par la technique du Western blot. Les culots cellulaires ou pulmonaires ont été lysés et homogénéisés dans un tampon composé d'antiprotéases et d'antiphosphatases. Après détermination de la concentration protéique par la technique de Bradford, 50µg de chaque échantillon sont déposés dans un gel *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide* (SDS-PAGE) pour une séparation protéique par électrophorèse en fonction de la taille. Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane nitrocellulose, ce qui est suivi d'une étape de saturation avec une solution composée de 5% de lait dilué dans du *Tween-Tris Buffered Saline* (TTBS) pendant 1 heure. La révélation des protéines d'intérêt est réalisée par l'exposition aux anticorps primaires spécifiques de celle-ci pendant une nuit au froid. Des anticorps secondaires adéquats, couplés à l'enzyme *horseradish peroxidase* (HRP), sont ensuite utilisés pendant 1 heure. Après lavage, les membranes sont révélées avec un système de chimioluminescence ECL (GE Healthcare, Vélizy, France) grâce à l'appareil ChemiDoc™ XRS System (Bio-rad, Marnes-la-coquette, France) pour détecter les signaux. L'intensité des bandes est quantifiée à l'aide du logiciel ImageLab (Bio-rad). Les résultats pour chaque protéine d'intérêt sont présentés sous forme de rapports calculés en fonction de la protéine de ménage β -actine.

F. IMMUNOMARQUAGE

Les poumons sont inflatés par une solution de formalin *via* la trachée et incubés dans cette même solution pendant 24 heures. Ils sont ensuite déshydratés dans des solutions d'alcool successives puis inclus en paraffine selon une méthode standard. Des coupes histologiques de 5µm d'épaisseur sont réalisées puis colorées pour une étude histologique standard ou utilisées pour les immunomarquages.

1. Marquages immunohistochimiques

Les marquages de protéines pulmonaires sont effectués en colorimétrie à partir des coupes paraffinées de 5 µm. Les lames sont d'abord déparaffinées puis réhydratées. Le démasquage d'antigènes se fait à l'aide de tampon citrate chauffé au bain à 95°C. L'activité de la peroxydase endogène est bloquée par de l'eau oxygénée à 3%. Les anticorps sont

exposés au tissu après une étape de saturation au BSA 5%. Les anticorps secondaires couplés à la peroxydase sont utilisés pour la révélation avec le DAB. Les lames sont ensuite contre-colorées avec l'hématoxyline de Mayer avant d'être montées.

2. Marquages immunofluorescents

Les marquages immunofluorescents se font également sur des lames paraffinées de 5 μm . Brièvement, les lames sont déparaffinées, réhydratées puis les antigènes sont démasqués avec le tampon citrate. Les anticorps sont exposés au tissu pendant une nuit après la saturation au BSA 5%. Ces marquages sont réalisés pour un antigène cible en parallèle d'un anticorps anti-vWF ou anti-CD31 qui permet de localiser l'endothélium. Après lavages, des anticorps secondaires couplés à différents fluorochromes sont utilisés pour reconnaître la protéine cible ainsi que le vWF ou anti-CD31. La lame est montée avec une solution de DAPI pour localiser les noyaux cellulaires. Les observations sont faites en microscopie confocale (Zeiss LSM700, Zeiss, Le Pecq, France).

3. Marquages immunocytologiques

Les CML ou CE sont ensemencées avec un milieu complet sur des lames en verre pré-coatées à la gélatine. Après 10 minutes de fixation avec du méthanol froid, les cellules sont perméabilisées au triton 1%, puis saturées à la BSA 5% avant d'être exposées aux différents anticorps pendant une nuit. Ensuite, différents anticorps secondaires fluorescents sont utilisés respectivement contre les anticorps primaires. Un montage avec du DAPI est effectué avant les observations au microscope confocal ZEISS LSM700.

G. ETUDE DE PROLIFERATION CELLULAIRE

1. Evaluation de la prolifération par l'incorporation de BrdU

Cette technique évalue la quantité de Bromodeoxyurédine (BrdU) qui est incorporée par la cellule lors de la synthèse d'ADN génomique en cas de prolifération. Brièvement, les cellules sont ensemencées à une même densité en plaques 96 puits. Après une nuit, les cellules sont synchronisées puis stimulées à différentes conditions avec du milieu contenant

du BrdU. Les cellules sont ensuite fixées et perméabilisées après une stimulation de 24 heures puis immuno-marquées à l'aide d'un anticorps anti-BrdU couplé à un fluorochrome Europium. Une mesure de l'intensité de la fluorescence est faite sur l'appareil Envision (Perkin Elmer).

2. Evaluation par comptage cellulaire

Parallèlement à la méthode de la prolifération par l'incorporation de BrdU, une évaluation par comptage cellulaire est également effectuée. Les cellules sontensemencées dans des puits de diamètre de 24 mm à 10 000 cellules par puits. Après 24 heures, les cellules sont stimulées à différentes conditions. Après 48 heures, les cellules sont trypsinées puis comptées à l'aide des lames de Malassez.

H. TRANSFECTION CELLULAIRE

Afin de réduire l'expression d'une protéine spécifique, nous avons utilisé la technique de siRNA. Il s'agit d'une petite séquence oligonucléique d'une vingtaine de base simple brin capable de se lier à une séquence d'ARNm et d'empêcher ainsi sa traduction.

Dans nos études, les siRNA ont été transfectés dans nos cellules à l'aide d'un liposome commercial Lipofectamine RNAiMax (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Parallèlement à des siRNA de gènes cibles, un siRNA-contrôle a été également utilisé. Les cellules transfectées sont utilisées dans les 3 jours. Des Western blot sont effectués pour vérifier et quantifier l'absence de ces protéines.

I. ETUDE LA MIGRATION CELLULAIRE

Pour étudier la migration cellulaire en réponse à un facteur chémoattractif, des chambres de Boyden ont été utilisées. Ceci consiste à mesurer le passage de la cellule de la surface de la membrane à la phase inférieure de celle-ci composée de pores de 8µm de diamètre. Brièvement, une même densité de cellules est mise en culture sur une membrane préalablement coatée à la gélatine. Après l'adhésion des cellules (une nuit d'incubation) à la surface de la membrane, des facteurs étudiés sont placés dans la partie inférieure de la

chambre pendant 6 heures. En réponse ou non à ces facteurs, les cellules vont alors migrer plus ou moins vite à travers cette membrane. Le comptage cellulaire après une coloration Hématoxyline Eosine (HE) permet de quantifier le chimiotactisme de chacun des facteurs étudiés.

J. DOSAGES IMMUNO-ENZYMATIQUES

Pour mesurer les protéines circulantes au niveau des surnageants cellulaires ou au niveau sérique, la technique ELISA a été utilisée avec des kits fournis par R&D systems. Les sérums sont recueillis et conservés à -80°C. Les surnageants de culture ont été obtenus à partir des cultures cellulairesensemencés à 300 000 cellules/10 cm² avec 1 mL de milieu adapté pendant 24 heures.

K. ANALYSES STATISQUES

Les résultats sont exprimés par la moyenne +/- SEM (somme des écarts à la moyenne). La différence entre deux groupe est déterminée par le test t de Student pour des valeurs appariées ou non-appariées. Dans le cas de multiples comparaisons de moyennes, une analyse de variance (*ANOVA*) a été utilisée, suivi d'une comparaison post hoc en utilisant la correction de Bonferonni. Une valeur de $P < 0.05$ est considérée comme statistiquement significative.

TRAVAUX

Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension

European Respiratory Journal 2012; 40: 895–904

Alice Huertas, Ly Tu, Natalia Gambaryan, Barbara Girerd, Frédéric Perros, David Montani, Dominique Fabre, Elie Fadel, Saadia Eddahibi, Sylvia Cohen-Kaminsky, Christophe Guignabert and Marc Humbert

Contexte scientifique

Il a été démontré que la leptine, dont l'expression est régulée par des médiateurs de l'inflammation et/ou de la réponse immune, favorise le développement de nombreuses maladies autoimmunes en contrôlant les lymphocytes T régulateurs (Treg). Ces derniers aident à prévenir l'activité des cellules de l'immunité et à réprimer l'induction et la progression de maladies autoimmunes. Dans ces maladies, la leptinémie corrèle de façon significative avec le pourcentage de Treg circulants qui sont moins nombreux et/ou dysfonctionnant.

D'autre part, en plus d'une importante dysfonction endothéliale, plusieurs arguments sont également en faveur d'une hypothèse de désordres immunologiques, voire autoimmuns, dans la pathogénèse de l'HTAP idiopathique (HTAPi), mais les mécanismes en sont peu connus.

Hypothèse

Nous avons testé l'hypothèse, dans ce premier travail, que la leptine puisse contribuer à la pathogénèse de l'HTAP idiopathique, en régulant le statut fonctionnel des Treg. De plus, nous avons également évalué si l'endothélium pulmonaire pouvait représenter une source de sécrétion de leptine.

Résultats

Nous avons tout d'abord mis en évidence que les patients HTAPi présentent des taux circulants de leptine anormalement élevés et une surexpression du récepteur de la leptine ObR à la surface des Treg, au même niveau que les patients atteints d'HTAP associée à une

sclérodermie (HTAP-SSc). De plus, bien que représentés en nombre normal, les Treg des patients HTAPi, ainsi qu'HTAP-SSc, présentent une activité réduite, mesurée par l'activité de la voie de signalisation STAT3. Ces résultats diffèrent significativement des sujets témoins pris en examen. Enfin, en utilisant des cellules endothéliales isolées d'échantillons pulmonaires humains HTAPi et témoins, nous avons pu mettre en évidence, pour la première fois, que les cellules endothéliales représentent une source locale importante de leptine chez les patients HTAPi.

Conclusions

Dans ce premier travail, nos résultats suggèrent que la leptine et son récepteur ObR soient impliqués dans la pathogénèse de l'HTAP idiopathique. En effet, nous avons pu mettre en évidence, chez les patients atteints d'HTAPi, que la fonction altérée des Treg dépend de la leptine d'origine endothéliale. La voie de la leptine pourrait donc représenter de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP idiopathique.



Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension

Alice Huertas, Ly Tu, Natalia Gambaryan, Barbara Girerd, Frédéric Perros, David Montani, Dominique Fabre, Elie Fadel, Saadia Eddahibi, Sylvia Cohen-Kaminsky, Christophe Guignabert and Marc Humbert

ABSTRACT: Immune mechanisms and autoimmunity seem to play a significant role in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) pathogenesis and/or progression, but the pathophysiology is still unclear. Recent evidence has demonstrated a detrimental involvement of leptin in promoting various autoimmune diseases by controlling regulatory T-lymphocytes. Despite this knowledge, the role of leptin in IPAH is currently unknown. We hypothesised that leptin, synthesised by dysfunctional pulmonary endothelium, might play a role in the immunopathogenesis of IPAH by regulating circulating regulatory T-lymphocytes function.

First, we collected serum and regulatory T-lymphocytes from controls, and IPAH and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH) patients; secondly, we recovered tissue samples and cultured endothelial cells after either surgery or transplantation in controls and IPAH patients, respectively.

Our findings indicate that serum leptin was higher in IPAH and SSc-PAH patients than controls. Circulating regulatory T-lymphocyte numbers were comparable in all groups, and the percentage of those expressing leptin receptor was higher in IPAH and SSc-PAH compared with controls, whereas their function was reduced in IPAH and SSc-PAH patients compared with controls, in a leptin-dependent manner. Furthermore, endothelial cells from IPAH patients synthesised more leptin than controls.

Our data suggest that endothelial-derived leptin may play a role in the immunopathogenesis of IPAH.

KEYWORDS: Dysimmunity, endothelial dysfunction, leptin, pulmonary arterial hypertension, regulatory T-lymphocytes

Idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) corresponds to pre-capillary pulmonary hypertension in which there is neither a family history of the disease nor an identified risk factor and is defined as a resting mean pulmonary arterial pressures ≥ 25 mmHg with a normal pulmonary artery wedge pressure ≤ 15 mmHg [1]. Although the pathophysiology of IPAH has been extensively studied in the past few decades and several new pathways have been identified, the aetiology of this disease is still not clearly understood. It is now well established that inflammation plays an important role in IPAH [2–6], and increasing data also support the hypothesis that immunological disorders could be present in IPAH patients: circulating autoantibodies have been detected [7, 8] and recent evidence indicates that regulatory T-cells (Tregs) could play a role in pulmonary arterial hypertension (PAH)

[9]. Despite these findings, little is known about the exact role of inflammation and dysimmunity in the development of IPAH and it remains unclear how immune mechanisms contribute to the pathogenesis of IPAH.

Recent evidence has demonstrated a detrimental involvement of leptin, a cytokine-like hormone mainly secreted by adipocytes, in promoting the pathogenesis of various autoimmune diseases [10, 11]. Although leptin, the product of the obese (*ob*) human gene, has been discovered as the appetite regulator, it regulates a wide range of physiological functions [10–13]. Interestingly, it has also been shown that leptin can promote chronic autoimmune disorders by regulating Treg onset and/or function [14]. Intriguingly, little is known about the pulmonary effects of leptin, and, in particular, its inflammatory and/or immunological role in IPAH.

AFFILIATIONS

Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Le Kremlin-Bicêtre; Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, AP-HP, Le Kremlin-Bicêtre; and INSERM U999 Hypertension Artérielle Pulmonaire, Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, LabEX LERMIT Laboratory of Excellence in Research on Medication and Innovative Therapeutics (LERMIT), Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

CORRESPONDENCE

M. Humbert
Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire
Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère
Hôpital Bicêtre
Hôpitaux Universitaires Paris-Sud
Assistance Publique Hôpitaux de Paris
78 rue du Général Leclerc
94270
Le Kremlin-Bicêtre
France
E-mail: marc.humbert@bct.aphp.fr

Received:

Sept 14 2011

Accepted after revision:

Feb 06 2012

First published online:

Feb 23 2012

European Respiratory Journal
Print ISSN 0903-1936
Online ISSN 1399-3003

This article has supplementary material available from www.erj.ersjournals.com



Tregs are T-lymphocytes known to dampen autoreactive responses and are able to delay the onset and progression of autoimmune disorders: reduced frequency of Tregs and/or defective suppressor function have been observed in these diseases [14, 15]. So far, little is known about the role of leptin in the lung and, in particular, about its effects on the pulmonary blood vessels.

IPAH is characterised by small-sized pulmonary arteries/arterioles in which there is intimal hyperplasia with medial and adventitial hypertrophy, hyperplasia and fibrosis. Cells from the vessel wall are known to play an important role in the pathogenesis of IPAH. In particular, pulmonary endothelial cells (P-ECs) represent a critical cell type. Endothelial dysfunction is characterised by an altered vasoconstriction/vasodilation balance and disorganised pro-proliferative and apoptotic-resistant phenotype that can lead to the formation of plexiform lesions mostly described in IPAH patients [16].

We hypothesised that leptin, synthesised by dysfunctional P-ECs, might play a role in the immunopathology of IPAH by regulating circulating Treg function. We addressed this issue using freshly recovered circulating Tregs from IPAH patients. Our findings indicate that Treg function is reduced in IPAH patients compared with controls in a leptin-dependent manner. Furthermore, using cultured cells recovered after lung transplantation in IPAH patients, we demonstrated that there is a major increase in leptin synthesis from IPAH P-EC compared with controls. Taken together, our data suggest that leptin could derive from endothelial cells and may play a role in the immunopathogenesis and/or progression of IPAH.

METHODS

Subjects

Blood samples were collected in patients with IPAH and in scleroderma (SSc)-associated PAH during usual follow-up and in control subjects (table 1). All patients were treated with PAH-specific treatments. Inclusion criteria were aged >18 yrs and PAH diagnosis confirmed by right heart catheterisation with a stable clinical and haemodynamic status for the last 3 months. Exclusion criteria were a heritable form of PAH, anaemia, thyroid dysfunction, diabetes, metabolic syndrome, and immunosuppressive or corticosteroid therapies in the last 6 months for SSc-PAH. Characteristics at diagnosis and follow-up were stored in the Registry of the French Network of Pulmonary Hypertension set up in agreement with French bioethics laws (Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés), and all patients gave their written informed consent.

Leptin, leptin receptor and pro-inflammatory measurements

Serum samples were collected and stored at -80°C. For the measurement of leptin, C-reactive protein (CRP), tumour necrosis factor (TNF)- α , monocyte chemoattractant protein (MCP)-1, interleukin (IL)-6 and -1 β , human AlphaLISA (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) or ELISAs (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) kits were used accordingly to manufacturer's instructions. Circulating soluble leptin receptor (sObR) levels were measured using ELISAs (as recommended by the manufacturer, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

TABLE 1 Anthropometric and haemodynamic characteristics

	Controls	IPAH	SSc-PAH
Subjects n	20	25	11
Females/males	12/8 (0.66)	20/5 (0.25)	9/2 (0.22)
Age yrs	38 \pm 3*	52 \pm 3	68 \pm 3*
BMI kg·m⁻²	25 \pm 1	26 \pm 1	27 \pm 1
NYHA class	NA	II–III	II–IV
Mean P_{pa} mmHg	NA	45 \pm 3	41 \pm 4
P_{pcw} mmHg	NA	8 \pm 1	9 \pm 1
PVR Wood units	NA	7 \pm 1	7 \pm 1
Cardiac output L·min⁻¹	NA	5.8 \pm 0.3	5.5 \pm 0.6
Cardiac index L·min⁻¹·m⁻²	NA	3.0 \pm 0.2	3.0 \pm 0.3
6MWT distance m	NA	459 \pm 21	314 \pm 44*
BNP ng·mL⁻¹	NA	103 \pm 28	250 \pm 92
CRP mg·L⁻¹	0.05 \pm 0.003	0.05 \pm 0.002	0.04 \pm 0.005
TNF-α pg·mL⁻¹	0.5 \pm 0.4	4.2 \pm 2.0	2.2 \pm 2
MCP-1 pg·mL⁻¹	273 \pm 19*	682 \pm 158	460 \pm 42
IL-6 pg·mL⁻¹	1 \pm 0.4*	25 \pm 9	8 \pm 2
IL-1β pg·mL⁻¹	0.01 \pm 0.01*	32 \pm 8	17 \pm 12
PAH-specific treatment n	NA		
ERA		11	3
PDE-5i		0	1
ERA+PDE-5i		8	4
ERA+PGI ₂		2	0
PDE-5i+PGI ₂		2	0
ERA+PDE-5i+PGI ₂		2	3
No treatment		0	0

Data are presented as n/n (%) or mean \pm so, unless otherwise stated. IPAH: idiopathic pulmonary arterial hypertension; SSc-PAH: scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension; BMI: body mass index; NYHA: New York Heart Association; P_{pa}: pulmonary artery pressure; P_{pcw}: pulmonary capillary wedge pressure; PVR: pulmonary vascular resistance; 6MWT: 6-min walk test; BNP: brain natriuretic peptide; CRP: C-reactive protein; TNF: tumour necrosis factor; MCP: monocyte chemoattractant protein; IL: interleukin; ERA: endothelin receptor antagonist; PDE-5i: phosphodiesterase type-5 inhibitor; PGI₂: prostacyclin (prostaglandin I₂); NA: not applicable. *: p<0.05 between controls versus IPAH and versus SSc-PAH patients; *: p<0.05 between IPAH and SSc-PAH patients.

Flow cytometry analysis

After blood samples were taken, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from IPAH and SSc-PAH patients, and controls were obtained by standard Ficoll gradient centrifugation. The cells were carefully washed with PBS and resuspended in a staining buffer containing 10% human serum. The cells were then fluorescently labelled with the following monoclonal antibodies: anti-CD4 conjugated with either Alexa 488 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) or Pacific Blue (BioLegend, San Diego, CA, USA); anti-CD25 conjugated with Alexa 647 (BioLegend); anti-CD127 conjugated with peridinin-chlorophyll protein-Cy5.5 (Becton Dickinson); and anti-FoxP3 conjugated with Pacific blue (BioLegend), under either nonpermeabilised or permeabilised conditions (IntraPrep, following manufacturer's instructions, Beckman Coulter, Brea, CA, USA) to enable either surface or intracellular staining, respectively. Flow cytometry gating conditions and the mean fluorescence intensity were set

and normalised, respectively, against isotype- and fluorophore-matched nonimmune immunoglobulin G.

It is now well known that CD127 expression inversely correlates with FoxP3 activation [17]. To test whether Treg analysis and cell count were similar using these different markers, we randomly selected five subjects from each group and compared the two "Treg phenotypes", *i.e.* CD4⁺CD25⁺CD127^{low}FoxP3⁺ and CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (the subgroup characteristics are presented as online supplementary data and results are shown in figures 1–4). The cell count was similar for each of these two different surface markers (fig. 4c and table 2). Based on these preliminary tests and to preserve the intracellular space, we avoided PBMCs and defined Treg as CD4⁺CD25⁺CD127^{low} (fig. 3a). Treg cell count was expressed as the percentage of total CD4⁺ cells.

In order to evaluate the ObR expression, PBMCs were also stained under nonpermeabilised conditions with a monoclonal antibody against ObR fluorescently conjugated with phycoerythrin (R&D Systems). Tregs expressing ObR were defined as CD4⁺CD25⁺CD127^{low}ObR⁺ and were quantified as the percentage of CD4⁺CD25⁺CD127^{low} cells.

To determine the functional status of the Tregs expressing ObR, we stained them under permeabilised conditions with a monoclonal antibody against phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) conjugated with Alexa 488 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA).

To assess the effect of leptin on Treg functional status, we stimulated freshly isolated PBMCs from healthy controls with recombinant human leptin at a concentration of 250 ng·mL⁻¹ for 5 min (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) [18]. Then, we stained and analysed the Tregs and pSTAT3 as described above.

Flow cytometry data were acquired with a flow cytometer (MACSQuant, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) and analysed by FlowJo software program (Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA).

Human pulmonary tissues and immunohistostaining

Lung specimens were obtained at the time of lung transplantation from patients with IPAH (n=10), at the Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson, France. Control lung specimens were obtained from patients without any evidence of pulmonary vascular disease who underwent lobectomy or pneumonectomy

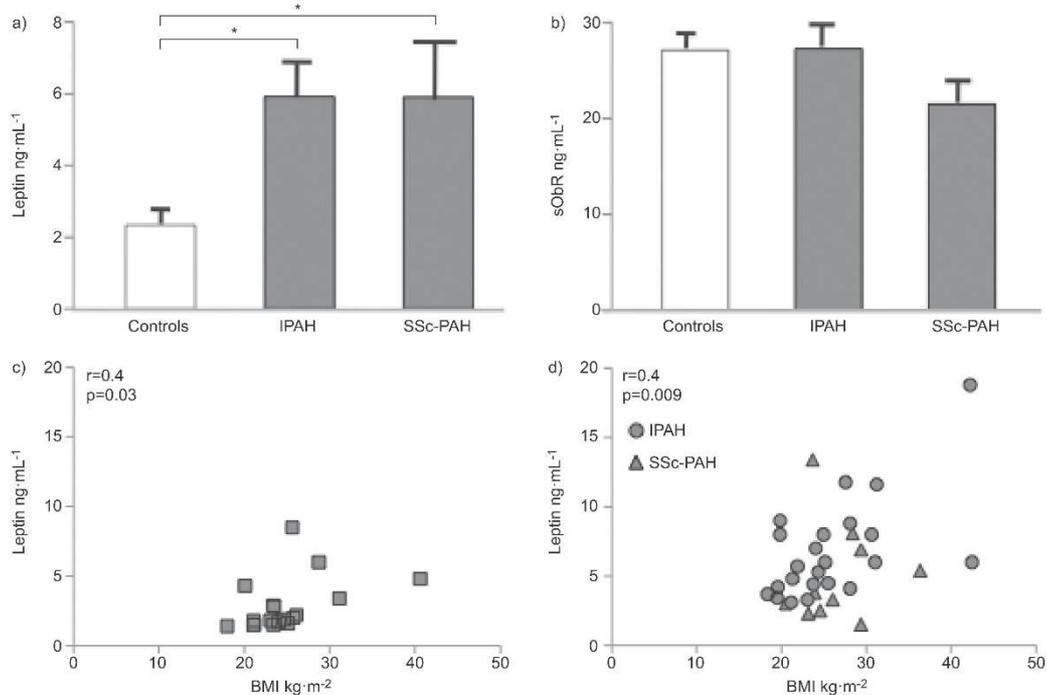


FIGURE 1. Leptin measurements. a) Group data of leptin measurement in serum from controls (n=20), idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH, n=25) and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH, n=11) patients. *: $p < 0.05$ between controls versus IPAH and versus SSc-PAH patients. b) Group data of circulating soluble leptin receptor (sObR) measurement in serum from controls (n=20), IPAH (n=25) and SSc-PAH (n=11) patients. a) and b) Data are presented as mean \pm SEM. Correlation between c) serum leptin and body mass index (BMI) in controls and d) serum leptin and BMI in patients considered as a unique group.

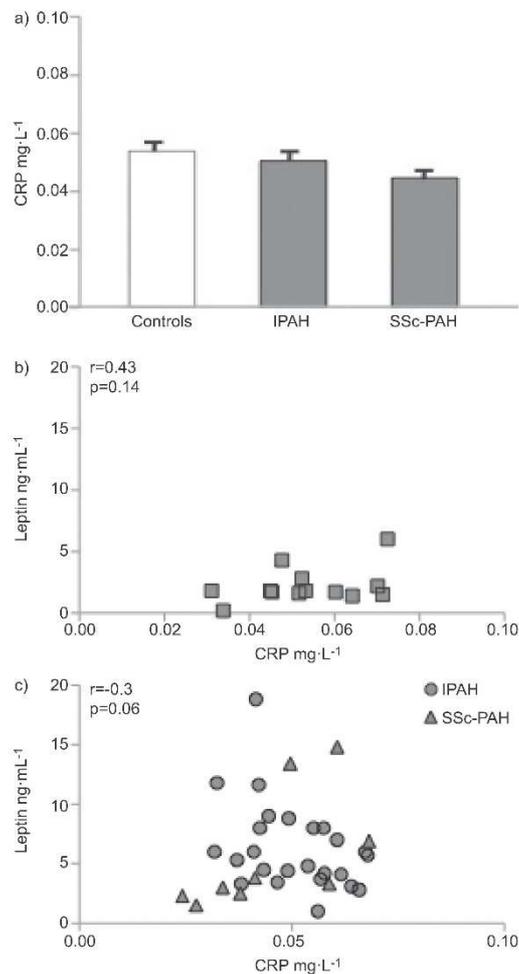


FIGURE 2. C-reactive protein (CRP) measurements. a) Group data of CRP measurement in serum from controls (n=20), idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH, n=25) and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH, n=11) patients. Data are presented as mean \pm SEM. Correlation between b) CRP and serum leptin in controls and c) CRP and serum leptin in patients considered as a unique group.

for localised lung cancer (n=15). Lung specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 5- μ m sections were dewaxed and rehydrated progressively. Citrate buffer (pH 6) was used for antigen retrieval, and endogenous peroxidase was quenched with hydrogen peroxide. Sections were blocked with 5% bovine serum albumin and incubated overnight with the following antibodies: polyclonal antibody against leptin (dilution 1/100; Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA, USA) and monoclonal antibody against leptin

receptor (dilution 1/50; R&D Systems). Biotin-streptavidin-peroxidase systems, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) substrate was used for revelation (Universal LSAB HRP Kit; Dako, Trappes, France). Nuclei were counterstained with haematoxylin and mounted. Controls used for these antibodies included omission of the primary antibody and substitution of the primary antibody by an isotype control.

Endothelial cell isolation and leptin measurement

Human microvascular P-ECs isolated from lung tissue fragments using immunomagnetic purification were cultured as previously described [19]. To quantify leptin in conditioned media, the isolated cells were seeded on six-well plates at a density of 1×10^5 cells per well. After 24 h, cells were washed twice with PBS then incubated for 24 h in serum-free MCDB131 (without the addition of growth factors). Leptin was measured in conditioned media using ELISAs (as recommended by the manufacturer; R&D Systems).

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm SEM. A $p < 0.05$ level of statistical significance was used for all analyses. The Shapiro-Wilk test was used to ensure that data had a normal distribution. All between-groups comparisons were assessed using one-way ANOVA; *post hoc* analysis of significant variables was performed using Tukey's test with all pairwise multiple comparisons. Differences between two selected groups (controls and IPAH) were compared using unpaired t-test. Pearson correlations were used to establish associations between the dependent variables (*i.e.* leptin and ObR expression on Tregs) and relevant independent variables. All statistical procedures were carried out using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTS

Leptin and pro-inflammatory cytokines serum concentration

To investigate the role of leptin in PAH pathogenesis, we first quantified serum leptin concentration and found that both IPAH and SSc-PAH patients had a significantly higher leptinaemia than controls. No difference was found between IPAH and SSc-PAH (fig. 1a and table 2).

In order to compare the relative free leptin index and the leptin bioavailability in these three groups of subjects, we measured sObR levels. We found a similar level in the three groups without any statistically significant difference (fig. 1b and table 2). These data indicate that circulating active leptin levels are increased in both IPAH and SSc-PAH. Correlations between serum leptin levels and body mass index (BMI) in controls and PAH patients are shown in figures 1c and d. Furthermore, no correlation was found between circulating leptin levels and disease severity expressed as haemodynamic and/or functional parameters. As leptin has been shown to act as a key player in inflammatory conditions, we tested whether serum leptin concentration in PAH correlated with serum pro-inflammatory cytokines. CRP and TNF- α concentrations were normal in all groups, without any statistically significant difference among the groups (fig. 2a and table 1). MCP-1 and IL-6 and -1 β were significantly increased in IPAH and SSc-PAH patients compared with controls (table 1). Furthermore, there was no correlation between the pro-inflammatory cytokines and leptin levels (figs 2b and c).

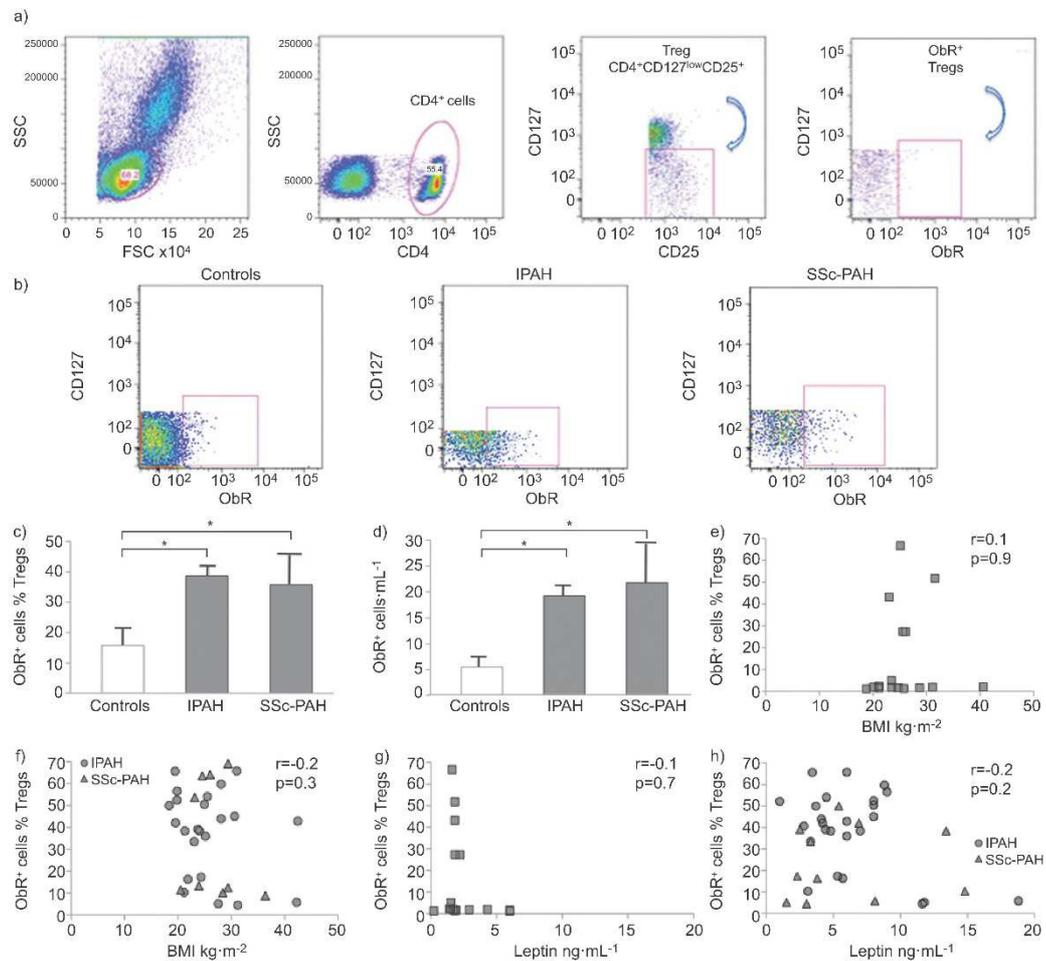


FIGURE 3. Leptin receptor (ObR) expression. a) Single fluorescence-activated cell sorter (FACS) dot plots representing an example of phenotype strategy by using surface stainings analysed by flow cytometry in a control subject. b) Single FACS dot plot representing ObR⁺ regulatory T-lymphocytes (Tregs) in control subjects and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH) patients. SSC: side scatter, FSC: forward scatter. Group data of ObR expression on circulating Tregs, expressed as c) a percentage of the total Treg population and d) absolute numbers, in control subjects (n=20), and IPAH (n=25) and SSc-PAH (n=11) patients. Data are presented as mean \pm SEM. *: p<0.05 between controls versus IPAH and versus SSc-PAH patients. Correlation between ObR⁺ Tregs and body mass index (BMI) in e) controls, and f) patients considered as a unique group. Correlation between ObR⁺ Tregs and serum leptin in g) controls and h) patients considered as a unique group.

These data indicate that in PAH patients, in IPAH and in SSc-PAH, serum leptin levels are increased independently of pro-inflammatory cytokines.

ObR expression on Treg cell membrane

As our findings indicated a possible role of leptin in PAH pathogenesis, we analysed the expression of its receptor ObR on Tregs. After withdrawing peripheral venous blood samples

from controls and PAH patients, we first selected Tregs among the fluorescently tagged PBMCs by flow cytometry analysis.

We selected Tregs and analysed the expression of ObR on their membranes (fig. 3a). Flow cytometry analysis revealed that ObR expression was markedly increased in PAH patients, as compared with controls (figs 3b and c and table 2), either when expressed as percentage of Tregs (fig 3c and table 2), or

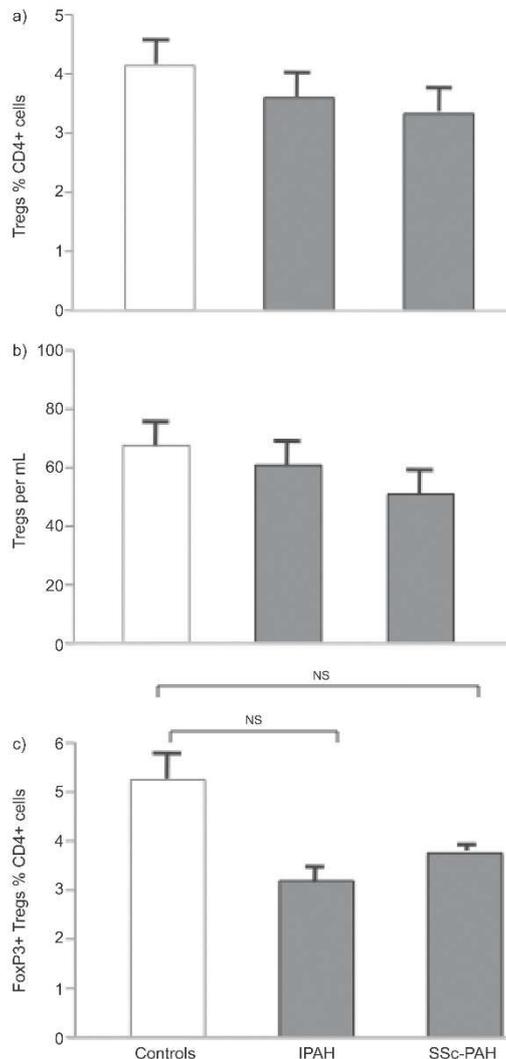


FIGURE 4. Regulatory T-lymphocytes (Tregs). a) Group data of circulating Tregs cell count, expressed as percentage of the total CD4⁺ population, in control subjects (n=20), and in idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH, n=25) and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH, n=11) patients. b) Group data of circulating Treg cell count, expressed as absolute numbers, in control subjects (n=20), IPAH (n=25) and SSc-PAH (n=11) patients. c) Group data of circulating Treg cell count, defined as CD4⁺CD25⁺CD127⁺FoxP3⁺ and expressed as percentage of the total CD4⁺ population in control subjects (n=5), IPAH (n=5) and SSc-PAH (n=5) patients. Data are presented as mean ± SEM. NS: nonsignificant.

TABLE 2 Regulatory T-lymphocytes (Tregs), leptin receptor and serum leptin data

	Controls	IPAH	SSc-PAH
Treg % CD4 ⁺ cells	4 ± 0.5	4 ± 0.4	3 ± 0.4
Treg per mL	67 ± 8	61 ± 8	51 ± 9
FoxP3 ⁺ Treg % CD4 ⁺ cells	5 ± 0.8	3 ± 0.4	4 ± 0.2
ObR % Treg	16 ± 5*	39 ± 4	36 ± 9
ObR per mL	6 ± 2*	19 ± 2	22 ± 8
ObR MFI	378 ± 46	313 ± 58	466 ± 21
pSTAT3 % ObR ⁺ Treg	8 ± 1.6*	4 ± 0.5	4 ± 0.6
pSTAT3 MFI	1090 ± 72	1152 ± 58	1134 ± 46
Leptin ng·mL ⁻¹	2 ± 0.3*	6 ± 0.9	6 ± 1.4
Circulating ObR ng·mL ⁻¹	27 ± 1	27 ± 2	22 ± 2

Data are presented as mean ± SEM. IPAH: idiopathic pulmonary arterial hypertension; SSc-PAH: scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension; FoxP3: forkhead box P3; ObR: leptin receptor; MFI: mean fluorescence intensity; pSTAT3: phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; sObR: soluble leptin receptor. *: p < 0.05 between controls versus IPAH and versus SSc-PAH patients.

as absolute numbers (fig 3d and table 2). ObR expression was similar in IPAH and SSc-PAH. Interestingly, the expression of ObR on Tregs cell membranes did not correlate with BMI or serum leptin levels (figs 3e–h).

Taken together, these findings demonstrate that ObR expression is markedly increased in IPAH patients compared with controls and to a similar extent as in SSc-PAH. Interestingly, the level of ObR expression is independent of the patients' BMI or serum leptin levels.

Circulating Treg levels

To further explore the role of leptin on Tregs in PAH, we first examined the Treg cell count. Flow cytometry analysis revealed a normal Treg cell count in all groups. We expressed the Tregs as percentage of CD4⁺ cells as well as in absolute numbers and also found a normal Treg count (figs 4a and b and table 2). These data indicate that leptin does not seem to influence Treg numbers in PAH patients.

Functional status of Tregs

Our next objective was to determine the extent to which leptin could play a role on Treg function. As a readout of ObR activity, we measured pSTAT3 amounts, because STAT3 is known to participate in the intracellular signalling pathways of ObR [11]. After Treg permeabilisation, we quantified pSTAT3 by flow cytometry (fig. 5a). Interestingly, the number of pSTAT3⁺ Tregs was markedly decreased in PAH patients compared with controls, and similarly in IPAH and SSc-PAH (figs 5b and c and table 2). In order to further investigate the relationship between leptin and Treg function, we stimulated freshly isolated PBMCs from healthy controls with recombinant leptin, we stained them as described above and measured pSTAT3 by flow cytometry. pSTAT3⁺ Tregs were significantly decreased when stimulated by leptin, clearly showing a leptin-dependent effect on Treg functional status (fig. 5d). Taking

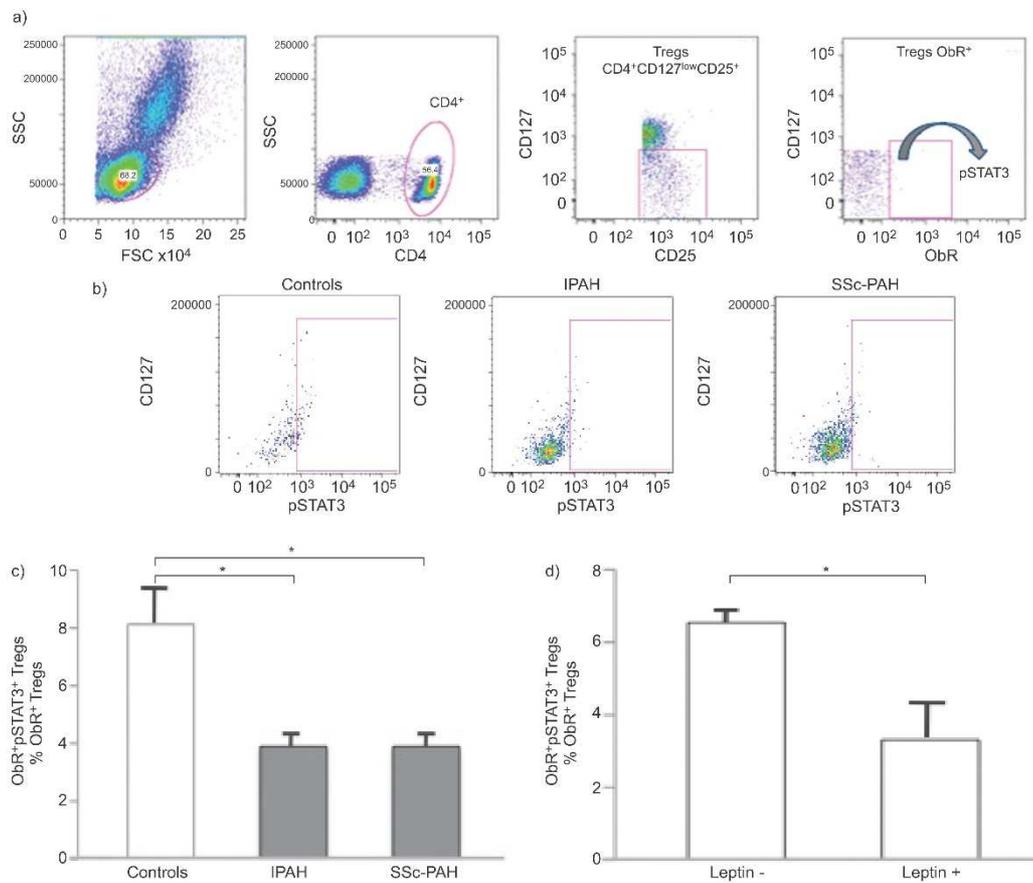


FIGURE 5. Functional status of regulatory T-lymphocytes (Tregs) expressing leptin receptor (ObR). a) Single fluorescence-activated cell sorter (FACS) dot plots representing an example of staining strategy by using surface markers to phenotype Tregs and intracellular staining with anti-phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (pSTAT3) antibody, analysed by flow cytometry in a control subject. b) Single FACS dot plot representing pSTAT3 in ObR⁺ Tregs in control subjects, idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) and scleroderma-associated pulmonary arterial hypertension (SSc-PAH) patients. SSC: side scatter; FSC: forward scatter. c) Group data of ObR⁺ pSTAT3⁺ Tregs, expressed as percentage of the total ObR⁺ Treg population, in control subjects (n=20), and IPAH (n=25) and SSc-PAH (n=11) patients. *: p<0.05 between controls versus IPAH and versus SSc-PAH patients. d) Group data of ObR⁺ pSTAT3⁺ Tregs, expressed as percentage of the total ObR⁺ Treg population in control subjects peripheral blood mononuclear cells (n=3) after stimulation with or without leptin. *: p<0.05. c) and d) Data are presented as mean±SEM.

these results together, we hypothesise that leptin regulates Tregs in PAH by inhibiting them through ObR binding.

Leptin secretion by endothelial cells

Leptin has recently been detected in lung tissue [20]. As our findings suggested a mechanistic role for leptin in Treg functional regulation and P-ECs represent a critical cell type in IPAH patients [16], our next aim was to investigate whether P-ECs could represent one of the sources of leptin in PAH. To test this hypothesis, after exclusion of inflammatory mechanisms as a source of leptin (figs 2b and c), we performed immunohistochemistry on lung specimens from controls and IPAH

patients, and we stained them for leptin and ObR. A more intense immunoreactivity was noted for leptin in the endothelium of distal pulmonary arterial walls in IPAH patients versus controls. In contrast, no significant changes in ObR were found between IPAH patients and control. Therefore, we assessed that P-ECs are an important source of leptin in the lung. To further assess whether the synthesis and the release of leptin by P-ECs were increased in PAH, we isolated microvascular P-EC from lung specimens from IPAH patients and from controls. We measured the amount of leptin protein in the cell supernatant and found a significant increase in leptin in IPAH patients compared with controls (fig. 6). These findings indicate that

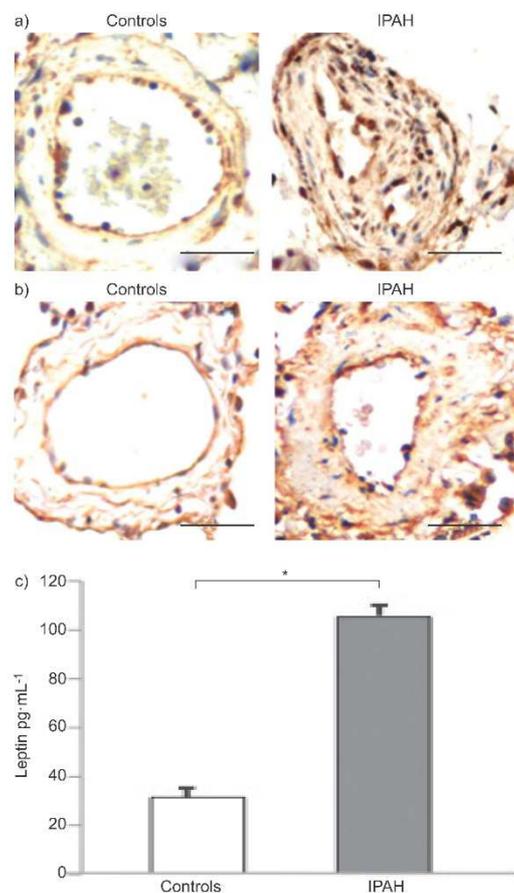


FIGURE 6. Leptin production by human pulmonary endothelial cells. a) Staining for leptin in lung specimens in a representative pulmonary artery from controls and idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) patients. b) Staining for leptin receptor in lung specimens in a representative pulmonary artery from controls and IPAH patients. Scale bars=50 μ m. c) Group data of leptin production by human pulmonary endothelial cells, in control subjects (n=15) and in IPAH patients (n=10). Data are presented as mean \pm SEM. *: p<0.05 between controls versus IPAH patients.

P-ECs contribute to the increased secretion of leptin measured in IPAH patients.

DISCUSSION

One of the central unanswered questions in PAH pathogenesis relates to the role of inflammation and dysimmunity in the development and/or progression of IPAH. It remains unclear how immune mechanisms contribute to the pathogenesis of IPAH. We approached this question by determining the role of leptin and endothelial dysfunction in circulating Treg regulation. Our data suggest, to the best of our knowledge, for the

first time, that leptin may play a role in the immunopathogenesis of IPAH by inhibiting Treg function through its receptor upregulation on circulating Treg surfaces. Furthermore, we also show, using P-ECs isolated from PAH patients and lung tissues, that P-ECs could represent one of the sources of leptin.

Leptin, Treg function and ObR expression upregulation

Despite strong evidence for the role of leptin in autoimmunity, the precise mechanism of its activity is still controversial. Much of the difficulty relies on the highly pleiotropic activities of leptin on both the neuroendocrine and immune systems. In the immune system, leptin can directly affect the activity of numerous immune cell types of both the innate and the adaptive systems. A critical protective role for Tregs in several autoimmune diseases is now well established [14, 15, 17], but it is still controversial whether leptin induces Treg anergy and/or hyporesponsiveness in autoimmune diseases. In order to identify Tregs by flow cytometry, we have chosen to use surface markers because recent studies have indicated that, in humans, expression of endogenous forkhead box P3 (FoxP3) is not sufficient to induce Treg activity or to identify Tregs [21, 22].

In this study, we have established a unique link between leptin and Tregs in PAH by showing that leptin can modulate the hyporesponsiveness of Tregs *in vivo*. Freshly isolated Tregs from PAH patients display higher expression of ObR on their surface compared with healthy controls. At the molecular level, circulating PAH Tregs express low levels of pSTAT3, which represents the major signalling pathway in Tregs. In contrast, the number of circulating Tregs is in the normal range and it is similar in PAH patients and controls. Interestingly, these results were similar in the two major PAH subgroups tested, IPAH and SSC-PAH, in which there is an established associated immunological disorder. Furthermore, when stimulated by recombinant leptin, Tregs express lower levels of pSTAT3, clearly indicating a direct effect of leptin on Treg functional status. It appears that, in PAH, leptin controls Treg function rather than controlling the numbers of Tregs that could participate in the immunopathogenesis of PAH.

Leptin and inflammation

Leptin production is not only regulated by food intake, but also by various hormones, as well as by several inflammatory mediators, both in humans and in experimental models [10, 11]. The pro-inflammatory properties of leptin are similar to those of other acute-phase reactants. Generally, leptin increases during the course of acute infection, sepsis and inflammation [10, 11]. It is now clear that inflammation plays an important role in PAH pathogenesis. Conversely, some studies have suggested an association between leptin levels and inflammatory markers, such as soluble TNF receptors or CRP [23]; this has not been confirmed by others [24]. We approached this controversial question by measuring serum pro-inflammatory cytokine levels in PAH and controls. Conversely to recent data published by QUARCK *et al.* [25], we found normal levels of CRP without any difference within the groups. We confirmed our previous data showing an increase in IL-6 and -1 β , and normal levels of TNF- α in PAH patients [2]. We showed no correlation between leptin levels and inflammatory markers. It is noteworthy that patients did not receive therapies susceptible to decrease inflammatory markers, such as statins, and there was no active systemic

disease in the patients with SSc-PAH that we studied, as shown by the lack of steroid and/or immunosuppressant therapy at the time of SSc-PAH management, and the normal CRP levels measured in these subjects. This suggests that in the PAH patients we studied, increased levels of leptin were not linked to markers of systemic inflammation.

P-ECs as a source of leptin?

Leptin expression and secretion are constitutive in adipocytes and, at first, were thought to be restricted only to this tissue; however, recent reports have demonstrated that leptin is also produced at low levels by other tissues [26]. Interestingly, it has been shown that another important source of leptin is the Tregs themselves, which both secrete leptin and express leptin receptor [10]. Thus, leptin can mediate a negative autocrine loop in Tregs, which can promote the onset and/or the progression of autoimmune diseases [22]. Theoretically, the blockade of leptin by antagonists, antibodies or soluble receptors should inhibit leptin bioavailability and reduce its effects. So far, this has been shown in animal models with experimental conditions [10]. In humans, leptin administration does not efficiently improve immune function in the normal or obese individual but only in individuals with congenital leptin deficiency and lipodystrophy [27]. The question of the existence of another source of leptin involved in the immune regulation in humans remains unanswered. Endothelial dysfunction represents one the major cellular PAH characteristics that could contribute to increased leptin secretion [3]. By using P-ECs isolated from PAH and lung specimens, we show here, for the first time, that PAH pulmonary endothelial cells produce more leptin than controls. This can explain, at least in part, the increased serum leptin levels in PAH patients compared with controls, despite the normal number of Tregs. Further studies are needed to confirm that endothelial cells represent the source of leptin and the role of leptin in Tregs in PAH.

Conclusions

In conclusion, our findings address a central unanswered question in PAH pathogenesis, namely that relating to the role of dysimmunity in the development and/or progression of IPAH. Our evidence that leptin and endothelial cells play a determining role in the regulation of Tregs in IPAH reveals a previously unknown mechanism in IPAH immunopathogenesis that can contribute to the onset and/or progression of the disease. Our findings indicate for the first time that leptin must be considered as a mediator of immunological disorders in IPAH.

SUPPORT STATEMENT

A. Huertas is supported by the Josso Award 2010 from the French Medical Research Foundation. B. Girerd is funded by the Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (PHRC NCT01600898).

STATEMENT OF INTEREST

Statements of interest for D. Montani and M. Humbert can be found at www.erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml

REFERENCES

- Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54: Suppl. 1, S43–S54.
- Humbert M, Monti G, Brenot F, *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151: 1628–1631.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, *et al.* Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: Suppl. 12, 13S–24S.
- Perros F, Dorfmüller P, Souza R, *et al.* Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007; 29: 462–468.
- Dorfmüller P, Perros F, Balabanian K, *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003; 22: 358–363.
- Tuder RM, Groves B, Badesch DB, *et al.* Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144: 275–285.
- Tamby MC, Chaneaud Y, Humbert M, *et al.* Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2005; 60: 765–772.
- Terrier B, Tamby MC, Camoin L, *et al.* Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177: 1128–1133.
- Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, *et al.* Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res* 2011; 109: 867–879.
- Lam QL, Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 2007; 4: 1–13.
- La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 371–379.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, *et al.* Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998; 394: 897–901.
- Lam QL, Liu S, Cao X, *et al.* Involvement of leptin signaling in the survival and maturation of bone marrow-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2006; 36: 3118–3130.
- Matarese G, Carrieri PB, La Cava A, *et al.* Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 5150–5155.
- Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11: 7–13.
- Cool CD, Stewart JS, Wehara P, *et al.* Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1999; 155: 411–419.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203: 1701–1711.
- De Rosa V, Proccaccini C, Cali G, *et al.* A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation. *Immunity* 2007; 26: 241–255.
- Tu L, Dewachter L, Gore B, *et al.* Autocrine FGF2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45: 311–322.
- Bellmeyer A, Martino JM, Chandel NS, *et al.* Leptin resistance protects mice from hyperoxia-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175: 587–594.
- Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, *et al.* Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 6659–6664.
- Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EI, *et al.* Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007; 37: 129–138.
- Shamsuzzaman AS, Winnicki M, Wolk R, *et al.* Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans. *Circulation* 2004; 109: 2181–2185.

- 24 Gomez-Ambrosi J, Salvador J, Silva C, *et al.* Leptin therapy does not affect inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3803.
- 25 Quarck R, Nawrot T, Meyns B, *et al.* C-reactive protein: a new predictor of adverse outcome in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 53: 1211–1218.
- 26 Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116: 337–350.
- 27 Farooqi IS, Matarese G, Lord GM, *et al.* Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *J Clin Invest* 2002; 110: 1093–1103.

Leptin inhibition attenuates regulatory T lymphocyte impairment and prevents experimental pulmonary hypertension

en soumission

Alice Huertas, Ly Tu, Morane Le Hiress, Nicolas Ricard, Raphaël Thuillet, Carole Phan, Elie Fadel, Sophie Nadaud, Marc Humbert and Christophe Guignabert

Contexte scientifique

De nombreuses évidences montrent une dysfonction du système immunitaire, voire le développement d'une autoimmunité, dans la pathogénèse de l'HTAP mais les mécanismes à l'origine de cette dysfonction ne sont pas clairement élucidés. Nous avons précédemment montré, dans notre premier travail, que l'endothélium était capable d'inhiber les Treg, à travers la sécrétion anormalement élevée de leptine, dans l'HTAP. Cependant, l'importance de ce relargage endothélial anormalement élevé de leptine sur la susceptibilité et la progression de la maladie n'est pas connu.

Hypothèse

Nous avons testé l'hypothèse que l'inhibition de la voie de la leptine puisse ralentir et/ou faire régresser l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique, en normalisant la fonction des Treg.

Résultats

Dans un premier temps, nous avons pu clairement analyser le statut autoimmun et montré l'atteinte fonctionnelle des Treg dans une population de patients HTAP (n=20) et contrôle (n=20). Dans la population Treg, une franche diminution de l'activité STAT3 et de la présence de proTGF- β ont pu être observée. Nous avons également finement détaillé l'importance de la voie de la leptine et de son récepteur ObR sur l'activité STAT3 de Treg humains à différentes doses et temps d'incubation. Dans un deuxième temps, l'utilisation de rats transgéniques déficients en récepteur de la leptine (*ZDF/Lepr fa/fa*) d'une part, et des

rats sauvages (*ZDF/Lean +/-*) d'autre part, nous ont permis de mettre en évidence que l'axe leptine/ObR joue un rôle important dans la susceptibilité au développement de l'HTP induite par l'hypoxie chronique. De plus, nous avons pu clairement montrer que la synthèse endothéliale de leptine était HIF-1 dépendante dans les CE pulmonaires en culture. Enfin, nous avons pu mettre en évidence que les effets bénéfiques d'un traitement, le dichloroacétate (DCA), contre l'HTP induite par l'hypoxie étaient associés à une restauration de l'activité STAT3 dans les Treg.

Conclusions

Dans ce deuxième travail, nos résultats montrent clairement que le contrôle de la voie de signalisation de la leptine permet de protéger contre le développement de l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique. D'autre part, cette étude souligne l'importance du rôle joué par l'endothélium dans le développement de l'autoimmunité dans l'HTAP. Ces résultats pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, notamment dans le cadre du développement de l'autoimmunité dans l'HTAP idiopathique.

Leptin inhibition attenuates regulatory T lymphocyte impairment and prevents experimental pulmonary hypertension

Huertas: Leptin inhibition in pulmonary hypertension

Alice Huertas, MD^{1,2,3}, Ly Tu, PhD^{1,2,3}, Morane Le Hiress, MSc^{1,2,3}, Nicolas Ricard, PhD^{1,2,3}, Raphaël Thuillet^{1,2,3}, Carole Phan, MSc^{1,2,3}, Elie Fadel, MD, PhD^{1,2}, Sophie Nadaud, PhD⁴, Marc Humbert, MD, PhD^{1,2,3} and Christophe Guignabert, PhD^{1,2,3}

Affiliations:

¹ INSERM UMR_S 999, LabEx LERMIT, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

² Univ. Paris-Sud, School of medicine, Le Kremlin-Bicêtre, France

³ AP-HP, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, DHU Thorax Innovation, Hôpital de Bicêtre, France

⁴ INSERM UMR_S 937, Université Pierre & Marie Curie, Paris, France

Correspondence:

Pr. Marc Humbert

Service de Pneumologie

Hôpital Bicêtre

78, rue du Général Leclerc

94270 Le Kremlin-Bicêtre, France

Tel: +33 1 45 21 79 72

Fax: +33 1 45 21 79 71

e-mail : marc.humbert@bct.aphp.fr

Total word count: (max 7000)

[18] Pulmonary circulation and disease

Abstract

Background: Increasing evidence support the notion that autoimmunity could play a key role in pulmonary arterial hypertension (PAH) pathogenesis, but the underlying mechanisms are still unclear. We have recently showed that endothelial-derived leptin may inhibit regulatory T lymphocytes (Treg) function and that leptin levels are abnormally elevated in idiopathic PAH (iPAH). However, the significance of the leptin pathway for both disease susceptibility and propagation of vascular remodeling remains unknown. We therefore hypothesized that blocking leptin pathway could prevent and/or delay hypoxia-induced pulmonary hypertension, by restoring Treg function.

Methods and results: To test our hypothesis, we have first assessed autoimmunity status and Treg function in iPAH patients and then performed *in vitro* studies using isolated endothelial cells from transplanted lungs for iPAH patients and from lobectomy for controls, to show that autoimmunity is leptin-dependent in iPAH. Secondly, we have investigated the role of leptin pathway in hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats, using two distinct *in vivo* strategies: transgenic leptin-deficiency and pharmacological inhibition of leptin synthesis by dichloroacetate treatment.

Conclusions: Our results clearly indicate a key role for Treg in PAH pathogenesis, highlighting that autoimmunity may represent an important “second hit” in the disease. Restoring Treg function may represent a new PAH therapeutical strategy.

Key words: pulmonary arterial hypertension, lymphocytes, endothelial dysfunction, remodeling, ZDF rat

Introduction

Idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) corresponds to sporadic precapillary pulmonary hypertension defined as a mean pulmonary arterial pressure (mPAP) ≥ 25 mmHg (1). Even though several drugs have been developed over the past decades, at this time there is no cure for this devastating disease (2, 3). Although the pathogenesis of iPAH has been extensively studied and several signaling pathways have been identified, the etiology is still not fully understood. However, the past decade has seen great strides in our understanding of the pathogenesis of iPAH and increasing evidence are supporting the crucial role played by immunological disorders for both disease susceptibility and propagation of vascular remodeling in PAH (4-6). Nevertheless, the initiating trigger of dysimmunity and its consequences on the disease development and/or progression remain unknown in iPAH.

Regulatory T lymphocytes, or Treg, control immune homeostasis by maintaining tolerance to self-antigens and suppressing a variety of physiological and pathological immune responses (7). Indeed, Treg are known to dampen autoreactive responses and may delay the onset and progression of autoimmune disorders. While leptin is recognized as a key factor in stimulating proinflammatory responses and immunity, recent evidence demonstrates a detrimental involvement of leptin in promoting the pathogenesis of various autoimmune by regulating Treg function (8). We previously reported that leptin and its receptor (ObR) are increased in iPAH patients compared to controls, whereas their Treg function is decreased in a leptin-dependent manner (9). Furthermore, we were able to show that dysfunctional pulmonary endothelial cells (ECs) represent a major source of leptin in iPAH patients compared to controls.

Leptin seems to be the missing link between immunological disorders and development of PAH but the underlying mechanisms are still unknown. Due to the presence of hypoxia response elements (HRE) in the *leptin* gene promoter, that can recruit HIF-1 α (10), hypoxia is a strong inducer of leptin expression. Interestingly, greater HIF-1 α expression and transcriptional activity has been demonstrated in iPAH ECs and iPAH lungs, in both normoxic and hypoxic conditions, when compared to control cells and tissue specimens (11).

We question here whether blocking leptin pathway could prevent and/or delay hypoxia-induced pulmonary hypertension, by restoring Treg function. We addressed this issue using two different strategies: exposing transgenic rats lacking leptin receptor, and treating wild type rats with dichloroacetate (DCA; an indirect inhibitor of HIF-1 α nuclear translocation (12). Our findings clearly indicate that leptin and/or its receptor blockade protects against PH progression by modulating Treg function. Taken together, our data represent the first *in situ* and *in vitro* demonstrations that endothelial-derived leptin actively contributes to both disease susceptibility and propagation of vascular remodeling through its control of Treg function. Restoration of Treg function may represent new biomarker for diagnosis, prognosis and treatment of iPAH.

Methods

Subjects

Blood samples were collected in patients with iPAH during usual follow-up and in control subjects (Table 1). Inclusion criteria were age above 18 years and PAH diagnosis confirmed by right-heart catheterization with a stable clinical and hemodynamic status for the last 3 months. Exclusion criteria were a heritable form of PAH (presence of mutations in PAH predisposing genes, *BMPR2* or *ACVRL1*, were excluded in all patients),

diabetes and metabolic syndrome. This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France). Characteristics at diagnosis and follow-up were stored in the Registry of the French Network of Pulmonary Hypertension set up in agreement with French bioethics laws (French Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés) and all patients gave their written informed consent.

Animal models and hemodynamic measurements

Animal studies were approved by the administrative panel on animal care at the Univ. Paris-Sud, Le Plessis-Robinson, France. In a first set of experiments, young male Wistar rats (100 g) were studied 4 weeks after a single subcutaneous injection of monocrotaline (60 mg/Kg) or vehicle, or exposed to normobaric chronic hypoxia ($FiO_2=10\%$) or normoxia for 3 consecutive weeks. In another set of experiments, 4 weeks old male Zucker diabetic fatty (ZDF, Charles River Laboratories) Sprague-Dawley rats (ZDF/Lepr fa/fa) and age matched lean control rats (ZDF/Lean +/?) were also exposed to normobaric hypoxia ($FiO_2=10\%$) or normoxia for 3 consecutive weeks. In a third set of experiments, 4 weeks old male Sprague-Dawley rats were divided into 4 groups: control group (water) exposed to normoxia or to 3 weeks of chronic hypoxia, and dichloroacetate (DCA)-treated animals (1g/l in drinking water, Sigma-Aldrich) exposed to normoxia or to 3 weeks of chronic hypoxia. As previously described (13), animals were anesthetized with isoflurane. A polyvinyl catheter was introduced into the right jugular vein and pushed through the right ventricle into the pulmonary artery. Another polyethylene catheter was inserted into the right carotid artery. After measurement of hemodynamic parameters, blood was removed for peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and serum analysis. Then, the thorax was opened and the left lung immediately removed and frozen. The right lung was fixed in the distended

state with formalin buffer. The right ventricular hypertrophy (RVH) index and the percentage of muscularized vessels were determined as previously described (13).

Flow cytometry analysis

After blood samples withdrawal, PBMCs from iPAH patients and controls or rats were obtained by standard Ficoll gradient centrifugation. The cells were carefully washed with PBS and resuspended in a staining buffer containing 10% of human serum. The cells were then fluorescently labeled with the following antibodies under non-permeabilized or permeabilized conditions (IntraPrep, following manufacturer's instructions, Beckman Coulter), to enable surface or intracellular staining, respectively: fluorophore conjugated monoclonal anti-CD4, monoclonal anti-CD25 and monoclonal anti-CD127 (Treg cocktail, Becton Dickinson); monoclonal anti-FoxP3; monoclonal antibody against ObR (R&D Systems); monoclonal antibody against phosphorylated STAT3 (BD); monoclonal antibody against IL-10 and monoclonal antibody against LAP. Flow cytometry gating conditions and the mean fluorescence intensity (MFI) were set and normalized, respectively, against isotype- and fluorophore-matched non-immune IgGs. Treg phenotype was defined as cells CD4⁺CD25⁺CD127^{low}. Treg cell count was expressed as the percentage of total CD4⁺ cells. Flow cytometry data were acquired with a flow cytometer (MACSQuant) and analyzed by FlowJo software program (Tree Star, Inc).

Immunohistostaining

Lung specimens were fixed in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin. 5-mm sections were dewaxed and rehydrated progressively. Citrate buffer (pH 6) was used for antigen retrieval, and endogenous peroxidase was quenched with hydrogen peroxide. Sections were blocked with 5% bovine serum albumin and incubated overnight with the following antibodies: polyclonal antibody against leptin (dilution

1/100; Santa Cruz Biotechnologies), CD3 and CD68. For immunostaining, images were taken using LSM700 confocal microscope and analyzed using Zen software (Zeiss).

Human pulmonary endothelial cell isolation and culture

Lung specimens were obtained at the time of lung transplantation from patients with iPAH, at the Marie Lannelongue Hospital, Le Plessis-Robinson, France. Control-lung specimens were obtained from patients without any evidence of pulmonary vascular disease who underwent lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer, with the normal tissue collected at a distance from the tumors. Human pulmonary endothelial cells isolated from lung tissue fragments using immunomagnetic purification were cultured as previously described (13). Briefly, human lung was digested by Dispase, filtered on Tamis Cell Stainer, and purified using immunomagnetic beads labeled with monoclonal antibody against PECAM-1 (CD31, as recommended by the manufacturer; Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Pulmonary endothelial cells were cultured in MCDB131 media containing heparin (30U/mL), L-glutamine (100mg/mL), penicillin (100U/mL), and streptomycin (100µg/mL); and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 10ng/mL vascular endothelial growth factor (VEGF) and 1 µg/mL endothelial cell growth supplement (ECGS; Promocell, Heidelberg, Germany) on plates precoated with 0.1% gelatin. The isolated pulmonary endothelial cells were strongly positive for acetylated low-density lipoprotein (Dil-Ac-LDL coupled to a fluorescent carbocyanine dye) and for Ulex europaeus agglutinin-1 (UEA-1) and negative for alpha-smooth muscle actin. Cells were used between passages 4-6.

Measurement of leptin production by pulmonary endothelial cells

To quantify leptin in conditioned media, human pulmonary endothelial cells from patients with iPAH and controls were seeded on 6-well plates at a density of 1×10^5 cells/well. After 24 hours, cells were washed twice with PBS then incubated for 24 h in

serum-free MCDB13 (without the addition of serum and/or growth factors). Leptin was measured in conditioned media using ELISAs (as recommended by the manufacturer; R&D Systems).

Serum measurements

Serum samples were collected and stored at -80°C. Circulating leptin was measured using ELISAs (as recommended by the manufacturer; R&D Systems).

Statistical analysis

Results are expressed as means \pm SEM, unless otherwise stated. A $p < 0.05$ level of statistical significance was used for all analyses. The Shapiro-Wilk test was used to ensure that samples of data had a normal distribution. All between-groups comparisons were assessed using One Way ANOVA; post-hoc analysis of significant variables was performed using Bonferroni correction with all pairwise multiple comparisons. Differences between two selected groups (controls and iPAH) were compared using unpaired t-test. Pearson correlations were used to establish associations between the dependent variables and relevant independent variables. All statistical procedures were carried out using GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad Software Inc.)

Results

Dysfunctional immune responses in iPAH patients are leptin-dependent

To establish iPAH patient autoimmunity status, we first measured the presence of circulating anti-nuclear antibodies (ANA) in the serum and we found that more than half of the patients in our cohort had circulating ANA, whereas it is known that only 10 to 12% of the general population has circulating ANA (Table 1). We next studied in details the Treg activation status in our patients. Consistent with our previous study, iPAH patients display a normal number of circulating Treg cell overexpressing leptin

receptor (ObR), whereas their function is decreased (Table 1). Next, we further investigated Treg functional markers, in addition to STAT3 phosphorylation level (Figure 1A). Treg are known to suppress other adaptive or innate immune cells, through the secretion of immunomodulatory cytokines, mainly interleukin (IL)-10 and transforming growth factor (TGF)- β . We therefore examined Treg IL-10 and TGF- β secretion and we found that iPAH Treg display a normal IL-10 production whereas they secrete a lower level of TGF- β compared to controls (Figure 1B and C). Interestingly, TGF- β secretion inversely correlated with ObR expression on Treg surface in iPAH patients (Figure 1D), further suggesting that Treg function is leptin-dependent.

To elucidate how leptin can affect Treg function, we *in vitro* exposed human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to different doses of leptin for different incubation duration. We chose pSTAT3 level as our Treg function read-out as STAT3 is the main leptin-dependent signaling pathway. We demonstrated that Treg function is greatly inhibited after one hour of incubation with exogenous leptin, independently of the doses (Figure 1E), clearly indicating that Treg function is under leptin control. To further assess the role of leptin in Treg functional status, we incubated PBMCs with a soluble chimeric fusion protein of ObR (ObR:Fc) and demonstrated the complete restoration of Treg cell function (Figure 1F).

Taken altogether, these results confirm that there are autoimmunity evidences in iPAH patients and that the leptin/ObR axis drives the activity of Treg. Importantly, we are showing here that Treg function can be restored by blocking leptin or its receptor.

Leptin secretion is increased in the hypoxic, but not monocrotaline-induced, pulmonary vascular remodeling in rats

We next examined serum leptin concentration in the two well recognized and widely used monocrotaline (MCT)- and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (PH) models.

We showed that circulating leptin concentration was greatly increased after three weeks of hypoxia (FiO₂ 10%) compared to monocrotaline-treated rats and control untreated rats exposed to normoxia (Figure 2A). Consistent with these results and our previous observation that pulmonary ECs represent an important source of leptin, we showed a greater endothelial content in lung sections from rats exposed to chronic hypoxia compared to normoxic controls and to those treated with monocrotaline. Interestingly, the hypoxia-induced leptin increase is highly expressed in the pulmonary endothelium (Figure 2B). Based on these results, we consider hypoxia-induced PH as our animal model in this study.

Leptin receptor-deficient rats show decreased susceptibility to hypoxia-induced PH

To investigate the role of leptin/ObR axis in PH onset, we exposed leptin receptor-deficient rats, called ZDF rats, to chronic hypoxia (FiO₂ 10%) or normoxia for three weeks and compared them to their wild type littermates also exposed to chronic hypoxia or normoxia. After three weeks of chronic hypoxia, ZDF developed a less severe disease compared to wild type rats, as reflected by the mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and pulmonary resistance (PVR) (Figure 3A and B) and pulmonary arterial muscularization degree (Figure 3D and E). Of note, right ventricular remodeling, evaluated by the Fulton index, was not statistically different between ZDF and wild type rats (Figure 3C). Interestingly, *in situ* pulmonary inflammation was also substantially reduced in ZDF rats exposed to chronic hypoxia compared to wild type animals (Figure 3F). Taken altogether, these results demonstrate that rats lacking leptin receptor is a

protective element against PH onset, which clearly indicates that leptin contributes to PH onset and/or severity.

Treg from leptin receptor-deficient rats are protected against hypoxia induced

impairment We next examined Treg function and found that leptin deficiency restored normal immune responses in rats. We demonstrated that ZDF rats displayed normal Treg function, expressed as pSTAT3 level and IL-10 secretion, after 3 weeks of hypoxia exposure compared to wild type rats in which Treg are inhibited (Figure 4).

Overabundance of endothelial-derived leptin is dependent of HIF-1 α

The hypoxia-induced stabilization of HIF1 α is rapidly degraded by prolyl hydroxylases (PHD) *in vivo* (14) and is therefore upregulated by dimethyloxaloylglycine (DMOG), a cell permeable prolyl-4-hydroxylase inhibitor *in vitro*. Since it is well known that leptin is one of the HIF1 α -dependent genes (10,15), we first tested whether DMOG could modulate leptin signaling in EC *in vitro*. We found a great increase in leptin concentration in DMOG-treated EC conditioned media (Figure 5A), clearly suggesting that leptin signaling is HIF1 α -dependent in pulmonary ECs.

DCA treatment reverses hypoxia-induced pulmonary hypertension by restoring Treg function

Since emerging evidence indicate that activation of mitochondrial signaling can directly inhibits HIF1 α , we considered the role of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase kinase inhibitor, dichloroacetate (DCA), which has been shown to inhibit HIF1 α by both a PHD-dependent and independent mechanism, involving activation of p53 via mitochondrial-derived H₂O₂ (16). Hence, we next tested whether leptin pathway could

be pharmacologically inhibited by DCA *in vitro*. We exposed human pulmonary ECs to DCA and show that the DMOG-induced increase in leptin concentration in EC conditioned media was totally reversed by DCA (Figure 5B).

We then investigated whether leptin pathway could be pharmacologically inhibited by DCA in the rodent hypoxia model *in vivo* (Figure 6A). We exposed rats to chronic hypoxia for 3 weeks and treated them with DCA from day 7 to day 21. We found that DCA-treated rats were protected against hypoxia-induced PH compared to untreated rats, as they developed less severe PH as shown by hemodynamic measurements (mPAP, PVR and ventricular remodeling, Figure 6B-D), pulmonary arterial muscularization degree assessment (Figure 6E, F) and pulmonary inflammatory cell staining (Figure 6G). Interestingly, DCA-treated rats displayed Treg with a normal function, expressed by pSTAT3 level and IL-10 secretion, after hypoxic exposure (Figure 7). These results clearly indicate that DCA reverses hypoxia-induced PH in rats by modulating Treg function.

Discussion

Our results indicate that inhibition of leptin/ObR axis, by both genetic engineering strategies and pharmacological approaches, prevents and reverses hypoxia-induced PH in rats by modulating Treg function. We believe this is the first evidence showing that endothelial-derived leptin-dependent Treg functional status modulates PH severity. Our findings highlight the crucial role played by the crosstalk between endothelial dysfunction and autoimmunity in PAH. Furthermore, our study also bears on our increasing understanding that autoimmunity contributes to PAH onset and/or progression.

Autoimmunity in PAH patients

We are showing here that PAH patients display dysfunctional Treg cells as reflected by their STAT3 phosphorylation level and pro-TGF- β production. On the opposite, we are also reporting that PAH patient Treg content of IL-10 is comparable to controls. These results indicate that, in the population taken in exam in this study, Treg are not totally inhibited and maintain a normal IL-10 production. IL-10 production is regulated by several mechanisms at different levels, such as signal transduction, epigenetic, transcription factor binding and gene activation mechanisms (17). A better knowledge of these mechanisms in Treg of PAH patient may help understanding PAH autoimmunity onset.

Endothelial dysfunction and PAH progression

A key factor in PAH pathogenesis is represented by pulmonary endothelial dysfunction that can lead to pulmonary vascular remodeling, one of the hallmarks of the disease (18). Increasing evidence is also indicating that autoimmunity may play a role in PAH (19-21). Despite this knowledge, it is not clearly established whether a crosstalk exists between endothelial dysfunction and autoimmunity in PAH pathogenesis. There are several data reporting that pulmonary vasculature is sensitive to autoimmune stimuli, such as autoantibodies directed against pulmonary vasculature components and respond by abnormal proliferation and apoptotic resistant phenotype (22). On the other hand, whether pulmonary endothelial dysfunction can participate to autoimmunity in PAH needs to be elucidated. We are showing here that pulmonary endothelial dysfunction controls Treg function through leptin aberrant synthesis. Our findings reveal an additional role for pulmonary endothelium in PAH autoimmunity onset. Furthermore, our findings also show that pulmonary EC dysfunction modulates PAH

severity *via* Treg control. Therefore, the present study suggests that pulmonary endothelial dysfunction, through local leptin production and release, could be the missing link between immunological disorders and PAH development.

Leptin at the interface between metabolism and PAH immunopathogenesis

Our present findings are clinically relevant as they provide a rationale for an additional beneficial effect of DCA, a drug that target HIF-1 α and the shift in the glycolysis/ glucose oxidation ratio. Despite our knowledge, several questions remain unanswered. Whether autoimmunity represents a cause or an effect of PAH onset is still not clearly understood. Although PAH pathogenesis shares several characteristics with systemic autoimmune diseases, why PAH represents a lung-specific disease has not been elucidated yet. Furthermore, we tested here a leptin inhibition by a systemic pharmacological approach: what could be the systemic effects of this treatment need to be further investigated.

In summary, we are showing here that pulmonary endothelial-derived leptin contributes to PAH severity by modulating Treg function. Understanding the specific mechanistic events that regulate pulmonary dysfunction and autoimmunity in PAH will help to answer the remaining questions that are important for the design of new strategies.

Acknowledgments: The authors thank Dr. Caroline Sattler for her help in the study.

Support: This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), A. Huertas is supported by the Josso Award 2010 from the French Medical Research Foundation.

Conflict of Interest Disclosures: None

References

1. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol.* 2009;54:S43-54
2. O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol.* 2011;8:526-538
3. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza R, Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation.* 2010;122:156-163
4. Dorfmuller P, Perros F, Balabanian K, Humbert M. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2003;22:358-363
5. Perros F, Dorfmuller P, Montani D, Hammad H, Waelput W, Girerd B, Raymond N, Mercier O, Mussot S, Cohen-Kaminsky S, Humbert M, Lambrecht BN. Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012;185:311-321
6. Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Abbate A, Bogaard HJ, Nicolls MR. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *Eur Respir J.* 2012;40:1555-1565
7. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory t cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010;11:7-13
8. La Cava A, Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol.* 2004;4:371-9
9. Huertas A, Tu L, Gambaryan N, Girerd B, Perros F, Montani D, Fabre D, Fadel E, Eddahibi S, Cohen-Kaminsky S, Guignabert C, Humbert M. Leptin and regulatory t lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2012;40:895-904

10. Ambrosini, JBC 2002
11. Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet SN, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir E, Archer SL. An abnormal mitochondrial-HIF-1-Kv channel pathway disrupts oxygen-sensing and triggers pulmonary arterial hypertension (PAH) in fawn-hooded rats: similarities to human PAH. *Circulation* 2006; 113: 2630–2641.
12. Michelakis ED, McMurtry MS, Wu XC, Dyck JR, Moudgil R, Hopkins TA, Lopaschuk GD, Puttagunta L, Waite R, Archer SL. Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation*. 2002; 105: 244–250
13. Tu L, De Man FS, Girerd B, Huertas A, Chaumais MC, Lecerf F, Francois C, Perros F, Dorfmuller P, Fadel E, Montani D, Eddahibi S, Humbert M, Guignabert C. A critical role for p130cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:666-676
14. Semenza GL. HIF-1, O(2), and the 3 PHDs: How animal cells signal hypoxia to the nucleus. *Cell* 2001;107:1-3
15. Otero M, Lago R, Lago F, Casanueva FF, Dieguez C, Gómez-Reino JJ, Gualillo O. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett*. 2005;579:295-301
16. Sutendra G, Dromparis P, Kinnaird A, Stenson TH, Haromy A, Parker JM, McMurtry MS, Michelakis ED. Mitochondrial activation by inhibition of PDKII suppresses HIF1a signaling and angiogenesis in cancer. *Oncogene*. 2013;32:1638-50
17. Saraiva M, O'Garra A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:170-81
18. Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, Jessup M, Grizzle WE, Aldred MA, Cool CD, Tudor RM. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186:261-272
19. Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Pena-

- Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillevin L, Boissier MC, Mouthon L. Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2005;60:765-772
20. Terrier B, Tamby MC, Camoin L, Guilpain P, Broussard C, Bussone G, Yaici A, Hotellier F, Simonneau G, Guillevin L, Humbert M, Mouthon L. Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1128-1134
21. Arends SJ, Damoiseaux J, Duijvestijn A, Debrus-Palmans L, Boomars K, Broers B, Tervaert JW, van Paassen P. Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2010;35:923-925
22. Dib H, Tamby MC, Bussone G, Regent A, Berezne A, Lafine C, Broussard C, Simonneau G, Guillevin L, Witko-Sarsat V, Humbert M, Mouthon L. Targets of antiendothelial cell antibodies in pulmonary hypertension and scleroderma. *Eur Respir J*. 2012;39:1405-1414

Figure legends

Figure 1. Dysfunctional immune responses in iPAH patients are leptin-dependent

A. Group data of pSTAT3⁺TregObR⁺, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population, in control subjects and idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) patients. B. Group data of interleukin (IL)-10⁺ cells, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population, in control subjects and IPAH patients. C. Group data of Latent Antigen Peptide (LAP) pro-transforming growth factor (TGF)- β ⁺ cells, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population, in control subjects and IPAH patients., percentage of the total Treg ObR⁺ population, in control subjects and IPAH patients. D. Correlation between LAP pro-TGF- β expression on Treg ObR⁺ cells and ObR⁺ expression on Treg. E. Effects of different times of exposure and doses of recombinant leptin on human pSTAT3 levels in Treg. F. Group data of the effects on Treg of recombinant leptin and soluble chimeric fusion protein of ObR (ObR:Fc) exposure, measured by Treg pSTAT3 levels. Values are expressed as mean \pm sem. *:p<0.05

Figure 2: Leptin secretion is increased in the hypoxic, but not monocrotaline-induced, pulmonary vascular remodeling in rats

A. Group data of serum leptin concentration in chronic hypoxia (*hypoxia*)- and monocrotaline (*MCT*)-induced pulmonary hypertension. B. Immunostaining for CD31 and leptin in lung specimens in a representative pulmonary artery from rats exposed to normoxia (*control*), chronic hypoxia (*hypoxia*) and monocrotaline (*MCT*). Values are expressed as mean \pm sem. *:p<0.05

Figure 3: Leptin receptor-deficient rats show decreased susceptibility to hypoxia-induced PH

A-F: Data from wild type and ZDF rats, exposed to normoxia or chronic hypoxia. Group data of (A) mean pulmonary arterial pressure (mPAP), (B) pulmonary vascular

resistance (PVR) and (C) right ventricular hypertrophy measured by Fulton index. D. Representative images of hematoxylin-eosin (HE, upper panel) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA, lower panel) stainings of pulmonary artery. E. Group data of muscularized arteries, expressed as percentage of total arteries. F. Representative images of CD3 (upper panel) and CD68 (lower panel) stainings of pulmonary artery. Values are expressed as mean \pm sem. *:p<0.05

Figure 4: Treg from leptin receptor-deficient rats are protected against hypoxia induced impairment

Group data of circulating Treg cell count, expressed as percentage of the total CD4⁺ population (A), of pSTAT3⁺TregObR⁺, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population (B) and of interleukin (IL)-10⁺ cells, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population (C) in wild type and ZDF rats, exposed to normoxia or chronic hypoxia. Values are expressed as mean \pm sem. *:p<0.05

Figure 5 : Overabundance of endothelial-derived leptin is dependent of HIF-1 α

A. Group data of leptin production by human control pulmonary endothelial cells stimulated by DMOG. *: p<0.05. B. Data of leptin production by human control pulmonary endothelial cells stimulated by DMOG or/and dichloroacetate (DCA). Values are expressed as mean \pm sem.

Figure 6 : DCA treatment reverses hypoxia-induced pulmonary hypertension

A. Immunostaining for CD31 and leptin in lung specimens in a representative pulmonary artery from rats exposed to hypoxia, dichloroacetate (DCA)-untreated (*control*) and treated (*DCA*). B-G: Data from dichloroacetate (DCA)-untreated (*control*) and treated (*DCA*) rats, exposed to normoxia or chronic hypoxia. Group data of (B) mean pulmonary arterial pressure (mPAP), (C) pulmonary vascular resistance (PVR) and (D) right ventricular hypertrophy measured by Fulton index. E. Representative images of

hematoxylin-eosin (HE, upper panel) and alpha-smooth muscle actin (α -SMA, lower panel) stainings of pulmonary artery. F. Group data of muscularized arteries, expressed as percentage of total arteries. G. Representative images of CD3 (upper panel) and CD68 (lower panel) stainings of pulmonary artery. Values are expressed as mean \pm sem.

*:p<0.05

Figure 7: DCA treatment modulates regulatory T lymphocyte function

Group data of circulating Treg cell count, expressed as percentage of the total CD4⁺ population (A), of pSTAT3⁺TregObR⁺, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population (B) and of interleukin (IL)-10⁺ cells, expressed as percentage of the total Treg ObR⁺ population (C) in dichloroacetate (DCA)-untreated (*control*) and treated (*DCA*) rats, exposed to normoxia or chronic hypoxia. Values are expressed as mean \pm sem.

*:p<0.05

Supplemental figure 1: Group data for intracellular staining for leptin in CD19⁺ cells (A), CD4⁺ cells (B), CD14⁺ cells (C) and Treg cells (D). Values are expressed as mean \pm sem.

Supplemental figure 2: Group data of leptin production by human pulmonary endothelial cells (A) and smooth muscle cells (B), in control subjects and in idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) patients. Values are expressed as mean \pm sem.

*: p<0.05

Table 1. Characteristics of idiopathic pulmonary arterial hypertension patients and controls

	iPAH n=20	Controls n=20
Age, years	54.9 ± 3.1	41.9 ± 2.1
Sex, M/F (ratio)	6 / 14 (0.42)	19 / 21 (0.9)
Antinuclear autoantibodies		
positive/negative (ratio)	8 / 7 (1.14)	NA
NYHA functional class, n		
class I	5	NA
class II	9	NA
class III	6	NA
6-MWD, m	465 ± 20	NA
mPAP, mmHg	48.8 ± 3,5	NA
CI, l/min/m²	2.9 ± 0.2	NA
PVRi, mmHg/l/min/m²	8.3 ± 0.9	NA
PCWP, mmHg	8.4 ± 0.7	NA
Specific PAH Therapy		
- ERA	16	NA
- PDE5i	12	NA
- Prostanoids	5	NA
- No Treatment	0	NA
Treg number (% CD4⁺ cells)	4.2 ± 0.3	4.8 ± 0.4
Treg ObR⁺ cells (% Treg)	41.9 ± 5.4	27.6 ± 2.9
pSTAT3⁺ Treg ObR⁺ cells (% Treg ObR⁺)	0.2 ± 0.08	0.5 ± 0.17

6-MWD=6-minute walk distance; **CI**=cardiac index; **ERA**=endothelin receptor antagonists; **iPAH**=idiopathic pulmonary arterial hypertension; **M/F**=male/female; **mPAP**=mean pulmonary artery pressure; **NA** = not applicable; **NYHA**=New York Heart Association; **ObR**= leptin receptor; **PDE5i**=Phosphodiesterase 5 inhibitors; **PCWP**=pulmonary capillary wedge pressure; **pSTAT3**=phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3; **PVRi**= pulmonary vascular resistance index; **Treg**= regulatory T lymphocytes.

Figure 1

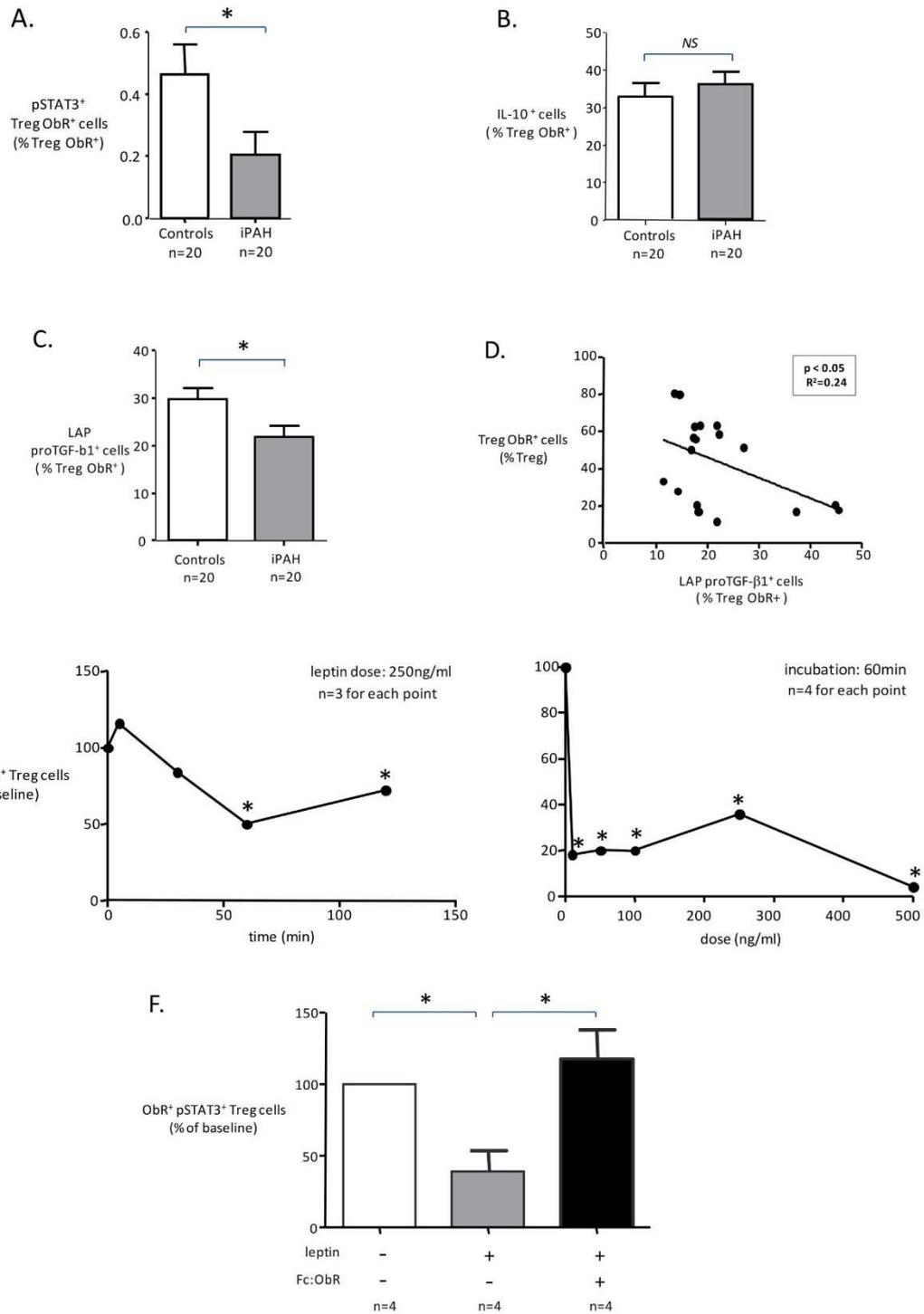
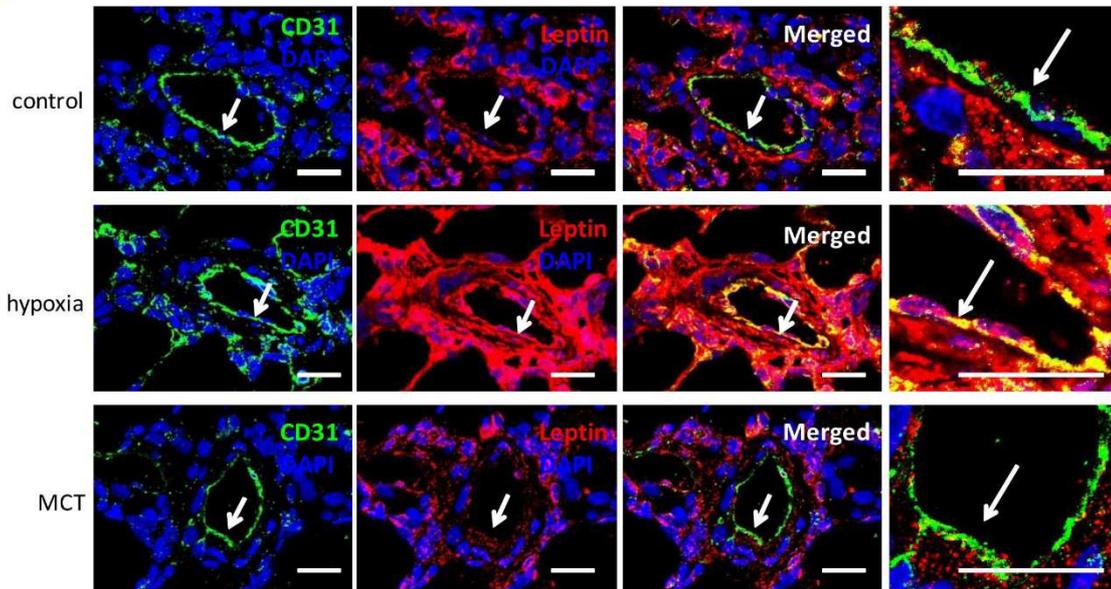


Figure 2

A.



B.

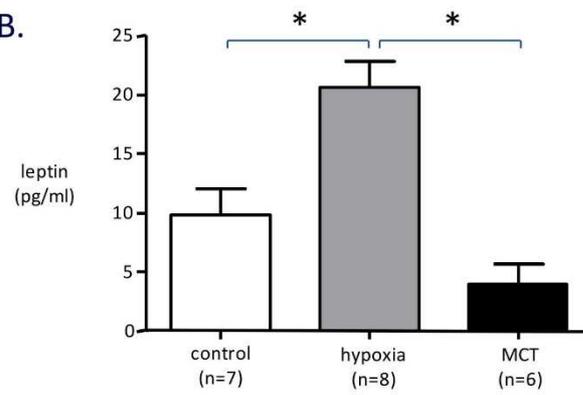


Figure 3

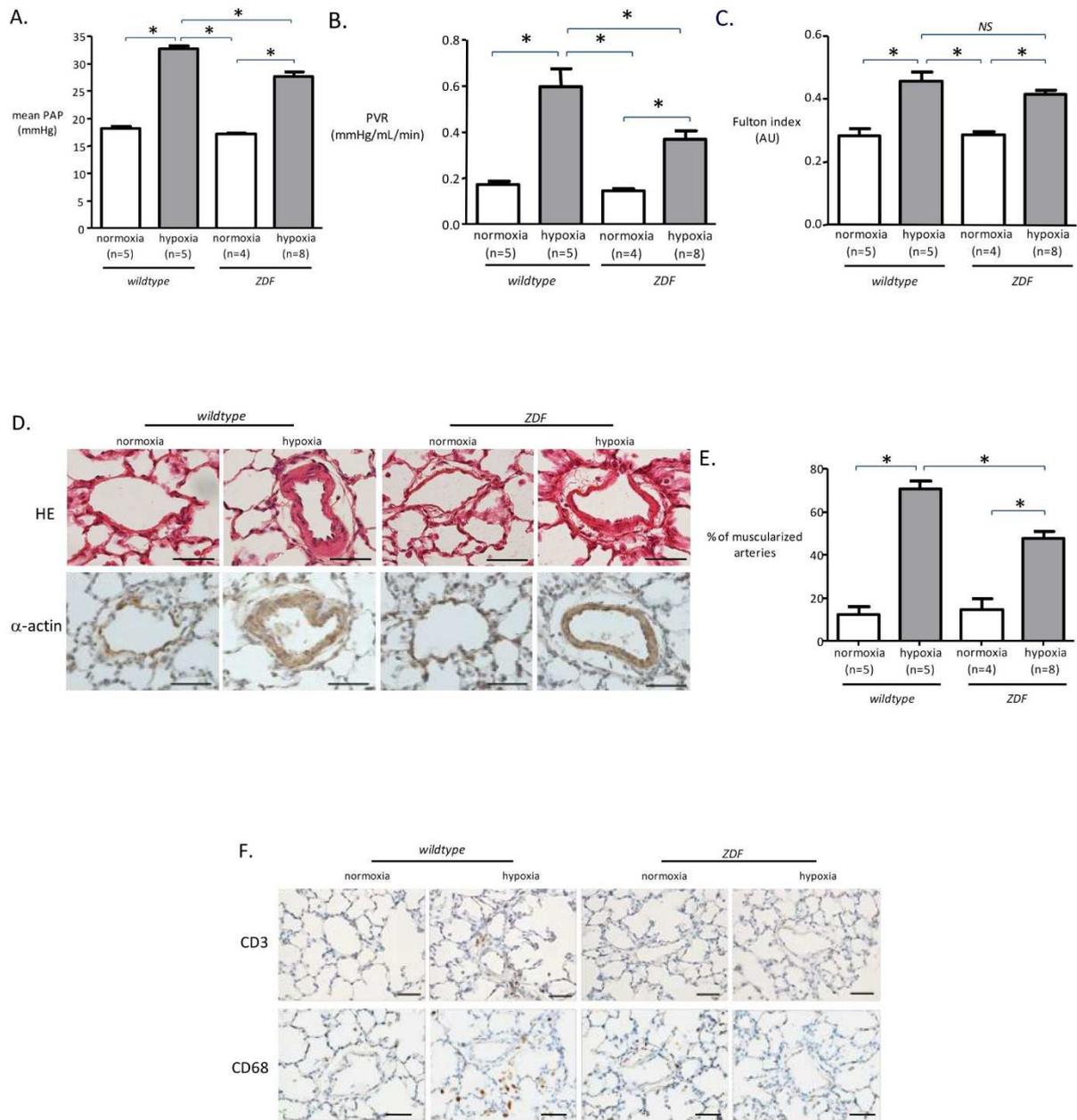


Figure 4

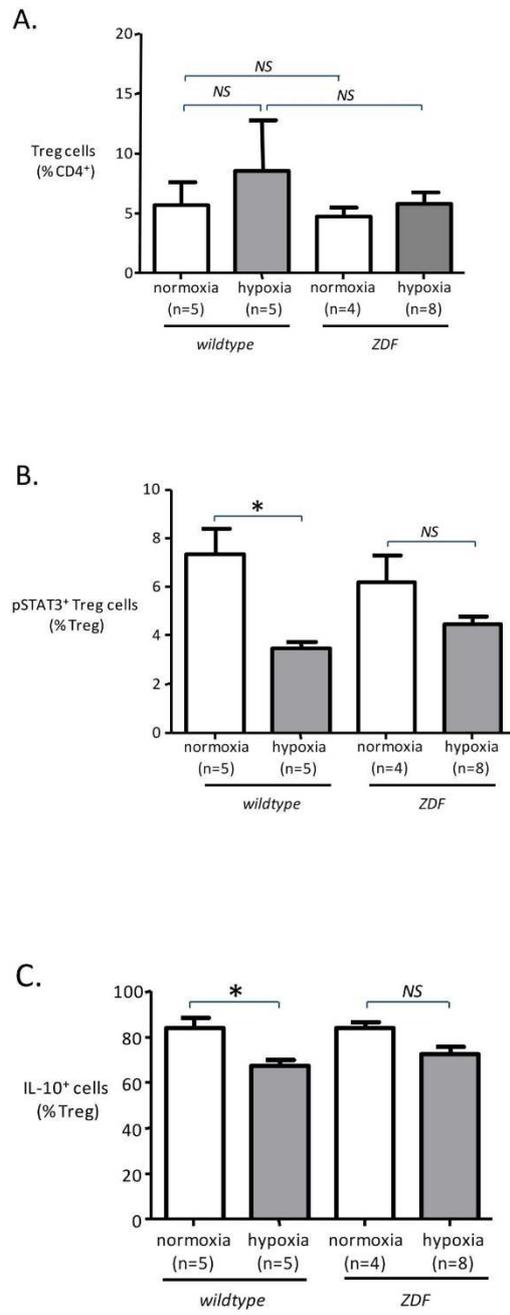
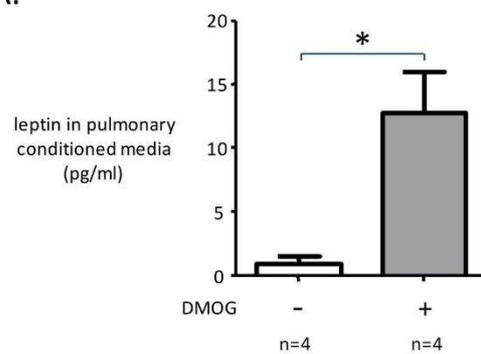


Figure 5

A.



B.

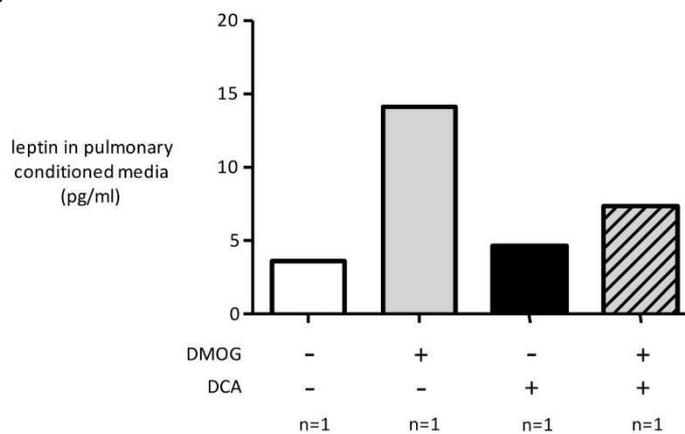


Figure 6 A-D

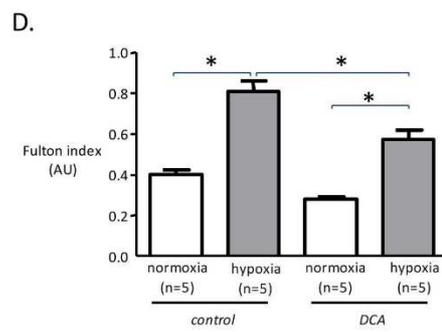
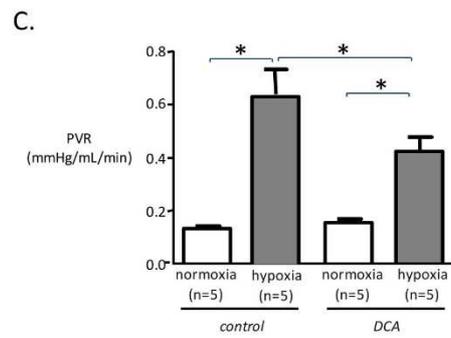
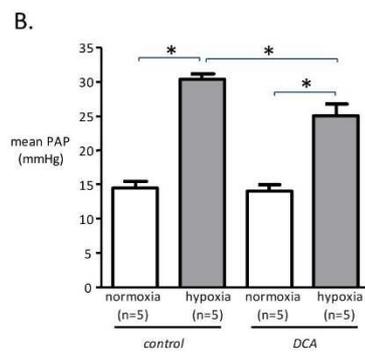
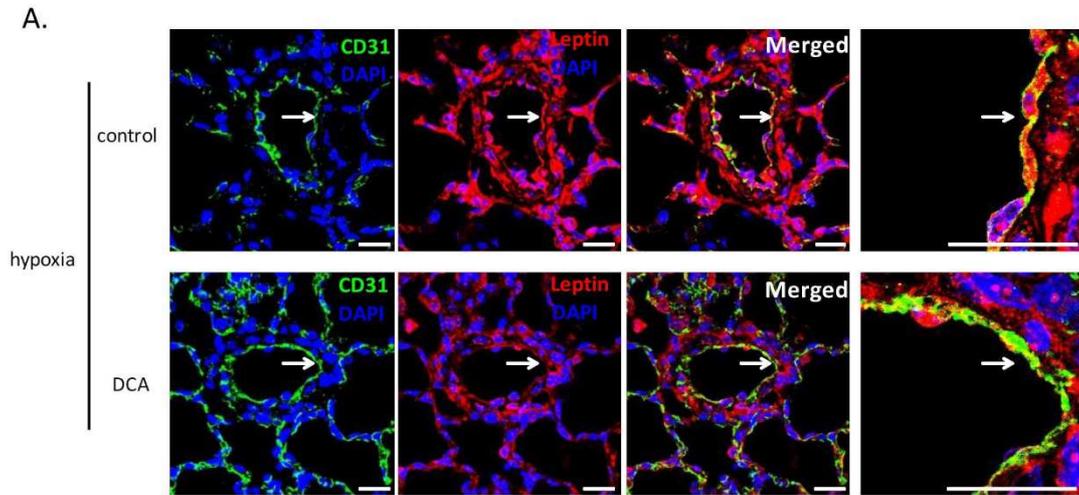


Figure 6 E-G

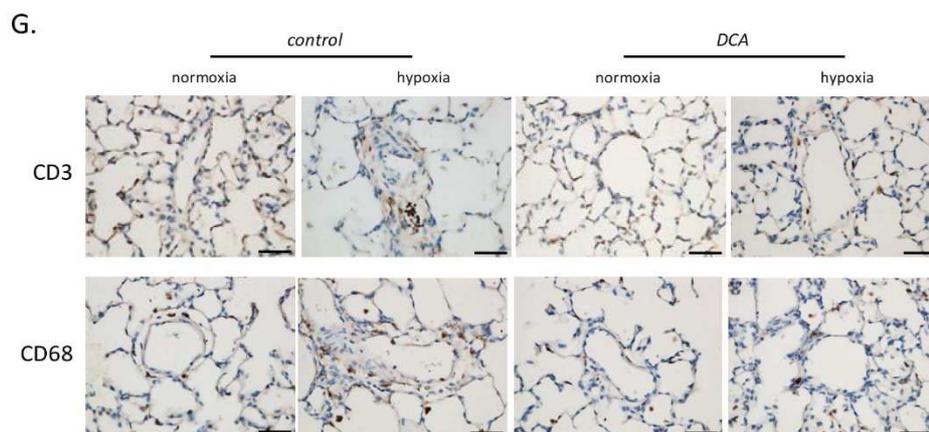
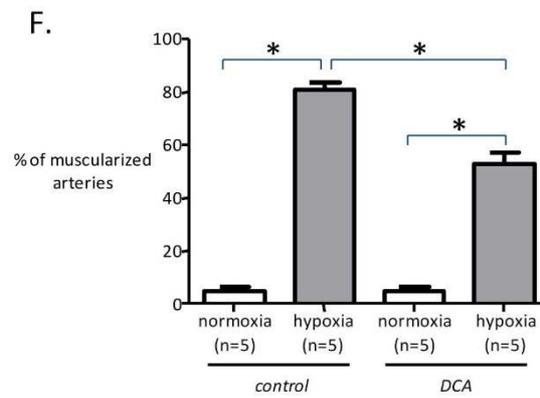
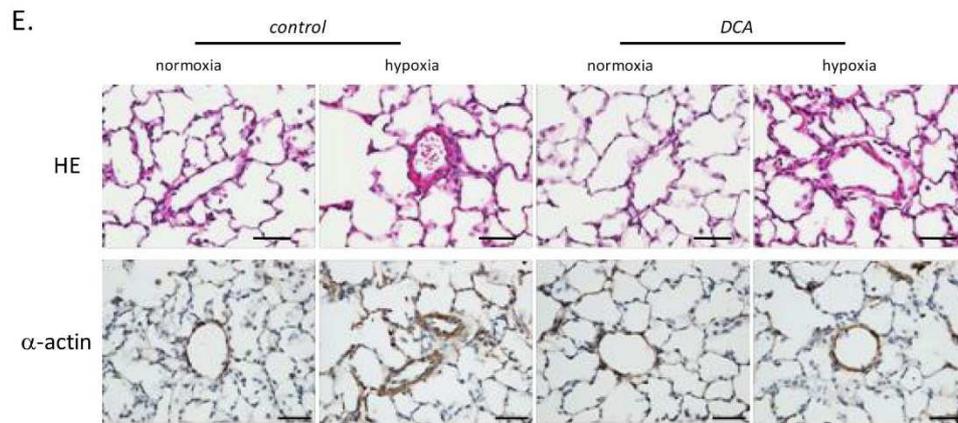
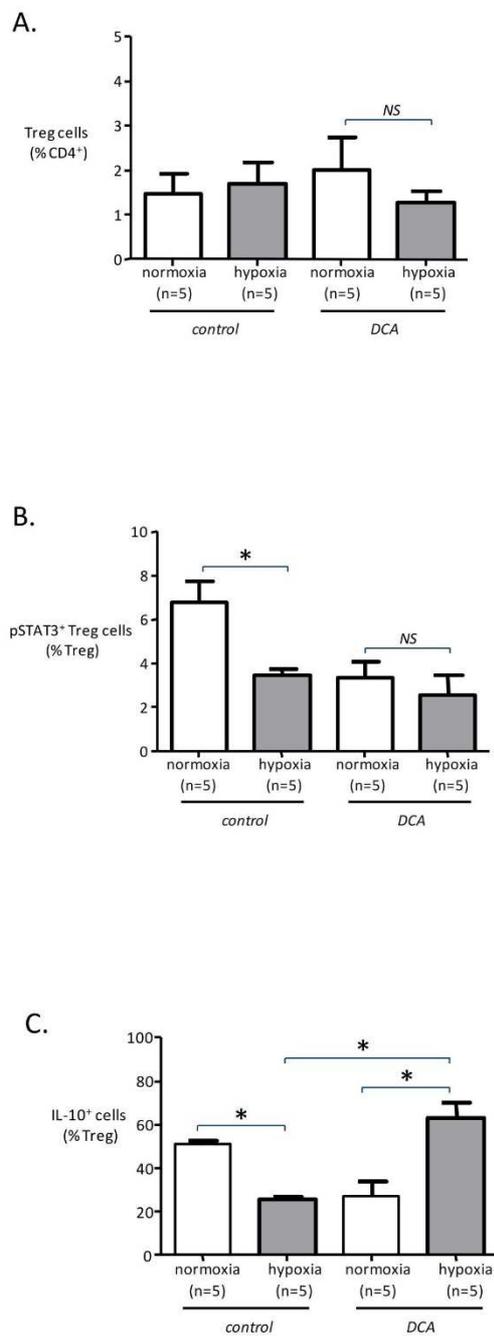
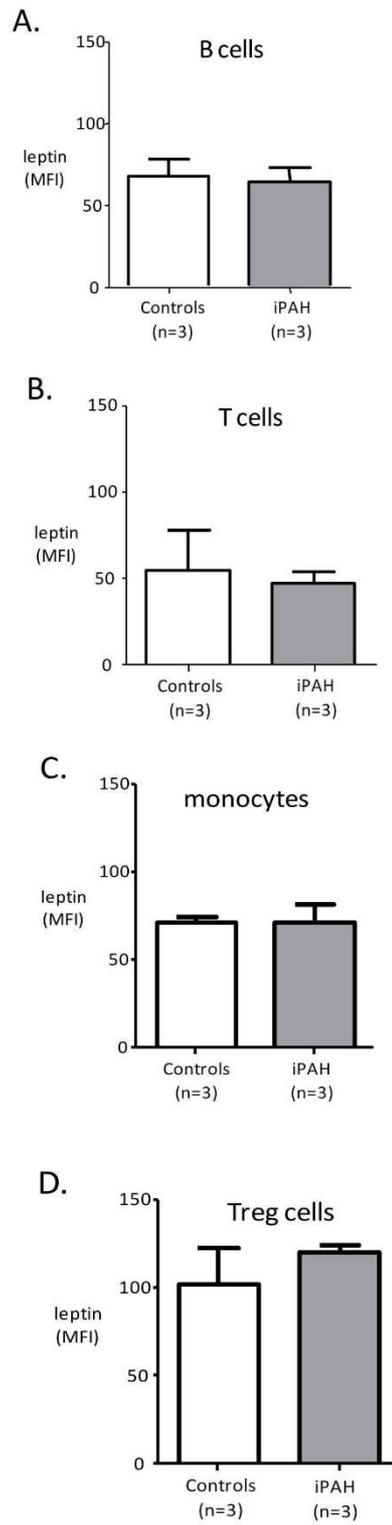


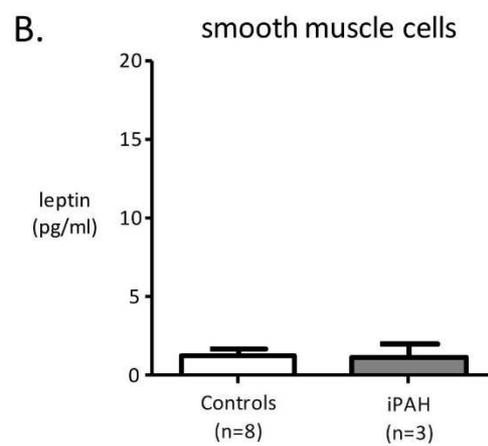
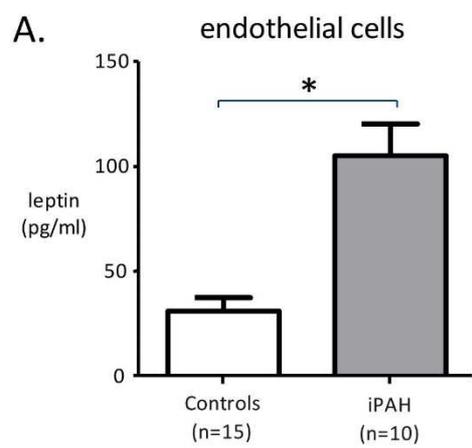
Figure 7



Supplemental figure 1



Supplemental figure 2



Endothelial proinflammatory phenotype in pulmonary arterial hypertension is mediated by a MIF/CD74-dependent mechanism

en soumission

Ly Tu*, Morane Le Hiress*, Nicolas Ricard, Carole Phan, Elie Fadel, Peter Dorfmueller, Gaël Jalce, David Montani, Frances de Man, Marc Humbert, **Alice Huertas** and Christophe Guignabert

* Les deux premiers auteurs ont contribué à part égale dans l'élaboration de ce travail.

Contexte scientifique

La dysfonction endothéliale joue un rôle important dans la réponse inflammatoire caractéristique de l'HTAP. Néanmoins, le rôle exact de l'endothélium dans l'instauration et/ou la progression de l'inflammation dans l'HTAP n'est pas clairement établi.

D'autre part, la voie de signalisation induite par MIF, à travers le lien avec son récepteur CD74, semble être primordial pour la survie et la prolifération cellulaire, la synthèse et la sécrétion de plusieurs facteurs clés pro-inflammatoires et d'adhésion cellulaire. De plus, plusieurs observations soutiennent fortement l'idée d'un rôle clef de MIF dans la dysfonction endothéliale.

Hypothèse

Nous avons donc émis l'hypothèse que MIF pouvait être à l'origine de la dysfonction endothéliale, ou participer à son instauration dans l'HTAP, en induisant un phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium pulmonaire.

Résultats

Nous avons pu montrer que les niveaux de MIF circulant sont anormalement élevés chez les patients HTAP et que les lymphocytes T en représentaient une source importante. De plus, par des études *in situ* et *in vitro*, nous avons observé une surexpression de CD74 à la

surface des cellules endothéliales pulmonaires de patients HTAP, ce qui explique le recrutement excessif de PBMC à ce niveau. Enfin, dans le modèle d'HTP animale, induite par la monocrotaline, l'inhibition pharmacologique de MIF par un antagoniste sélectif, ISO-1, a permis la régression de l'HTP, la diminution du relargage de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et le MCP-1, ainsi que la diminution du recrutement de cellules inflammatoires.

Conclusions

Dans ce troisième travail, nous avons pu mettre en évidence que la dysfonction endothéliale dans l'HTAP contribuait également aux réponses innées dans l'HTAP, en développant un phénotype pro-inflammatoire de façon MIF-dépendante. La voie de signalisation de ce facteur pourrait donc représenter une nouvelle cible d'innovation thérapeutique.

Endothelial proinflammatory phenotype in pulmonary arterial hypertension is mediated by a MIF/ CD74-dependent mechanism

Ly Tu ^{1,2,*}, Morane Le Hiress ^{1,2,*}, Nicolas Ricard ^{1,2}, Carole Phan ^{1,2}, Elie Fadel ^{1,2}, Peter Dorfmueller ^{1,2}, Gaël Jalce ⁴, David Montani ^{1,2}, Frances de Man ⁵, Marc Humbert ^{1,2}, Alice Huertas ^{1,2}, Christophe Guignabert ^{1,2}

* Both authors contributed equally.

¹ INSERM UMR 999, LabEx LERMIT, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ² Univ Paris-Sud, School of medicine, Kremlin-Bicêtre, France; ³ AP-HP, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, DHU Thorax Innovation, Hôpital de Bicêtre, France ; ⁴ MIFCARE, School of medicine, Paris Descartes University, Paris, France; ⁵ Physiology, VU University Medical Center / Institute of Cardiovascular Research, Amsterdam, The Netherlands.

Address for correspondence:

Christophe Guignabert, PhD

INSERM UMR 999

Centre Chirurgical Marie Lannelongue

133, Avenue de la Resistance

92350 Le Plessis-Robinson, France.

Tel: +33-1-40948833

Fax: +33-1-40942522

Email: [*christophe.guignabert@inserm.fr*](mailto:christophe.guignabert@inserm.fr)

Condensed title: Proinflammatory endothelial phenotype in PAH

Authors' contributions: Conception and design: LT, MLH, MH, and CG; Analysis and interpretation: all; Drafting manuscript: LT, MLH, MH, AH and CG.

Manuscript character count: 15 371

Abstract:

Inflammation and endothelial dysfunction are considered two primary instigators of pulmonary arterial hypertension (PAH). CD74 is a receptor for the pro-inflammatory cytokine macrophage migration-inhibitory factor (MIF). This ligand/receptor complex initiates survival pathways and cell proliferation, triggers the synthesis/secretion of major pro-inflammatory factors and cell adhesion molecules. We hypothesized that MIF/ CD74 signaling pathway is over-expressed in PAH and contributes to pulmonary endothelial cell (EC) pro-inflammatory phenotype. Circulating MIF levels are increased in serum of PAH patients as compared to controls and T-cell lymphocytes represent a cause of this overabundance. In addition, CD74 is highly expressed in the endothelium of muscularized distal pulmonary arteries as well as in cultured pulmonary ECs from PAH and contributes to an exaggerated recruitment of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) to pulmonary PAH ECs. Finally, we found that daily treatment of rats with the MIF antagonist ISO-1 for 2 weeks started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection partially reverses development of pulmonary hypertension and this is associated with decreased of IL-6, MCP-1 and inflammatory cell infiltration. We report here that CD74 and MIF are markedly increased and activated in iPAH patients, contributing to the abnormal proinflammatory phenotype of pulmonary ECs in PAH.

Key words: pulmonary hypertension, endothelial dysfunction, CD74 signaling pathway, interleukin 6, monocyte chemoattractant protein 1

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a rare and severe disease characterized by vascular proliferation and remodeling of the small pulmonary arteries leading to a progressive increase in pulmonary vascular resistance and ultimately to right ventricular failure and death. PAH constitutes a heterogeneous group of clinical entities sharing similar physiopathological mechanisms, whereas idiopathic PAH (iPAH) corresponds to sporadic disease in which there is neither a family history of PAH nor an identified risk factor (Humbert et al., 2010; Voelkel et al., 2012). Although the exact mechanisms leading to the onset and progression of PAH are still largely unclear, a complex interplay between pulmonary endothelial dysfunction and inflammation is strongly suspected to influence the development of the disease (Huertas et al., *Circulation, under review*). However, the underlying mechanisms linking characteristics of dysfunctional pulmonary endothelial characteristics and PAH development have not been fully elucidated.

CD74 (invariant chain, Ii) is a non-polymorphic transmembrane glycoprotein that exists in different isoforms and plays a major role in regulating the trafficking of major histocompatibility complex (MHC) class II proteins in antigen-presenting cells (Leng et al., 2003). However, CD74 can also be expressed in the absence of the MHC class II protein (2-5%) and has recently been reported to be a high-affinity binding protein for the proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor (MIF), providing evidence for a role in signal transduction pathways (Leng et al., 2003; Tillmann et al., 2013). The lung is a major source of MIF, which is released upon stimulation by stress, endotoxins, inflammatory and immune stimuli and plays an pivotal upstream role in the inflammatory cascade by promoting the release of other inflammatory cytokines (tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, interferon- γ) (Fan et al., 2011; Gregory et al., 2006; Miller et al., 2008). Stimulation of CD74 initiates a signaling cascade through the

sustained and transient activation of the mitogen-activated protein kinases (MAPKs) extracellular signal-regulated kinase (ERK)1 and ERK2, protein kinase B (AKT) and nuclear factor (NF)- κ B, leading to leukocytic integrin activation, cell proliferation, and survival and induction of proinflammatory gene expression (Bernhagen et al., 2007; Damico et al., 2011; Fan et al., 2011; Gore et al., 2008; Lue et al., 2007; Takahashi et al., 2009; Tillmann et al., 2013). Therefore, we hypothesized that endothelial CD74 could be a key molecule at the crossroad of inflammation and pulmonary endothelial dysfunction in PAH, contributing to the endothelial proinflammatory phenotype. We investigated: 1) MIF levels in the serum of iPAH patients and controls; 2) *in situ* CD74 protein expression within walls of iPAH and control pulmonary arteries; 3) whether or not intrinsic abnormalities in the endothelial CD74 signaling pathway is a characteristic of pulmonary ECs from iPAH patients; 4) whether or not the abnormal CD74 activation in pulmonary ECs can contribute to the pulmonary endothelial proinflammatory phenotype, through modulation of the expression of proteins involved in leukocyte recruitment or adhesion; 5) MIF levels in the serum and CD74 protein expression in two rodent models of pulmonary hypertension; 6) the efficacy of MIF antagonist ISO-1 treatment on the progression of monocrotaline-induced PH.

RESULTS

Pulmonary ECs from iPAH patients exhibit a steady state proinflammatory phenotype

We found that freshly isolated human pulmonary ECs from iPAH patients exhibited a marked proinflammatory transcriptional signature. Primary early (< 3) passage cultures of human ECs established from lung tissue obtained from iPAH patients exhibit higher expressions of IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, E-selectin, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, P-selectin, and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 as compared to control cells (Figure 1A). To investigate the functional consequences of these gene

expression changes, modified Boyden chamber assays were first used to study the ability of pulmonary ECs from iPAH and control cells to attract leukocytes. We noted that the migratory capacity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is substantially increased (up to 3-fold) in presence of conditioned media of quiescent cultured human pulmonary ECs from patients with iPAH when compared with conditioned media of control cells (Figure 1B). In addition, we also found that the amount of bound PBMCs on confluent cell monolayers is about 2- to 3-times higher when iPAH ECs are used as compared to control ECs (Figure 1C).

Increased expression patterns of MIF and CD74 in iPAH patients

Although no significant difference was noted between iPAH and hPAH, a substantial increase in circulating MIF protein levels was observed in the serum of PAH patients compared with controls (80 ± 10 versus 129 ± 20 ng/mL; $P < 0.001$) (Figure 2A, left panel). In contrast, circulating protein levels of the MIF homologue D-dopachrome tautomerase (DDT) were similar to levels found in a control population (0.11 ± 0.1 versus 0.10 ± 0.10 ng/mL respectively; *NS*) (Figure 2A, right panel). Furthermore, we were able to show that T lymphocytes represent a cause of this overabundance (Figure 2B). CD74 is known to be present in limited amounts in normal tissues and pulmonary-ECs but highly expressed in inflammatory disorders and cancers (Meyer-Siegler et al., 2006; Meyer-Siegler et al., 2005; Verjans et al., 2009; Young et al., 2001). Here, we also found a negative or a weak staining for CD74 within the endothelium of distal pulmonary arteries ($< 500 \mu\text{m}$) in normal lung tissues (Figure 2C). In contrast, our results showed strong CD74 staining within the endothelium (arrows) of distal-pulmonary arteries from iPAH patients (Figure 2C). These *in situ* observations were replicated *in vitro*, with cultured pulmonary ECs from patients iPAH exhibiting increased CD74 protein expression levels as compared to control cells (Figure 2D).

MIF/ CD74 is involved in the endothelial proinflammatory phenotype and leucocyte recruitment in PAH

Leucocyte recruitment and arrest are central steps in inflammatory reactions and associated diseases, including PAH (Davis et al., 2012; Eriksson, 2004; Stacher et al., 2012). To study the effect of MIF/ CD74 on leucocyte recruitment, subsequent studies were carried out using confluent pulmonary EC monolayers from iPAH and control patients and exogenous MIF (Figure 3A). In both cell types, a pretreatment with MIF for 24 h increased the amount of bound PBMCs (Figure 3A). In addition, we noted that secretions of endothelial-derived IL-6 and MCP-1 were substantially increased following MIF pretreatment in both control and iPAH pulmonary ECs (10 ± 10 versus 129 ± 20 ng/mL and 10 ± 10 versus 129 ± 20 ng/mL, respectively; $P < 0.001$). Since MIF is known to signal also through the chemokine receptors CXCR2 and CXCR4, additional experiments were done using control pulmonary ECs expressing different CD74 levels. In this complementary approach, we increased the amount of bound PBMCs on confluent EC monolayers overexpressing the CD74, whereas this amount is lower when decreasing CD74 signaling by RNA interference (Figure 3B).

MIF and CD74 protein levels are increased in two animal models pulmonary hypertension (PH)

To better understand the endothelial CD74/ MIF signaling in the pathogenesis of the disease, we next examined the protein expression pattern of MIF and CD74 in lungs from rodent models of pulmonary hypertension. Consistent with findings obtained in human lung tissue, a substantial increase in circulating MIF protein levels has been observed in the two well recognized and widely used monocrotaline (MCT)- and chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension models (Figure 4A). Since the MCT-induced pulmonary hypertension model demonstrated a more significant increase in circulating MIF levels, Western blotting and

immunohistochemistry were performed on lung sections of vehicle and MCT-injected rats. Consistent with our findings obtained in human samples, a 2- to 3-fold increase in endothelial CD74 protein levels was observed in lungs of MCT-injected rats when compared with their control rats (Figure 4B and C).

Efficacy of treatment with the MIF antagonist ISO-1 on the progression of MCT-induced PH and on the abnormal pulmonary endothelial proinflammatory phenotype

Daily treatment with MIF antagonist ISO-1 started 2 weeks after a subcutaneous MCT injection substantially attenuated the abnormal pulmonary endothelial proinflammatory phenotype and reversed established PH (Figure 5). On day-21, in rats treated with vehicle, a marked increase in mean pulmonary arterial pressure (mPAP), right ventricular hypertrophy (RVH) and numbers of muscularized distal pulmonary arteries were found compared with controls (Figure 5A and B). In contrast, when rats were given ISO-1 and compared to vehicle-treated rats, these hemodynamic parameters as well as the pulmonary vascular remodeling were substantially attenuated. To investigate the efficacy of ISO-1 treatment on the abnormal pulmonary endothelial proinflammatory phenotype, we conducted parallel evaluations of pulmonary infiltration. On day-21, numbers of CD45-, CD3- and CD68-positive cells were markedly decreased when compared to vehicle-treated rats (Figure 5C).

DISCUSSION

Both inflammation and pulmonary endothelial dysfunction are intertwined with the initiation and progression of PAH. Herein, we report, for the first time, evidence that MIF/ CD74 signaling system contributes to the endothelial proinflammatory phenotype in PAH. We showed that dysfunctional pulmonary ECs from iPAH patients exhibit a steady state

proinflammatory phenotype *in situ* and *in vitro*, characterized not only by an increased expression/secretion of key cytokines and chemokines for PAH but also by a marked expression of key cell adhesion molecules. We also found that MIF protein levels are increased in serum of PAH patients as compared to controls and that T-cell lymphocytes represent a cause of this overabundance. In addition, we showed that CD74 is highly expressed in the endothelium of muscularized distal pulmonary arteries as well as in cultured pulmonary ECs from PAH and contributes to an exaggerated recruitment of PBMCs to pulmonary PAH ECs. Finally, we found that daily treatment of rats with MIF antagonist ISO-1 for 2 weeks started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuates the abnormal pulmonary endothelial proinflammatory phenotype and partially reverses established PH, as assessed by mPAP, RVH, and pulmonary arterial muscularization.

The study presented here is the first to provide direct experimental proof that pulmonary ECs from iPAH patients exhibit a steady state proinflammatory phenotype *in situ* and *in vitro*. Our data clearly show that dysfunctional pulmonary ECs from iPAH patients abnormally express high levels of the integrin ligands ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, and P-selectin. Leukocyte recruitment and arrest are central steps in inflammatory reactions and associated diseases, including PAH (Stacher et al., 2012). Histopathologically, pulmonary vascular lesions occurring in patients with PAH as well as in experimental PH are characterized by varying degrees of perivascular inflammatory infiltrates, comprising of T and B lymphocytes, macrophages, dendritic and mast cells. Recently, correlations of the average perivascular inflammation score with intima plus media and adventitia thickness respectively, and with mPAP has been found, strongly supporting an important role of perivascular inflammation in the processes of vascular remodeling (Stacher et al., 2012). Beyond altered perivascular accumulation, circulating levels of certain cytokines and chemokines are abnormally elevated, i.e. IL-1 β , IL-6, IL-8, MCP-1, fractalkine, CCL5/RANTES and TNF- α and these have been

reported to correlate with a worse clinical outcome in PAH patients. Here, we showed that primary early (< 3) passage cultures of human ECs established from lung tissue obtained from iPAH patients also expressed high levels of different key cytokines and chemokines, namely IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-12, and MCP-1. Although transforming growth factor-beta (TGF- β)/bone morphogenic protein (BMP) signaling is involved in the pathogenesis of PAH and is able to modulate key inflammatory genes (Csiszar et al., 2006; Davies et al., 2012; Helbing et al., 2011; Sorescu et al., 2003), we did not find any differences between PAH patients carrying a BMP receptor 2 mutation and noncarriers.

Signaling of MIF through CD74 leads to proinflammatory and anti-apoptotic functions. Here, we obtained direct evidences that CD74 and its signaling through MIF are key players at the crossroad of inflammation and endothelial dysfunction in the pathogenesis of PAH. Pretreatment with MIF induces a substantial increase in the amount of bound PBMCs on confluent EC monolayers of both iPAH and control pulmonary ECs. We also show that decreasing CD74 signaling by RNA interference diminishes the amount of bound PBMCs on confluent EC monolayers, whereas overexpressing CD74 signaling by a plasmid-based expression vector substantially enhances this amount of bound PBMCs. Finally, we find that pulmonary infiltration of monocrotaline-injected rats chronically treated with MIF antagonist ISO-1 is substantially reduced. Consistent with our findings, Bernhagen and colleagues (Bernhagen et al., 2007) have demonstrated that the inhibition of CD74 with neutralizing antibodies reduced MIF-dependent monocyte arrest on *ex vivo* carotid arteries from apolipoprotein E-deficient (ApoE $^{-/-}$) mice. In addition, Takahashi and colleagues (Takahashi et al., 2009) obtained clear evidence that the presence of MIF in the alveolar space results in neutrophil accumulation via activation of the CD74. Furthermore, Fan and colleagues (Fan et al., 2011) have clearly demonstrated that exogenous MIF-induced leukocyte adhesion and transmigration were severely impaired transgenic mice deficient in CD74. In both CD74 and

MIF deficient mice, it was shown that MCP-1-induced monocyte arrest and endothelial transmigration were impaired (Fan et al., 2011).

CD74 is present in limited amounts in normal tissues but widely expressed in iPAH patients lungs, supporting the hypothesis that it is an attractive target for therapy. Here, we found that daily treatment of rats with MIF antagonist ISO-1 for 2 weeks started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection partially regress established PH, as assessed by mPAP, RVH, and pulmonary arterial muscularization. In addition, several studies have demonstrated that CD74 confers resistance to apoptosis and the presence of CD74 overexpression in various cancers (Meyer-Siegler et al., 2006; Meyer-Siegler et al., 2005; Monges et al., 1996; Verjans et al., 2009). MIF blockage during the initial stages of tumor growth inhibits EC proliferation, leading to tumor size reduction (Chesney et al., 1999). Thus, it was suggested that MIF could function as a growth factor stimulating growth and tumor invasion, representing a therapeutical target in cancer (Borghese and Clanchy, 2011) and that CD74 could serve as a tumor progression marker (Young et al., 2001). Numerous animal studies have already demonstrated that MIF-neutralizing antibodies could provide beneficial effects in various disease states, including asthma, severe infections and certain cancers (Calandra et al., 2000; Gadjeva et al., 2010; Leech et al., 1998; Morand, 2005; Schober et al., 2004).

In summary, our study provides the first *in situ* and *in vitro* demonstration that pulmonary ECs from iPAH patients exhibit a steady state proinflammatory phenotype. Furthermore, our findings underscore for the first time the critical role of MIF and CD74 in this process. Chronic treatment with MIF antagonist ISO-1 in the monocrotaline-induced PH model revealed reduced disease progression, decreased pulmonary infiltration and vascular

remodeling. We therefore report strong evidence that MIF and its signaling through CD74 could be key players at the crossroad of inflammation, cancer-like phenotype and endothelial dysfunction in PAH pathogenesis.

METHODS

Study population

For the *in vitro* and *in situ* studies, we used lung specimens obtained during lung transplantation in patients with idiopathic (iPAH) or heritable (hPAH) PAH and during lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer in control subjects (Supplemental Table 1 for clinical data). The lung specimens from the controls were collected at a distance from the tumor foci. This study was approved by the local ethics committee (CPP Ile-de-France VII, Le Kremlin-Bicêtre, France). All patients gave informed consent before the study.

Isolation, culture and functional analyses of human pulmonary endothelial cells (ECs)

Human pulmonary ECs were isolated and cultured as previously described (de Man et al., 2012; Guignabert et al., 2009b; Huertas et al., 2012; Tu et al., 2012; Tu et al., 2011). To suppress CD74 expression, pulmonary ECs were transfected using lipofectamine RNAiMAX with 100 nM of CD74 siRNA or with a scrambled sequence (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). To overexpress CD74, pulmonary ECs were transfected using lipofectamine 2000 with 1 µg of a full-length human CD74 (p35 isoform) construct in the pcDNA 3.1/v5-HisToPo (Binsky et al., 2007) kindly provided by Pr. Richard Bucala (Yale University School of Medicine, New Haven, CT, USA). The cells were studied within 3 days after transfection. Suppression or overexpression of CD74 levels was documented 72 hours after transfection. Human PBMCs were isolated from whole blood using ficoll-based and labelled with

dichlorofluorescein (Molecular Probes). PBMCs (1×10^6 cells/ 6-well-plate) were added for 3h to confluent iPAH or control EC monolayers previously labelled with CellTrackerTM probes (Molecular probes) and preincubated or not for 16 h with MIF (100 ng/ml). Non-adherent PBMCs were then removed and nuclei labelled with DAPI. The total number of adherent PBMCs was determined in 3 high-powered fields/ well acquired with a fluorescence microscope Nikon Eclipse 80i and NIS-Elements BR 2.30 software.

Total RNA isolation and *real-time* quantitative PCR

The mRNA expression of IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, P-selectin and E-selectin was measured by *real-time* quantitative PCR as previously described (Guignabert et al., 2005; Guignabert et al., 2009b; Tu et al., 2011).

Western blot, ELISA, and Immunostaining

Cells/tissues were homogenized and sonicated in PBS containing protease and phosphatase inhibitors and 30 μ g of protein was used to detect CD74, ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and β -actin (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) as previously described (Tu et al., 2011). Concentrations in platelet-derived growth factor IL-6, and MCP-1 in serum were evaluated using Quantikine (R&D Systems, Lille, France) according to the manufacturer instructions. Immunohistochemistry and immunocytofluorescent staining were performed as previously described (El-Bizri et al., 2008; Guignabert et al., 2009b; Tu et al., 2011). Images were taken using LSM700 confocal microscope and analyzed using Zen software (Zeiss).

Rodent models of pulmonary hypertension

Animal studies were approved by the administrative panel on animal care at the Univ. Paris-Sud, Le Plessis-Robinson, France. Young male Wistar rats (100 g, Janvier) were either studied 3 weeks after a single subcutaneous injection of monocrotaline (60 mg/Kg) or vehicle (Guignabert et al., 2005), or 3 weeks after chronic exposure to hypoxia (10% oxygen) or in room air (Guignabert et al., 2009a). Animals were anesthetized with isoflurane. A polyvinyl catheter was introduced into the right jugular vein and pushed through the right ventricle into the pulmonary artery. Another polyethylene catheter was inserted into the right carotid artery. After measurement of hemodynamic parameters, the thorax was opened and the left lung immediately removed and frozen. The right lung was fixed in the distended state with formalin buffer. The right ventricular hypertrophy (RVH) index and the percentage of muscularized vessels were determined as previously described (Guignabert et al., 2009b).

Statistical Analyses

The data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was tested using the nonparametric Mann-Whitney test or two-way ANOVA with Bonferroni post hoc tests. Significant difference was assumed at a p value of < 0.05 .

Online Supplemental Material

A detailed materials and methods section, Supplement Figures S1, and references for the supplement section are found in the Online Supplemental Material.

Acknowledgments: We would like to thank Pr Richard Bucala for kindly providing the pcDNA3.1-CD74 plasmid. We also thank Dr. Elodie Gouadon and Dr. Veronique Capuano for their very helpful technical assistance.

Funding sources: This research was supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM) and the French National Agency for Research: grant no. ANR_12_JSV1_0004_01.

Conflict of Interest Disclosures: None

Abbreviations: D-dopachrome tautomerase: DDT; endothelial cell: EC; interleukin: IL; intercellular adhesion molecule-1: ICAM-1; major histocompatibility complex: MHC; mean pulmonary arterial pressure: mPAP; monocrotaline: MCT; monocyte chemotactic protein: MCP-1; peripheral blood mononuclear cells: PBMCs; pulmonary arterial hypertension: PAH; right ventricular hypertrophy: RVH; right ventricular systolic pressure: RVSP; vascular cell adhesion molecule-1: VCAM-1.

References:

- Bernhagen, J., R. Krohn, H. Lue, J.L. Gregory, A. Zernecke, R.R. Koenen, M. Dewor, I. Georgiev, A. Schober, L. Leng, T. Kooistra, G. Fingerle-Rowson, P. Ghezzi, R. Kleemann, S.R. McColl, R. Bucala, M.J. Hickey, and C. Weber. 2007. MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment. *Nature medicine* 13:587-596.
- Binsky, I., M. Haran, D. Starlets, Y. Gore, F. Lantner, N. Harpaz, L. Leng, D.M. Goldenberg, L. Shvidel, A. Berrebi, R. Bucala, and I. Shachar. 2007. IL-8 secreted in a macrophage migration-inhibitory factor- and CD74-dependent manner regulates B cell chronic lymphocytic leukemia survival. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:13408-13413.
- Borghese, F., and F.I. Clanchy. 2011. CD74: an emerging opportunity as a therapeutic target in cancer and autoimmune disease. *Expert opinion on therapeutic targets* 15:237-251.
- Calandra, T., B. Echtenacher, D.L. Roy, J. Pugin, C.N. Metz, L. Hultner, D. Heumann, D. Mannel, R. Bucala, and M.P. Glauser. 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature medicine* 6:164-170.
- Chesney, J., C. Metz, M. Bacher, T. Peng, A. Meinhardt, and R. Bucala. 1999. An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 5:181-191.
- Csiszar, A., M. Ahmad, K.E. Smith, N. Labinsky, Q. Gao, G. Kaley, J.G. Edwards, M.S. Wolin, and Z. Ungvari. 2006. Bone morphogenetic protein-2 induces proinflammatory endothelial phenotype. *The American journal of pathology* 168:629-638.
- Damico, R., T. Simms, B.S. Kim, Z. Tekeste, H. Amankwan, M. Damarla, and P.M. Hassoun. 2011. p53 mediates cigarette smoke-induced apoptosis of pulmonary endothelial cells:

- inhibitory effects of macrophage migration inhibitor factor. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 44:323-332.
- Davies, R.J., A.M. Holmes, J. Deighton, L. Long, X. Yang, L. Barker, C. Walker, D.C. Budd, P.D. Upton, and N.W. Morrell. 2012. BMP type II receptor deficiency confers resistance to growth inhibition by TGF-beta in pulmonary artery smooth muscle cells: role of proinflammatory cytokines. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 302:L604-615.
- Davis, B.B., Y.H. Shen, D.J. Tancredi, V. Flores, R.P. Davis, and K.E. Pinkerton. 2012. Leukocytes are recruited through the bronchial circulation to the lung in a spontaneously hypertensive rat model of COPD. *PloS one* 7:e33304.
- de Man, F.S., L. Tu, M.L. Handoko, S. Rain, G. Ruiter, C. Francois, I. Schaliq, P. Dorfmuller, G. Simonneau, E. Fadel, F. Perros, A. Boonstra, P.E. Postmus, J. van der Velden, A. Vonk-Noordegraaf, M. Humbert, S. Eddahibi, and C. Guignabert. 2012. Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186:780-789.
- El-Bizri, N., C. Guignabert, L. Wang, A. Cheng, K. Stankunas, C.P. Chang, Y. Mishina, and M. Rabinovitch. 2008. SM22alpha-targeted deletion of bone morphogenetic protein receptor 1A in mice impairs cardiac and vascular development, and influences organogenesis. *Development* 135:2981-2991.
- Eriksson, E.E. 2004. Mechanisms of leukocyte recruitment to atherosclerotic lesions: future prospects. *Current opinion in lipidology* 15:553-558.
- Fan, H., P. Hall, L.L. Santos, J.L. Gregory, G. Fingerle-Rowson, R. Bucala, E.F. Morand, and M.J. Hickey. 2011. Macrophage migration inhibitory factor and CD74 regulate macrophage chemotactic responses via MAPK and Rho GTPase. *J Immunol* 186:4915-4924.

- Gadjeva, M., J. Nagashima, T. Zaidi, R.A. Mitchell, and G.B. Pier. 2010. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor ameliorates ocular *Pseudomonas aeruginosa*-induced keratitis. *PLoS pathogens* 6:e1000826.
- Gore, Y., D. Starlets, N. Maharshak, S. Becker-Herman, U. Kaneyuki, L. Leng, R. Bucala, and I. Shachar. 2008. Macrophage migration inhibitory factor induces B cell survival by activation of a CD74-CD44 receptor complex. *The Journal of biological chemistry* 283:2784-2792.
- Gregory, J.L., E.F. Morand, S.J. McKeown, J.A. Ralph, P. Hall, Y.H. Yang, S.R. McColl, and M.J. Hickey. 2006. Macrophage migration inhibitory factor induces macrophage recruitment via CC chemokine ligand 2. *J Immunol* 177:8072-8079.
- Guignabert, C., C.M. Alvira, T.P. Alastalo, H. Sawada, G. Hansmann, M. Zhao, L. Wang, N. El-Bizri, and M. Rabinovitch. 2009a. Tie2-mediated loss of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in mice causes PDGF receptor-beta-dependent pulmonary arterial muscularization. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 297:L1082-1090.
- Guignabert, C., B. Raffestin, R. Benferhat, W. Raoul, P. Zadigue, D. Rideau, M. Hamon, S. Adnot, and S. Eddahibi. 2005. Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 111:2812-2819.
- Guignabert, C., L. Tu, M. Izikki, L. Dewachter, P. Zadigue, M. Humbert, S. Adnot, E. Fadel, and S. Eddahibi. 2009b. Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *Faseb J* 23:4135-4147.
- Helbing, T., R. Rothweiler, E. Ketterer, L. Goetz, J. Heinke, S. Grundmann, D. Duerschmied, C. Patterson, C. Bode, and M. Moser. 2011. BMP activity controlled by BMPER regulates the proinflammatory phenotype of endothelium. *Blood* 118:5040-5049.

- Huertas, A., L. Tu, N. Gambaryan, B. Girerd, F. Perros, D. Montani, D. Fabre, E. Fadel, S. Eddahibi, S. Cohen-Kaminsky, C. Guignabert, and M. Humbert. 2012. Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *The European respiratory journal* 40:895-904.
- Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J.F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, V. Cottin, B. Degano, X. Jais, D. Montani, R. Souza, and G. Simonneau. 2010. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 122:156-163.
- Leech, M., C. Metz, L. Santos, T. Peng, S.R. Holdsworth, R. Bucala, and E.F. Morand. 1998. Involvement of macrophage migration inhibitory factor in the evolution of rat adjuvant arthritis. *Arthritis and rheumatism* 41:910-917.
- Leng, L., C.N. Metz, Y. Fang, J. Xu, S. Donnelly, J. Baugh, T. Delohery, Y. Chen, R.A. Mitchell, and R. Bucala. 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *The Journal of experimental medicine* 197:1467-1476.
- Lue, H., M. Thiele, J. Franz, E. Dahl, S. Speckgens, L. Leng, G. Fingerle-Rowson, R. Bucala, B. Luscher, and J. Bernhagen. 2007. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* 26:5046-5059.
- Meyer-Siegler, K.L., K.A. Iczkowski, L. Leng, R. Bucala, and P.L. Vera. 2006. Inhibition of macrophage migration inhibitory factor or its receptor (CD74) attenuates growth and invasion of DU-145 prostate cancer cells. *J Immunol* 177:8730-8739.

- Meyer-Siegler, K.L., K.A. Iczkowski, and P.L. Vera. 2005. Further evidence for increased macrophage migration inhibitory factor expression in prostate cancer. *BMC cancer* 5:73.
- Miller, E.J., J. Li, L. Leng, C. McDonald, T. Atsumi, R. Bucala, and L.H. Young. 2008. Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature* 451:578-582.
- Monges, G.M., J.F. Seitz, M.F. Giovannini, J.M. Gouvernet, M.A. Torrente, and J.A. Hassoun. 1996. Prognostic value of p53 protein expression in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer detection and prevention* 20:63-67.
- Morand, E.F. 2005. New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Internal medicine journal* 35:419-426.
- Schober, A., J. Bernhagen, M. Thiele, U. Zeiffer, S. Knarren, M. Roller, R. Bucala, and C. Weber. 2004. Stabilization of atherosclerotic plaques by blockade of macrophage migration inhibitory factor after vascular injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 109:380-385.
- Sorescu, G.P., M. Sykes, D. Weiss, M.O. Platt, A. Saha, J. Hwang, N. Boyd, Y.C. Boo, J.D. Vega, W.R. Taylor, and H. Jo. 2003. Bone morphogenic protein 4 produced in endothelial cells by oscillatory shear stress stimulates an inflammatory response. *The Journal of biological chemistry* 278:31128-31135.
- Stacher, E., B.B. Graham, J.M. Hunt, A. Gandjeva, S.D. Groshong, V.V. McLaughlin, M. Jessup, W.E. Grizzle, M.A. Aldred, C.D. Cool, and R.M. Tuder. 2012. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186:261-272.

- Takahashi, K., K. Koga, H.M. Linge, Y. Zhang, X. Lin, C.N. Metz, Y. Al-Abed, K. Ojamaa, and E.J. Miller. 2009. Macrophage CD74 contributes to MIF-induced pulmonary inflammation. *Respiratory research* 10:33.
- Tillmann, S., J. Bernhagen, and H. Noels. 2013. Arrest Functions of the MIF Ligand/Receptor Axes in Atherogenesis. *Frontiers in immunology* 4:115.
- Tu, L., F.S. De Man, B. Girerd, A. Huertas, M.C. Chaumais, F. Lecerf, C. Francois, F. Perros, P. Dorfmuller, E. Fadel, D. Montani, S. Eddahibi, M. Humbert, and C. Guignabert. 2012. A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *American journal of respiratory and critical care medicine* 186:666-676.
- Tu, L., L. Dewachter, B. Gore, E. Fadel, P. Darteville, G. Simonneau, M. Humbert, S. Eddahibi, and C. Guignabert. 2011. Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* 45:311-322.
- Verjans, E., E. Noetzel, N. Bektas, A.K. Schutz, H. Lue, B. Lennartz, A. Hartmann, E. Dahl, and J. Bernhagen. 2009. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer. *BMC cancer* 9:230.
- Voelkel, N.F., J. Gomez-Arroyo, A. Abbate, H.J. Bogaard, and M.R. Nicolls. 2012. Pathobiology of pulmonary arterial hypertension and right ventricular failure. *The European respiratory journal* 40:1555-1565.
- Young, A.N., M.B. Amin, C.S. Moreno, S.D. Lim, C. Cohen, J.A. Petros, F.F. Marshall, and A.S. Neish. 2001. Expression profiling of renal epithelial neoplasms: a method for tumor classification and discovery of diagnostic molecular markers. *The American journal of pathology* 158:1639-1651.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Pulmonary ECs from iPAH patients exhibit a steady state proinflammatory phenotype.

A: Gene expression analysis of primary early (< 3) passage cultures of human pulmonary ECs established from lung tissue obtained from control (CTR) and iPAH patients. **B:** Effects of conditioned media of quiescent cultured human pulmonary ECs from patients with CTR and iPAH on the migratory capacity of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). **C:** Adhesion of PBMCs to confluent monolayers of pulmonary ECs from patients with CTR and iPAH. NS: non significant; * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 compared with CTR pulmonary ECs. Scale bar = 20 μ m in all sections.

Figure 2. Dysregulation of the MIF/ CD74 signaling pathway in PAH.

A: Levels of circulating MIF and DDT proteins in the serum of patients with PAH compared with those from controls. **B:** MIF protein levels in human PBMCs using 2-color staining on freshly purified cells using FITC-coupled antibodies specific for CD3 (T lymphocytes), CD20 (B lymphocytes), and CD14 (monocytes). **C:** Representative photomicrographs of CD74 immunostaining in distal pulmonary arteries in lung sections from controls and iPAH patients. **D:** Representative Western blots and quantification of the CD74/ β -actin ratio in pulmonary ECs from patients with CTR and iPAH patients. Values are means \pm SEM (n=5). NS: non significant; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 compared with CTR pulmonary ECs. Scale bar = 50 μ m in all sections.

Figure 3. MIF/ CD74 is involved in the endothelial proinflammatory phenotype and leucocyte recruitment in PAH.

A: Adhesion of PBMCs to confluent monolayers of pulmonary ECs from patients with CTR and iPAH with or without a pretreatment for 24 h with 100ng/mL of MIF. **B:** Adhesion of PBMCs to confluent monolayers of pulmonary ECs from CTR with or without CD74 inhibition by RNA-interference and with or without CD74

overexpression using a full-length human CD74 (p35 isoform) construct cloned in the pcDNA 3.1/v5-HisToPo (pcDNA3.1-CD74 plasmid). Values are means \pm SEM (n=5). * p-value < 0.05; *** p-value < 0.001 compared with untreated CTR pulmonary ECs or cells transfected with the scrambled sequence. Scale bar = 20 μ m in all sections.

Figure 4. Dysregulation of the MIF/ CD74 signaling pathway in two animal models

pulmonary hypertension (PH). **A:** Levels of circulating MIF proteins in the serum of monocrotaline-injected rats and control animals, and in the serum from rats exposed to chronic hypoxia or to room air. **B:** Representative photomicrographs of CD74 immunostaining in distal pulmonary arteries in lung sections from monocrotaline-injected rats and control animals. **C:** Representative Western blots and quantification of the CD74/ β -actin ratio in in lungs from monocrotaline-injected rats and controls. Values are means \pm SEM (n=5). * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 compared with vehicle-injected rats. Scale bar = 50 μ m in all sections.

Figure 5. Evaluation of the efficacy of ISO-1 treatment on the progression of MCT-induced PH and on the abnormal pulmonary endothelial proinflammatory phenotype.

A: RVSP, mPAP, and RVH. **B:** Representative images of hematoxylin-eosin staining and alpha-smooth muscle actin (α SM-actin) and quantification of the percentage of muscularized distal pulmonary arteries. **C:** Representative images of immunostainings in rat lungs for CD45 (leucocyte common antigen) CD3 (T-lymphocytes), and CD68 (macrophages). Values are means \pm SEM (n=5). * p-value < 0.05; ** p-value < 0.01; *** p-value < 0.001 compared with vehicle-injected rats. Scale bar = 50 μ m in all sections.

Fig 1.

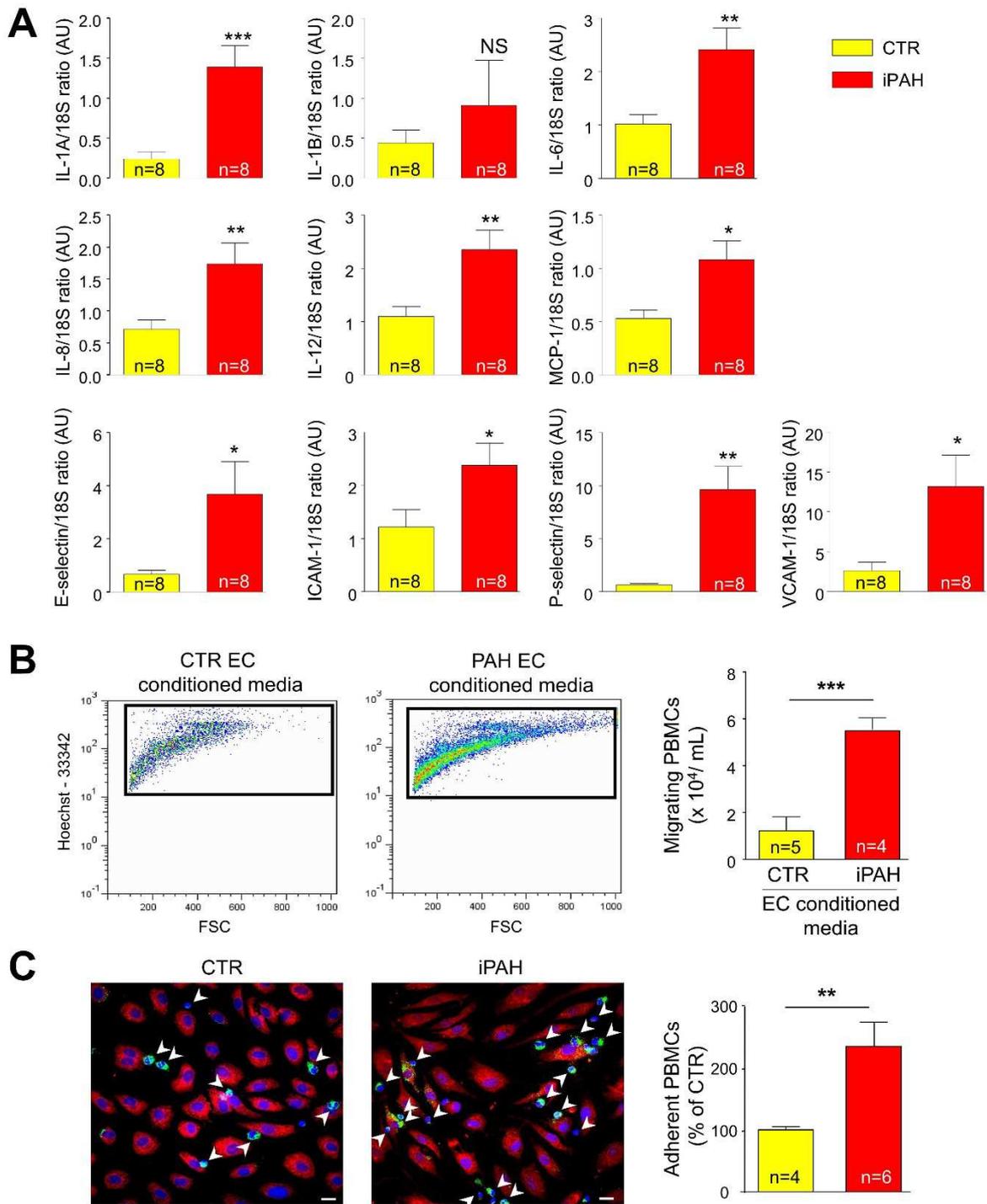


Fig 2.

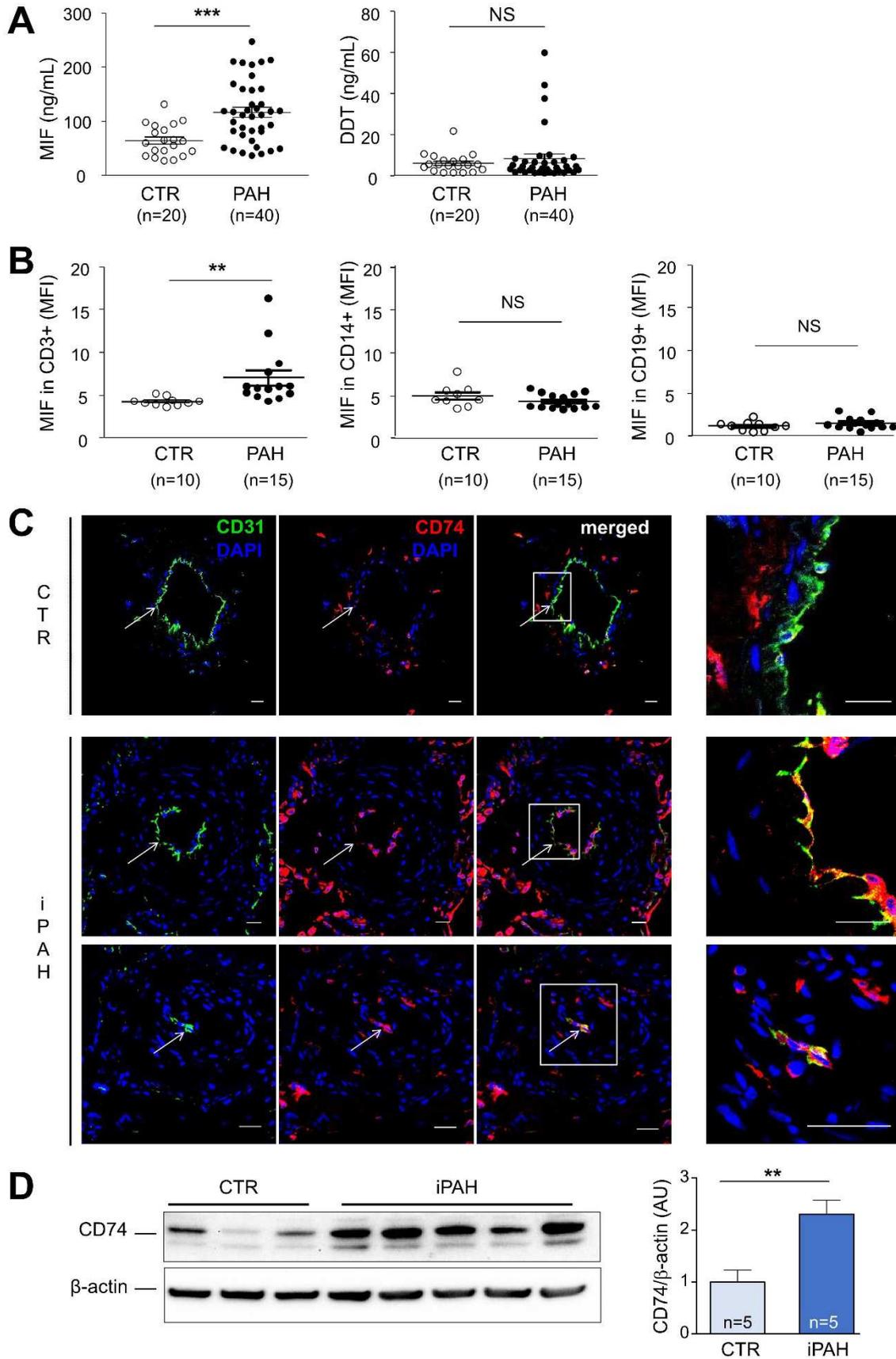


Fig 3.

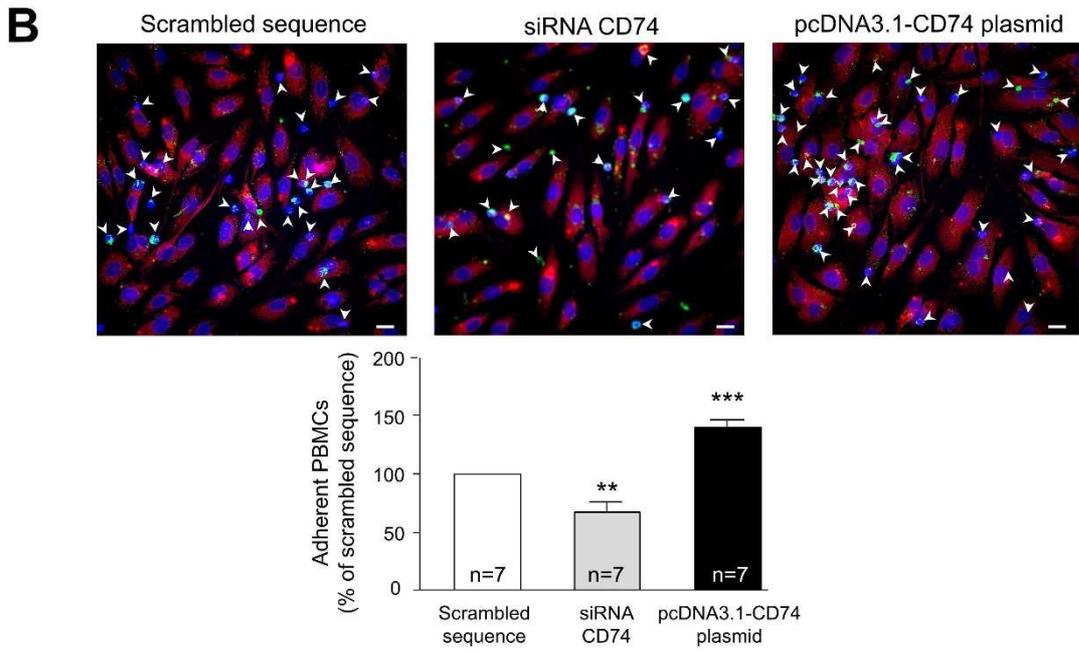
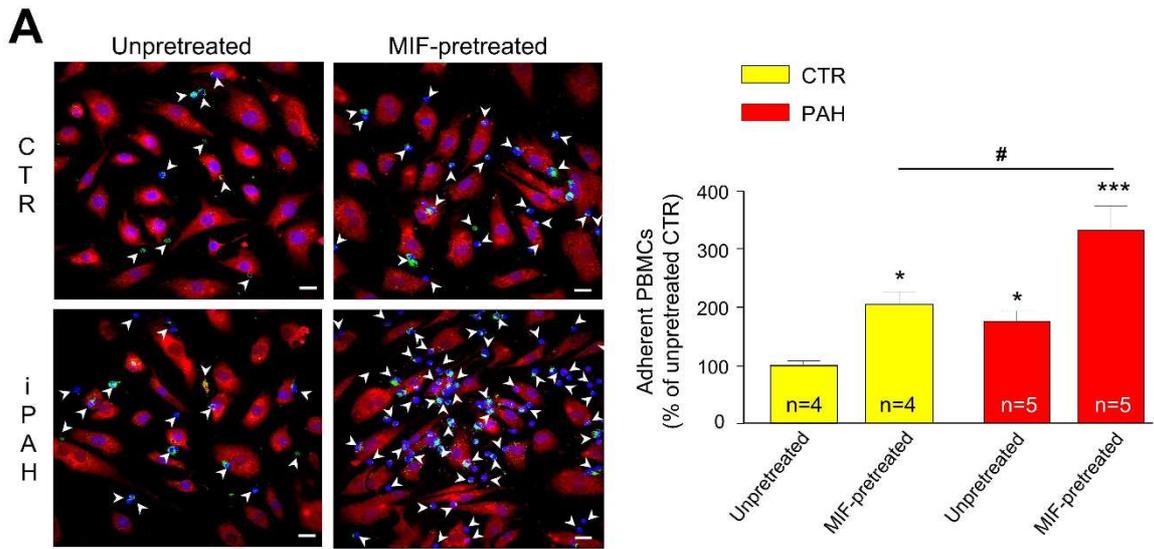
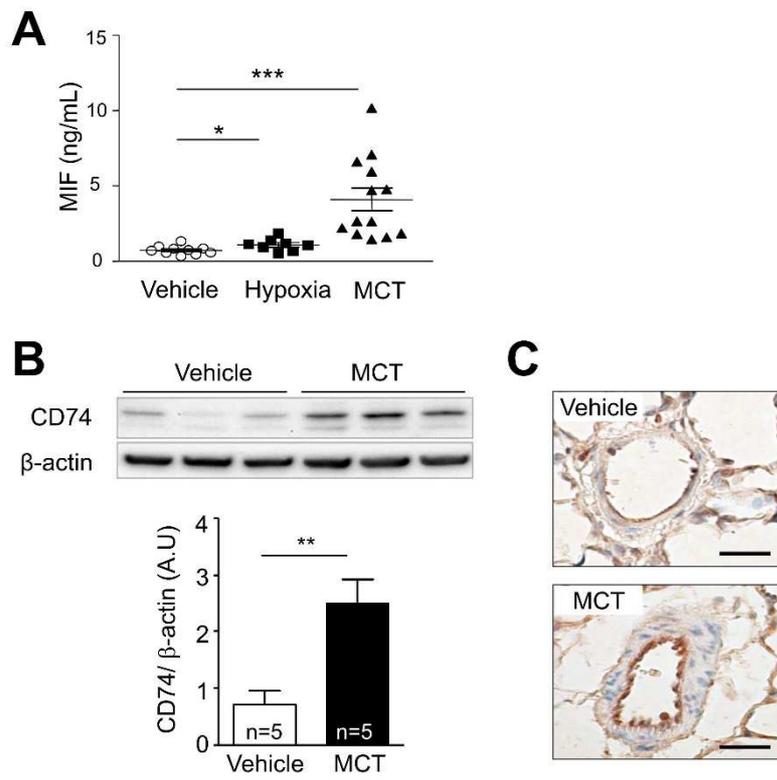
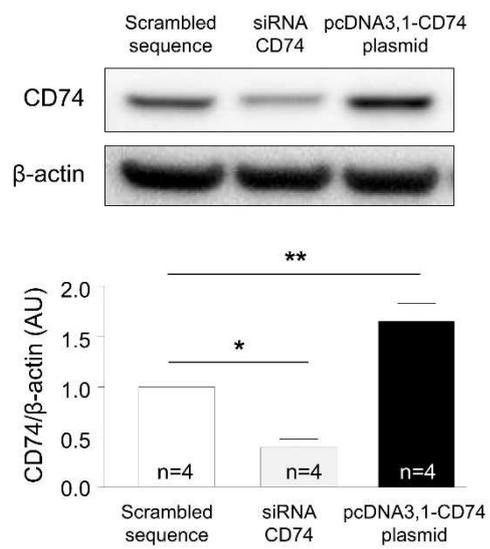


Fig 4.



Supplemental Fig S1.



DISCUSSION ET CONCLUSIONS

DISCUSSION

Malgré les nombreuses preuves d'un phénotype anormal des cellules endothéliales pulmonaires dans l'HTAP et les travaux qui ont démontré que cette dysfonction endothéliale jouait un rôle clé dans la physiopathologie de la maladie, les liens entre endothélium et système immunitaire dans l'HTAP sont obscurs et peu étudiés. De plus, de nombreuses évidences montrent qu'il existe une dysfonction immunitaire chez les patients HTAP même si les mécanismes exacts n'en sont pas encore élucidés. De nombreuses questions restent donc encore sans réponse concernant, en particulier, la nature exacte du possible lien qui existe entre endothélium et système immunitaire d'une part, et si, d'autre part, la dysfonction immunitaire représente une cause ou une conséquence de la maladie.

C'est pour répondre à ces questions que nous avons voulu, à travers ce travail de thèse, **étudier et mieux comprendre la nature et les conséquences d'une communication aberrante entre cellules endothéliales et système immunitaire dans la pathogénèse de l'HTAP, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.** Pour cela, nous avons analysé le rôle de la dysfonction endothéliale dans la régulation de deux processus de la dysfonction immunitaire : l'autoimmunité pour la réponse adaptative d'une part, et la sécrétion de cytokines en ce qui concerne la réponse innée d'autre part.

Nous sommes partis de l'hypothèse qu'il existait une communication aberrante entre cellules endothéliales et cellules immunes dans l'HTAP et que **la dysfonction endothéliale contribuait à l'immunopathogénèse de la maladie en régulant la fonction d'éléments clés des réponses immunes, adaptatives ou innées.**

Nous avons commencé ce travail de thèse en nous interrogeant sur l'altération du système immunitaire chez les patients atteints d'HTAP et sur le rôle que pouvaient jouer des réponses immunes altérées dans l'immunopathogénèse de l'HTAP, que celles-ci soient de type adaptatif ou inné. Nous nous sommes tout d'abord penchés sur l'étude des facteurs qui contribuent au développement de l'autoimmunité, à savoir les lymphocytes T régulateurs. En effet, les Treg sont les cellules clés de l'immunorégulation de par leur capacité à réprimer

les réactions autoimmunes. Malgré le fait qu'il y ait de nombreuses évidences de mécanismes autoimmuns dans l'HTAP, les Treg et leur fonction n'étaient jusqu'à présent pas caractérisés, chez les patients atteints d'HTAP. En effet, des études divergentes montraient que les Treg étaient altérés en nombre, comme c'est le cas dans plusieurs maladies autoimmunes. Ces travaux reportent des données critiquables car, en plus de faiblesses méthodologiques dans le phénotypage des Treg, les résultats restent descriptifs (Ulrich *et al.* 2008 ; Perros *et al.* 2008 ; Austin *et al.* 2010). Nous avons pu montrer, à travers notre **premier travail**, que les Treg des patients atteints d'HTAP idiopathique présentaient une diminution de leur capacité fonctionnelle, mesurée par le niveau de phosphorylation de la voie de signalisation STAT3. En revanche, nous avons trouvé que les patients atteints d'HTAPi présentaient un nombre physiologique de Treg. Ces résultats étaient tout à fait comparables aux patients atteints d'HTAP associée à la sclérodémie, maladie auto-immune. Aux vues de la littérature sur le rôle de la leptine en tant que cytokine immunomodulatrice, nous avons émis l'hypothèse que la leptine pouvait jouer un rôle dans l'immunopathogénèse de l'HTAP en contrôlant la fonction des Treg. Nous avons donc cherché à comprendre quel pouvait être le rôle de la leptine dans l'HTAP. D'une part, nous avons mis en évidence, dans ce premier travail, que la leptine était augmentée chez les patients atteints d'HTAP idiopathique ou associée à une sclérodémie. D'autre part, nous avons également montré qu'il y avait une surexpression du récepteur de la leptine ObR à la surface des Treg. Nous avons donc émis l'hypothèse que l'augmentation de leptine et de son récepteur étaient liées à la diminution de fonction des Treg. Nous avons donc exposé *in vitro* des cellules mononucléées humaines, isolées du sang périphérique, à de la leptine et nous avons ainsi pu montrer que les Treg étaient inhibés en présence de leptine, suggérant que la leptine contrôle les Treg *via* son récepteur surexprimé dans l'HTAP. Ce premier travail a clairement montré l'altération du système immunitaire chez les patients HTAP, en particulier dans la perte de la tolérance du soi normalement exercée par les Treg. Nos résultats indiquent également que les Treg des patients atteints par la forme idiopathique d'HTAP présentent les mêmes caractéristiques que les Treg de patients atteints d'HTAP associée à une sclérodémie, ce qui suggère des mécanismes communs entre maladie auto-immune proprement dite et HTAP. De façon intéressante, nous avons également mis en évidence un rôle potentiel de la leptine dans l'HTAP, en particulier comme modulateur de

l'immunopathogénèse de l'HTAP. Ces résultats suggèrent ainsi que la leptine et/ou son récepteur pourrait représenter une cible thérapeutique intéressante dans l'HTAP.

La leptine est avant tout connue en tant qu'hormone de la satiété et les adipocytes en représentent bien sûr la source principale. Malgré le rôle prépondérant des cellules de la masse adipeuse dans la production de leptine, d'autres tissus sont aussi connus pour leur capacité à synthétiser cette hormone. Nous avons émis l'hypothèse que la leptine pouvait être synthétisée spécifiquement au niveau pulmonaire chez les patients atteints d'HTAP, et en particulier par les composants de la paroi vasculaire, notamment l'endothélium, pour plusieurs raisons : premièrement, pour l'existence d'une dysfonction endothéliale responsable de la synthèse aberrante de plusieurs facteurs de croissance ou cytokines, ce qui contribue au développement de la maladie ; deuxièmement, pour la présence d'une activation excessive du facteur de transcription induit par l'hypoxie, HIF-1 α , dans l'HTAP, la leptine étant un gène HIF-1 α -dépendant ; troisièmement, pour la topographie particulièrement de l'endothélium, en direct contact avec le flux sanguin, ce qui favorise le relargage direct dans la circulation sanguine des facteurs synthétisés. En utilisant des cellules endothéliales humaines, isolées à partir de poumons explantés au moment d'une transplantation, ou à distance d'une tumeur pour les sujets témoins, nous avons pu montrer que les cellules endothéliales produisaient environ cinq fois plus de leptine que les cellules endothéliales des sujets témoins. Ces premiers résultats suggéraient une contribution importante de l'endothélium à la dysfonction immunitaire chez les patients HTAP, *via* une synthèse excessive de leptine.

Ces données nous ont ainsi poussés à étudier plus en profondeur le rôle exercé par l'endothélium dans l'immunopathogénèse de l'HTAP, à travers le contrôle de mécanismes adaptatifs/autoimmuns ou innés, qui sont altérés dans la maladie. Nous avons d'abord émis l'hypothèse que si les cellules endothéliales contribuent à l'HTAP en synthétisant la leptine, alors la régulation de la leptine devrait influencer la sévérité de la maladie.

Cette hypothèse a été testée dans **deuxième travail**, à travers deux stratégies complémentaires : l'utilisation d'animaux transgéniques déficients en récepteur de la leptine (ZDF/Lepr fa/fa) d'une part, et d'animaux sauvages traités au dichloroacétate, inhibiteurs de HIF-1 α pour bloquer la synthèse de leptine d'autre part, dans le modèle expérimental d'hypertension pulmonaire, l'hypoxie chronique. Dans ces deux modèles, nous avons pu démontrer qu'en bloquant l'action de la leptine ou en inhibant sa synthèse, les animaux

développaient une hypertension pulmonaire moins sévère que les animaux contrôles et qu'ils avaient des Treg fonctionnels, contrairement aux contrôles respectifs. Cette étude montre clairement non seulement que le contrôle de la voie de signalisation de la leptine permet de protéger contre le développement de l'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique, mais également que l'endothélium contribue au développement de l'autoimmunité dans l'HTAP. Ces résultats pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, notamment dans le cadre du développement de l'autoimmunité dans l'HTAP.

Notre travail de thèse s'est également appuyé sur l'hypothèse que l'endothélium pulmonaire pouvait participer et contribuer, en tant qu'acteur actif, à la réponse innée du système immunitaire dans l'HTAP. Nous avons en effet émis l'hypothèse que la dysfonction endothéliale, en répondant à des divers stimuli, en particulier au facteur MIF, pouvait moduler les réponses inflammatoires exacerbées de l'HTAP. Nous avons voulu étudier le rôle du facteur MIF et de son récepteur endothélial CD74, comme possibles inducteurs d'un phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium pulmonaire dans l'HTAP. Ce complexe ligand/récepteur est en effet à l'origine de voies de signalisation importantes pour la survie et la prolifération cellulaire, induit la synthèse et la sécrétion de plusieurs facteurs clés pro-inflammatoires et d'adhésion cellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que la voie de signalisation MIF/CD74 était surexprimée chez les patients atteints d'HTAP et contribuait au phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium pulmonaire. Cette hypothèse a fait l'objet de notre **troisième travail**. Nous avons pu montrer que les niveaux de MIF circulant étaient anormalement élevés chez les patients HTAP et que les lymphocytes T en représentaient une source importante. De plus, nous avons observé une surexpression de CD74 à la surface des cellules endothéliales pulmonaires de patients HTAP, ce qui explique le recrutement excessif de PBMC à ce niveau. Enfin, dans le modèle d'HTP animale, induite par la monocrotaline, l'inhibition pharmacologique de MIF a permis la régression de l'HTAP, la diminution du relargage de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-6 et le MCP-1, ainsi que la diminution du recrutement de cellules inflammatoires. Par ces résultats, nous avons pu mettre en évidence que la dysfonction endothéliale dans l'HTAP contribuait également aux réponses innées excessives dans l'HTAP, en développant un phénotype pro-inflammatoire de façon

MIF-dépendante. La voie de signalisation de ce facteur pourrait donc représenter une nouvelle cible d'innovation thérapeutique.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

A travers ce travail de thèse, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'une communication aberrante entre endothélium pulmonaire et système immunitaire dans l'HTAP. En effet, à travers plusieurs mécanismes décrits dans ce travail, nous avons pu montrer que la dysfonction endothéliale participait à l'immunopathogénèse de l'HTAP, en contribuant à la dérégulation du système immunitaire présente dans cette maladie. Nous avons mis évidence que l'endothélium pulmonaire joue un rôle primordial dans le contrôle des réponses adaptatives, en régulant la fonction des Treg *via* la leptine, et dans la participation active à la réponse innée, en acquérant un phénotype pro-inflammatoire.

En élucidant ainsi le lien qui existe entre dysfonction endothéliale et altération du système immunitaire, nous émettons également l'hypothèse que ces voies de signalisation soient importantes dans le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans l'HTAP.

D'autres travaux seront nécessaires pour affiner nos connaissances sur cette communication aberrante entre endothélium et système immunitaire, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans l'HTAP.

TRAVAUX ANNEXES ET COLLABORATIFS

1. **A. Huertas**, S. Das, M. Emin, L. Sun, J. Rifkind, J. Bhattacharya, S. Bhattacharya. Erythrocytes induce proinflammatory endothelial activation in hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013 Jan;48(1):78-86.

Ce travail montre, qu'en hypoxie, les érythrocytes peuvent induire un phénotype pro-inflammatoire de l'endothélium pulmonaire à travers la sécrétion de peroxide d'hydrogène.

2. D. Montani, F. Perros, N. Gambaryan, B. Girerd, P. Dorfmuller, L.C. Price, **A. Huertas**, H. Hammad, B. Lambrecht, G. Simonneau, J-M. Launay, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert. C-kit positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Jul 1;184(1):116-23

Ce travail met en évidence la présence d'infiltrats c-kit positifs dans les lésions pulmonaires de patients HTAP, cellules qui pourraient contribuer au remodelage vasculaire pulmonaire.

3. L. Tu, FS. De Man, B. Girerd, **A. Huertas**, MC. Chaumais, F. Lecerf, C. François, F. Perros, P. Dorfmüller, E. Fadel, D. Montani, S. Eddahibi, M. Humbert, C. Guignabert. A Critical Role for p130Cas in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Oct 1;186(7):666-76

Ce travail montre que p130^{cas}, protéine adaptatrice qui intègre et amplifie la signalisation intracellulaire des récepteurs aux facteurs de croissance, est surexprimée dans l'HTAP et joue un rôle important dans la physiopathologie de la maladie. En effet, p130^{cas} contribue à la migration et à la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires et amplifie la signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase.

4. F. Perros, S. Cohen-Kaminsky, N. Gambaryan, B. Girerd, N. Raymond, I. Klingelschmitt, **A. Huertas**, O. Mercier, E. Fadel, G. Simonneau, M. Humbert, P. Dorfmüller D. Montani. Cytotoxic Cells and Granulysin in Pulmonary Arterial Hypertension and Veno-Occlusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Jan 15;187(2):189-96

Ce travail montre que les patients atteints de maladie veino-occlusive présentent des altérations dans des sous-populations de cellules immunitaires, en particulier des cellules cytotoxiques, associées à une dérégulation du gène *granulysine*, nécessaire à la fonction de ces cellules.

5. N. Gambaryan, S. Cohen-Kaminsky, D. Montani, B. Girerd, **A. Huertas**, A. Seferian, M. Humbert, F. Perros. Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2012 Jan;39(1):210-2

Ce travail suggère que le taux de fibrocytes circulants ne représente pas un facteur prédictif de l'activité de l'HTAP ni de sa progression.

6. N. Ricard, L. Tu, M. Le Hiress, **A. Huertas**, C. Phan, C. Sattler, E. Fadel, A. Seferian, D. Montani, P. Dorfmueller, M. Humbert, C. Guignabert. Endothelial-FGF-2 and IL-6 Promote Pericyte Coverage and Give Rise to Smooth Muscle-Like Cells in Pulmonary Hypertension. *Circulation, under review*

Ce travail met en évidence une altération du nombre de péricytes au niveau des artères pulmonaires de petit calibre chez les patients atteints d'HTAP, due à la dysfonction endothéliale présente chez ces patients, via IL-6 et FGF-2.

7. LC. Price, SJ. Wort, F. Perros, P. Dorfmueller, **A. Huertas**, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012 Jan;141(1):210-21

Cette revue générale prend en examen les différents aspects et les cellules clés de l'inflammation dans la pathogenèse de l'HTAP.

8. **A. Huertas**, B. Girerd, P. Dorfmueller, M. Humbert, D. Montani. Pulmonary veno-occlusive disease: a state of the art. *Expert Rev Respir Med* 2011 Apr;5(2):217-29 (*invited review*)

Cette revue générale souligne les caractéristiques de la maladie veino-occlusive, son diagnostic et sa prise en charge thérapeutique.

9. MC. Chaumais, M. Jobard, **A. Huertas**, C. Vignand-Courtin, M. Humbert, O. Sitbon, A. Rieutord, D. Montani. Pharmacokinetic evaluation of continuous intravenous epoprostenol. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010 Dec;6(12):1587-98.

Cette revue générale résume les données existant sur le traitement de l'HTAP par l'époprostenol et ses dérivés : pharmacocinétique, pharmacodynamique, efficacité clinique, effets secondaires et tolérabilité.

Erythrocytes Induce Proinflammatory Endothelial Activation in Hypoxia

Alice Huertas¹, Shonit R. Das¹, Memet Emin¹, Li Sun¹, Joseph M. Rifkind³, Jahar Bhattacharya¹, and Sunita Bhattacharya^{1,2}

¹Lung Biology Laboratory, Pulmonary Division, Department of Medicine, and ²Department of Pediatrics, Columbia University Medical Center, New York, New York; and ³Molecular Dynamics Section, National Institute on Aging, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland

Although exposure to ambient hypoxia is known to cause proinflammatory vascular responses, the mechanisms initiating these responses are not understood. We tested the hypothesis that in systemic hypoxia, erythrocyte-derived H₂O₂ induces proinflammatory gene transcription in vascular endothelium. We exposed mice or isolated, perfused murine lungs to 4 hours of hypoxia (8% O₂). Leukocyte counts increased in the bronchoalveolar lavage. The expression of leukocyte adhesion receptors, reactive oxygen species, and protein tyrosine phosphorylation increased in freshly recovered lung endothelial cells (FLECs). These effects were inhibited by extracellular catalase and by the removal of erythrocytes, indicating that the responses were attributable to erythrocyte-derived H₂O₂. Concomitant nuclear translocation of the p65 subunit of NF- κ B and hypoxia-inducible factor-1 α stabilization in FLECs occurred only in the presence of erythrocytes. Hemoglobin binding to the erythrocyte membrane protein, band 3, induced the release of H₂O₂ from erythrocytes and the p65 translocation in FLECs. These data indicate for the first time, to our knowledge, that erythrocytes are responsible for endothelial transcriptional responses in hypoxia.

Keywords: hypoxia; erythrocytes; endothelium; lung; inflammation

Systemic hypoxia, which is characterized by a decrease in the partial pressure of oxygen in blood (P_{O₂}), results from a lack of oxygen in inhaled breath, or from impaired blood oxygenation because of lung disease. The circulatory response to a decrease of P_{O₂} is best characterized by pulmonary arterial vasoconstriction, a protective strategy that redistributes the pulmonary blood flow from hypoxic to well-ventilated regions of the lung. An additional vascular effect may involve a hypoxia-induced innate immune response, characterized by leukocyte activation and tissue injury (1). However, this effect remains controversial. Support for the immune effect derives from evidence in animal models that ambient hypoxia causes lung injury (2–5), systemic inflammation (4, 5), and vascular leakage (2, 6). A 4-hour exposure to 8% O₂ in mice activates NF- κ B in astrocytes and hepatocytes (7), suggesting that hypoxia-induced proinflammatory gene transcription occurs in these cells.

The evidence opposing the hypoxic immune response comes from lung lymph flow studies in adult sheep. According to these studies, ambient hypoxia does not increase lung microvascular permeability to proteins, and it does not cause pulmonary edema

(Received in original form November 21, 2011 and in final form September 12, 2012)

This work was supported by National Heart, Lung, and Blood Institute grants HL57556, HL36024, and HL64896 (J.B.) through the National Institutes of Health.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Jahar Bhattacharya, M.D., D.Phil., Lung Biology Laboratory, Pulmonary Division, Department of Medicine, Columbia University Medical Center, 630 West 168th Street, BB 17-1705, New York, NY 10032. E-mail: jhb39@columbia.edu

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Cell Mol Biol Vol 48, Iss. 1, pp 78–86, Jan 2013

Published 2013 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1165/rcmb.2011-0402OC on October 4, 2012

Internet address: www.atsjournals.org

CLINICAL RELEVANCE

Hypoxia is a common outcome of lung disease. However, to what extent hypoxia itself causes lung inflammation, thereby exacerbating lung disease, remains unclear. We show that lung inflammation occurs during hypoxia, and that erythrocytes play a role in the response. This study will lead to new understandings and, possibly, new erythrocyte-based therapy for lung disease.

(8, 9). The clinical evidence for the hypoxic immune effect is mixed, and is based on studies of high-altitude pulmonary edema (HAPE), a form of lung injury that follows exposure to hypoxia at high altitude. Radioactive tracer studies in patients with HAPE confirm the sheep data insofar as lung microvascular permeability does not increase (10). Several studies indicate that the bronchoalveolar lavage (BAL) of patients with HAPE is enriched in leukocytes, proteins, and proinflammatory factors, indicating that HAPE causes lung inflammation (11–13). However, this inflammatory response has not been confirmed by all investigators (14, 15), and when present, it may not be sufficiently severe to account for the pulmonary edema of acute lung injury (12).

To the extent that the innate immune response to hypoxia has been reported in animal models and humans, its underlying mechanisms must be understood. Here, we consider the release of H₂O₂ from erythrocytes as a possible mechanism. In hypoxic erythrocytes, the partial deoxygenation of hemoglobin (Hb) dramatically increases the rate of autoxidation in the oxygenated domains of Hb, resulting in the formation of superoxide and H₂O₂ (16, 17). A fraction of the deoxy-Hb binds the erythrocyte membrane protein, band 3 (18, 19). H₂O₂ formed at this membrane site escapes antioxidants in the erythrocyte cytosol, and is released into the extracellular space (16). The extracellular H₂O₂ can diffuse back into the erythrocyte and undergo hydrolysis by catalase in the erythrocyte cytosol. However, because erythrocytes flow in close contact with the endothelial lining of capillaries, the released H₂O₂ also diffuses to the endothelial cytosol and is detectable as an increase of oxidant-sensitive fluorescence in the microvascular endothelium (20). Consequently, endothelial Ca²⁺ increases and activates the expression of the leukocyte adhesion receptor, P-selectin, resulting in leukocyte recruitment.

Although these findings indicate that hypoxic erythrocytes are capable of inducing acute proinflammatory effects, it remains unclear whether the erythrocyte effect is sufficiently robust to activate transcriptional responses (such as the expression of E-selectin) that may require a more sustained inflammatory response. Whether these erythrocyte effects are severe enough to cause pulmonary edema also remains unclear. To address these issues, we determined hypoxic responses in freshly recovered lung endothelial cells (FLECs) that reflect endothelial

C-Kit-Positive Cells Accumulate in Remodeled Vessels of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension

David Montani^{1,2,3*}, Frédéric Perros^{1,2,3,4*}, Natalia Gambaryan^{1,2,3}, Barbara Girerd^{1,2,3}, Peter Dorfmüller^{1,2,3}, Laura C. Price^{1,2,3}, Alice Huertas^{1,2,3}, Hamida Hammad⁴, Bart Lambrecht⁴, Gérald Simonneau^{1,2,3}, Jean-Marie Launay⁵, Sylvia Cohen-Kaminsky^{1,2,3}, and Marc Humbert^{1,2,3}

¹University Paris-Sud, Faculté de Médecine, Kremlin-Bicêtre, France; ²Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécère, AP-HP, Clamart, France; ³INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ⁴Laboratory of Immunoregulation, University Hospital of Ghent, Ghent, Belgium; and ⁵Service de Biochimie, Hôpital Lariboisière, AP-HP, Paris, France

Rationale: C-kit⁺ cells, including bone marrow (BM)-derived progenitors and mast cells, may participate in vascular remodelling. Because recent studies suggest that c-kit may be a target for innovative therapies in experimental pulmonary hypertension, we investigated the contribution of c-kit⁺ cells in human idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH).

Objectives: To investigate the contribution of c-kit⁺ cells in human IPAH.

Methods: Single c-kit, CXCL12/SDF-1 α , CXCR4, CD34, and multiple c-kit, α -smooth muscle actin (α -SMA) and tryptase immunostainings were performed in IPAH lungs. C-kit mRNA expression was quantified by real-time polymerase chain reaction in microdissected pulmonary arteries from patients with IPAH and control subjects. Phenotype and function of circulating progenitors were analyzed by flow cytometry. Plasma levels of soluble c-kit and CXCL12/SDF-1 α were measured by ELISA.

Measurements and Main Results: Infiltration of c-kit⁺ cells in pulmonary arterial lesions was associated with an increase in c-kit mRNA expression ($P < 0.01$ compared with control subjects). Both c-kit⁺/tryptase⁺ mast cells and c-kit⁺/tryptase⁻ BM-derived cells were increased in pulmonary arteries of patients with IPAH compared with control subjects (106.6 ± 54.5 vs. $28 \pm 16.8/\text{mm}^2$ and 143.8 ± 101.1 vs. $23.3 \pm 11.9/\text{mm}^2$; all $P < 0.01$). Plasma-soluble c-kit was increased in IPAH compared with control subjects (27.4 ± 12.4 vs. 19.5 ± 5.8 ng/ml; $P < 0.05$). Two populations of circulating BM-derived cells (lin-CD34^{high}CD133^{high} [c-kit^{high}CXCR4^{low}] and lin-CD34^{low}CD133⁻ [c-kit^{low}CXCR4^{high}]) were increased in IPAH compared with control subjects ($P = 0.01$). Pulmonary arterial lesions were associated with vasa vasorum expansion expressing CXCL12/SDF-1 α that may recruit c-kit⁺ cells.

(Received in original form June 15, 2010; accepted in final form February 4, 2011)

* These authors contributed equally.

Supported in part by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (GIS-HTAP) and by Legs Poix, Chancellerie des Universités de Paris. David Montani, Peter Dorfmüller, and Natalia Gambaryan are supported by a grant from Association HTAPFrance. Frédéric Perros and Laura Price are supported by Long-Term Research Fellowship grants from the European Respiratory Society. Alice Huertas is supported by "Mariane Josso Award" from Fondation pour la Recherche Médicale. Natalia Gambaryan is supported by a grant from Société de Pneumologie de Langue Française.

Conception and design: D.M., F.P., B.L., G.S., J.-M.L., S.C.-K., and M.H. Analysis and interpretation: D.M., F.P., N.G., B.G., P.D., L.C.P., A.H., and H.H. Drafting the manuscript for important intellectual content: D.M., F.P., B.L., G.S., J.-M.L., S.C.-K., and M.H.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Marc Humbert, M.D., Ph.D., Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine-Bécère, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, France. E-mail: marc.humbert@abc.aphp.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 184, pp 116–123, 2011
Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201006-0905OC on February 4, 2011
Internet address: www.atsjournals.org

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Increasing evidence suggests that circulating inflammatory and progenitor cells of bone marrow origin may contribute to vascular remodeling in systemic vascular disease. C-kit is a transmembrane tyrosine kinase receptor for stem cell factor, considered as a marker for bone marrow-derived hematopoietic stem cells, although it may also be present on other cell types.

What This Study Adds to the Field

In idiopathic pulmonary arterial hypertension, the accumulation of c-kit⁺ cells (corresponding to both progenitors and mast cells) is shown in the remodeled pulmonary arteries. This is associated with an increase in the bone marrow-derived progenitor cell mobilizing soluble factor c-kit and the mobilization of circulating progenitors. Pulmonary arterial lesions are associated with an expansion of vasa vasorum (expressing CXCL12/SDF-1), within which c-kit⁺ cell progenitors and mast cells are localized. This study adds to the knowledge regarding the localization of bone marrow-derived progenitor cells and mast cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension.

Conclusions: In IPAH, c-kit⁺ cells infiltrate pulmonary arterial lesions and may participate to vascular remodeling. Therefore, c-kit may represent a potential target for innovative PAH therapy.

Keywords: Bone marrow-derived cells; c-kit; mast cells; pulmonary arterial hypertension; stromal-derived factor-1 (CXCL12/SDF-1 α)

Idiopathic pulmonary hypertension (IPAH) is characterized by a progressive increase in pulmonary vascular resistance leading to right ventricular failure and ultimately death (1). Remodeling of small pulmonary arteries represents the main pathologic finding related to IPAH with marked proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells resulting in vascular obstruction and resistance pulmonary arteries (2, 3). C-kit is a transmembrane tyrosine kinase receptor considered as a marker for bone marrow (BM)-derived hematopoietic stem cells and mast cells (4–9). Previous studies report that c-kit⁺ cells are mobilized from the BM, and may differentiate into vascular cells to participate in the pathogenesis of atherosclerosis and to promote myocardial repair following infarction (10, 11). Moreover, chronic hypoxia induces mobilization of c-kit⁺ cells from the BM in the circulation and c-kit⁺ cells accumulate in remodeled pulmonary artery vessel wall (12). C-kit⁺ cells include mast cells, which have been reported to be increased in the lungs and remodeled vessels of experimental pulmonary

A Critical Role for p130^{Cas} in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents

Ly Tu^{1,2}, Frances S. De Man^{1,2,3}, Barbara Girerd^{1,2,4}, Alice Huertas^{1,2,4}, Marie-Camille Chaumais^{1,2}, Florence Lecerf^{1,2}, Charlène François^{1,2}, Frédéric Perros^{1,2}, Peter Dorfmueller^{1,2}, Elie Fadel^{1,2}, David Montani^{1,2,4}, Saadia Eddahibi^{1,2}, Marc Humbert^{1,2,4}, and Christophe Guignabert^{1,2}

¹INSERM UMR 999, LabEx LERMIT, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ²Université Paris-Sud, School of Medicine, Kremlin-Bicêtre, France; ³VU University Medical Center, Amsterdam, The Netherlands; and ⁴AP-HP, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, DHU Thorax Innovation, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France

Rationale: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive and fatal disease characterized by pulmonary arterial muscularization due to excessive pulmonary vascular cell proliferation and migration, a phenotype dependent upon growth factors and activation of receptor tyrosine kinases (RTKs). p130^{Cas} is an adaptor protein involved in several cellular signaling pathways that control cell migration, proliferation, and survival.

Objectives: We hypothesized that in experimental and human PAH p130^{Cas} signaling is overactivated, thereby facilitating the intracellular transmission of signal induced by fibroblast growth factor (FGF) 2, epidermal growth factor (EGF), and platelet-derived growth factor (PDGF).

Measurements and Main Results: In patients with PAH, levels of p130^{Cas} protein and/or activity are higher in the serum, in the walls of distal pulmonary arteries, in cultured smooth muscle cells (PA-SMCs), and in pulmonary endothelial cells (P-ECs) than in control subjects. These abnormalities in the p130^{Cas} signaling were also found in the chronically hypoxic mice and monocrotaline-injected rats as models of human PAH. We obtained evidence for the convergence and amplification of the growth-stimulating effect of the EGF-, FGF2-, and PDGF-signaling pathways via the p130^{Cas} signaling pathway. We found that daily treatment with the EGF-R inhibitor gefitinib, the FGF-R inhibitor dovitinib, and the PDGF-R inhibitor imatinib started 2 weeks after a subcutaneous monocrotaline injection substantially attenuated the abnormal increase in p130^{Cas} and ERK1/2 activation and reduced established pulmonary hypertension.

Conclusions: Our findings demonstrate that p130^{Cas} signaling plays a critical role in experimental and idiopathic PAH by modulating pulmonary vascular cell migration and proliferation and by acting as an amplifier of RTK downstream signals.

Keywords: pulmonary arterial hypertension; pulmonary vascular remodeling; growth factors; signal transduction; BCAR1

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a devastating disease of unknown etiology characterized by a marked and sustained increase in pulmonary artery pressure (PAP) that leads to right

(Received in original form February 22, 2012; accepted in final form June 26, 2012)

Supported by grants from the French National Institute for Health and Medical Research (INSERM), French National Agency for Research grant P007948 ANR-GENOPATH "ATOL," the Legs Poix (Chancellerie des Universités de Paris), and by a European Respiratory Society/Marie-Curie Joint Research Fellowship (MC 1120-2009) (F.S.d.M.).

Author Contributions: Conception and design: L.T., F.S.D.M., D.M., M.H., and C.G.; analysis and interpretation: all authors; drafting manuscript: L.T., M.H., and C.G.

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Christophe Guignabert, Ph.D., INSERM UMR 999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133 Avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France. E-mail: christophe.guignabert@inserm.fr

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 186, Iss. 7, pp 666–676, Oct 1, 2012

Copyright © 2012 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201202-0309OC on July 12, 2012

Internet address: www.atsjournals.org

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Increased proliferation and migration of pulmonary vascular cells are hallmark pathogenic features of pulmonary arterial hypertension (PAH). The mechanisms underlying these abnormalities remain partially unknown. The recent discovery of selective therapies targeting crucial receptor tyrosine kinase (RTK) signaling in idiopathic PAH (iPAH), such as EGF, FGF2, and PDGF, has provided encouraging experimental results, and these agents are being tested as a potential therapeutic approach to PAH. p130^{Cas} is an adaptor protein modulating several signaling pathways that control cell migration and proliferation.

What this Study Adds to the Field

Adaptor p130^{Cas} protein and activity are increased in serum and walls of pulmonary arteries and in cultured pulmonary endothelial (P-ECs) and smooth muscle cells (PA-SMCs) from patients with iPAH as compared with those from control subjects and in experimental models of PH in rodents. EGF, FGF2, and PDGF signaling pathways converge to p130^{Cas}, which acts as an amplifier of downstream signals. Decreasing p130^{Cas} signaling by RNA interference attenuated the increase in ERK1/2 activation state and normalized migration and proliferation of PA-SMCs and P-ECs derived from patients with iPAH. These findings offer new insight into the importance of p130^{Cas} in PAH for proliferation and migration of pulmonary vascular cells.

ventricular failure and death. There is no cure for PAH, and the therapeutic options available only partially improve symptoms and increase survival. In the absence of specific treatments, patients with idiopathic PAH (iPAH) have a mean survival of 2.8 years. Even under current therapies, survival remains poor, with a 15% death rate per year in patients with incident iPAH (1, 2). Irreversible remodeling of the pulmonary vasculature is the cause of increased PAP in PAH and frequently leads to progressive functional decline in patients despite treatment. This process is ascribed to the excessive proliferation, survival, and migration of pulmonary vascular cells, including smooth muscle cells (SMCs) and endothelial cells (ECs) (3). However, the mechanisms that mediate these effects are incompletely understood.

Over recent years, there has been growing interest in the disease-promoting roles of three different growth factors: platelet-derived growth factor (PDGF), epidermal growth factor (EGF), and fibroblast growth factor (FGF)2. Altered expression and/or increased activities of these receptor tyrosine kinases (RTKs) have

Cytotoxic Cells and Granulysin in Pulmonary Arterial Hypertension and Pulmonary Veno-occlusive Disease

Frédéric Perros^{1,2,3}, Sylvia Cohen-Kaminsky^{1,2,3}, Natalia Gambaryan^{1,2,3}, Barbara Girerd^{1,2,3}, Nicolas Raymond^{1,2,3}, Isabelle Klingelschmitt^{1,2,3}, Alice Huertas^{1,2,3}, Olaf Mercier^{1,3,4}, Elie Fadel^{1,3,4}, Gerald Simonneau^{1,2,3}, Marc Humbert^{1,2,3}, Peter Dorfmueller^{1,3,5}, and David Montani^{1,2,3}

¹University Paris-Sud, Faculté de médecine, Le Kremlin-Bicêtre, France; ²AP-HP, DHU TORINO, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Bicêtre, Le Kremlin-Bicêtre, France; and ³INSERM UMR-S 999, Labex LERMIT, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, ⁴Service de Chirurgie Thoracique, and ⁵Service d'Anatomie Pathologique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

Rationale: Pulmonary arterial hypertension (PAH) and pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) both display occlusive remodeling of the pulmonary vasculature responsible for increased pulmonary vascular resistances. Cytotoxic T (CTL), natural killer (NK), and natural killer T (NKT) cells play a critical role in vascular remodeling in different physiological and pathological conditions. Granulysin (GNLY) represents a powerful effector protein for all these subpopulations.

Objectives: To analyze the cytolytic compartment of inflammatory cells in patients with PAH and PVOD.

Methods: The overall functional status of the cytolytic compartment was studied through epigenetic analysis of the GNLY gene in explanted lungs and in peripheral blood mononuclear cells. Flow cytometry technology allowed analysis of specific circulating cytolytic cells and GNLY contents. A GNLY-specific ELISA allowed measurement of GNLY serum concentrations.

Measurements and Main Results: A decrease in GNLY demethylation in the gDNA extracted from peripheral blood mononuclear cells and explanted lungs was found specifically in PVOD but not in PAH. This was associated with a decrease in populations and subpopulations of CTL and NKT and an increase of NK populations. Despite the reduced granulysin-containing cells in patients with PVOD, GNLY serum levels were higher, suggesting these cells were wasting their content. Furthermore, the increase of GNLY concentration in the serum of PVOD was significantly higher than in patients with PAH.

Conclusions: PVOD is characterized by alterations of circulating cytotoxic cell subpopulations and by epigenetic dysregulation within the GNLY gene. Our findings may be helpful in the quest to develop needed diagnostic tools, including flow cytometry analyses, to screen for suspected PVOD in patients with pulmonary hypertension.

Keywords: pulmonary veno-occlusive disease; pulmonary arterial hypertension; granulysin; epigenetics; cytotoxic cells

(Received in original form August 2, 2012; accepted in final form October 25, 2012)

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Frédéric Perros, Ph.D., INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133, Avenue de la Résistance, F-92350 Le Plessis Robinson, France. E-mail: frederic.perros@inserm.fr Supported by Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), team FRM 2010, grant DEQ20100318257 (F.P. and the team from the INSERM U999 unit; and the Association HTAPFrance (P.D. and D.M.).

Author Contributions: Conception and design: F.P., S.C.-K., G.S., M.H., P.D., and D.M. Acquisition of data: F.P., N.G., B.G., N.R., I.K., O.M., and E.F. Analysis and interpretation: F.P., S.C.-K., N.G., B.G., P.D., and D.M. Drafting the manuscript for important intellectual content: F.P., S.C.-K., N.G., B.G., A.H., G.S., M.H., P.D., and D.M.

This article has an online supplement, which is accessible from this issue's table of contents at www.atsjournals.org

Am J Respir Crit Care Med Vol 187, Iss. 2, pp 189–196, Jan 15, 2013

Copyright © 2013 by the American Thoracic Society

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.201208-1364OC on December 6, 2012
Internet address: www.atsjournals.org

AT A GLANCE COMMENTARY

Scientific Knowledge on the Subject

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) shares many similarities with idiopathic or heritable pulmonary arterial hypertension (PAH), from risk factors to clinical or hemodynamic presentation, which can easily lead to misdiagnosis between these two conditions. The need to establish a correct and early diagnosis of PVOD is justified by the worse prognosis of these patients and by their risk of developing severe pulmonary edema with specific PAH therapy. We hypothesized that the cytolytic fraction/subpopulation of inflammatory cells are differently regulated in patients with PAH and PVOD.

What This Study Adds to the Field

PVOD is characterized by epigenetic regulation of the granulysin (GNLY) gene in explanted lungs and in peripheral blood mononuclear cells, as well as by alterations of circulating cytotoxic cell subpopulations and their GNLY contents. Our results suggest that differences in immune regulation of these cells may contribute to the pathophysiology of PVOD and PAH. The fact that granulysin and cytolytic cells are dysregulated may allow future development of biological diagnostic tools to aid the difficult diagnosis of patients with PVOD.

Pulmonary arterial hypertension (PAH) belongs to a heterogeneous group of progressive diseases characterized by an increase in resting mean pulmonary arterial pressure above 25 mm Hg (1, 2). PAH can be idiopathic, heritable, or associated with different conditions or drug exposure (3). Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) is a rare form of pulmonary hypertension (PH) belonging to group 1' of the Dana Point classification; it is defined by a predominant involvement of small pulmonary veins and characterized by poor prognosis, poor response to specific PAH therapy, and the possibility of developing severe pulmonary edema with these therapies (4, 5).

Increasing evidence suggests that inflammatory mechanisms play a role in PAH pathogenesis, including lymphocyte infiltration (6–13). Approximately 10% of leukocytes in the naive lung are natural killer (NK) cells (14, 15). Lung homeostasis of these cells is important. By way of example, there is a profound deficiency in lung NK cells in a severe model of bleomycin-induced lung fibrosis in mice (16). CD8⁺ cytotoxic T (CTL), NK, and natural killer T (NKT) cells are classically known to be the cytolytic arm of the cellular immune response. NK cells can be



LETTERS

Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension

To the Editors:

We read with great interest the recent editorial by STENMARK *et al.* [1] about the potential role of fibrocytes in pulmonary arterial hypertension (PAH) and the original article by NIKAM *et al.* [2] showing the contribution of bone marrow-derived circulating fibrocytes to hypoxic vascular remodelling and inhibition of their recruitment by treprostinil. Many recent reports indicate a contribution of endothelial and haematopoietic progenitor cells [3], attracted *via* the CXC chemokine ligand 12/CXC chemokine receptor (CXCR)4 axis in the lung [4], but the role of fibrocytes in PAH is still not clear. A previous study of pulmonary hypertension in rat and calf models has shown that pulmonary adventitial remodelling is due to robust recruitment of non-resident, bone marrow-derived cells that can produce collagen and express smooth muscle cell α -actin, thus representing fibrocytes [5]. A unique feature of fibrocytes, described by BUCALA *et al.* [6], is that they circulate in the bloodstream and are capable of producing extracellular matrix components. They express a variety of mesenchymal markers, including collagen-1, collagen-3, vimentin, haematopoietic markers, such as CD11b and CD45, and the stem cell marker CD34 [6]. Circulating fibrocytes display many functional properties, such as phagocytosis, antigen presentation, cytokine and connective tissue matrix production, and the capacity to proliferate and differentiate. In addition, they respond to a variety of cytokines and growth factors. Fibrocytes also produce angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor A, and thus have a potent effect on *de novo* blood vessel formation, as evidenced by studies in an *in vivo* Matrigel™ (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) model of angiogenesis. Fibrocyte expression of matrix metalloproteinase-9, which mediates endothelial cell invasion, further facilitates the angiogenic process. Fibrocytes have been postulated to influence disease development in a number of situations involving tissue remodelling, such as tumour biology, scleroderma, asthma and pulmonary fibrosis [7].

To extend these studies in human pulmonary diseases, we tested the hypothesis that circulating fibrocytes might contribute to PAH. For that purpose, we quantified circulating fibrocytes in patients with PAH and examined their possible role as predictors of activity and progression of PAH. Patients were recruited from the French Referral Centre for Pulmonary Hypertension (Université Paris-Sud, INSERM U999, Hôpital Antoine Bécclère, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Clamart, France). All procedures for informed consent, data collection and privacy protection were approved by our institutional ethics committee

(Comité de Protection des Personnes Ile-de-France, Paris VII, France). Diagnosis, based on right-heart catheterisation, demonstrated severe pre-capillary pulmonary hypertension in all cases. Circulating fibrocytes were identified as CD11b+ CD34+ vimentin+ cells, and carefully quantified by flow cytometry after exclusion of doublets and dead cells, among 200,000 events. Preliminary experiments indicated that detection of vimentin was as accurate as collagen I for identifying fibrocytes in triple staining. Fibrocyte number was expressed as an absolute cell count per millilitre of blood and as percentage of total peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). In total, 20 patients with idiopathic and heritable PAH and 18 healthy control subjects were included in this study. The percentage of circulating fibrocytes was decreased in the blood of PAH patients compared with healthy control subjects (mean \pm SEM $0.67 \pm 0.02\%$ in control subjects *versus* $0.22 \pm 0.04\%$ in PAH patients; $p < 0.05$) (fig. 1a). However, the number of fibrocytes per millilitre of blood was not significantly different ($31,709 \pm 6,444$ cells·mL⁻¹ in control subjects *versus* $16,781 \pm 3,256$ cells·mL⁻¹ in PAH patients; $p = 0.08$) (data not shown). Hence, we proposed that any differences between controls and patients might not rely on circulating number of fibrocytes but on their function. We investigated membrane CD11b expression on circulating fibrocytes as well as on other PBMC populations. We showed an increased expression of CD11b on the circulating fibrocytes from PAH patients ($1,075 \pm 116$ in control subjects *versus* $2,069 \pm 264$ in PAH patients; $p < 0.001$), normalised to the mean fluorescence intensity of CD11b of isotype controls, indicating increased activation (fig. 1b–d). We also found CD11b membrane overexpression on PAH monocytes ($1,462 \pm 169$ in control subjects *versus* $2,425 \pm 278$ in PAH patients; $p < 0.001$). Interestingly, monocytes are considered by some authors as progenitors of fibrocytes. The changes in fibrocyte number and activation might be due to an imbalance of some circulating factors acting on fibrocyte differentiation in plasma. For example, it was demonstrated that circulating fibrocytes are sensitive to the cytokine and growth factor environment, as well as to serum amyloid P levels, which have an inhibitory action on their differentiation. It was also demonstrated that addition of the profibrotic cytokines interleukin (IL)-4 and IL-13 to human PBMCs cultured in serum-free medium promotes fibrocyte differentiation, whereas the antifibrotic cytokines interferon- γ and IL-12 have inhibitory effects. In further studies, it will be interesting to examine the level of these factors in the plasma of PAH patients. To further explore the functional competence of circulating fibrocytes, we analysed their capacity to differentiate *in vitro*. We cultured PBMCs in serum-free media for 4 days as previously described [8]. After 4 days, PBMCs were

For editorial comments, see page 5.

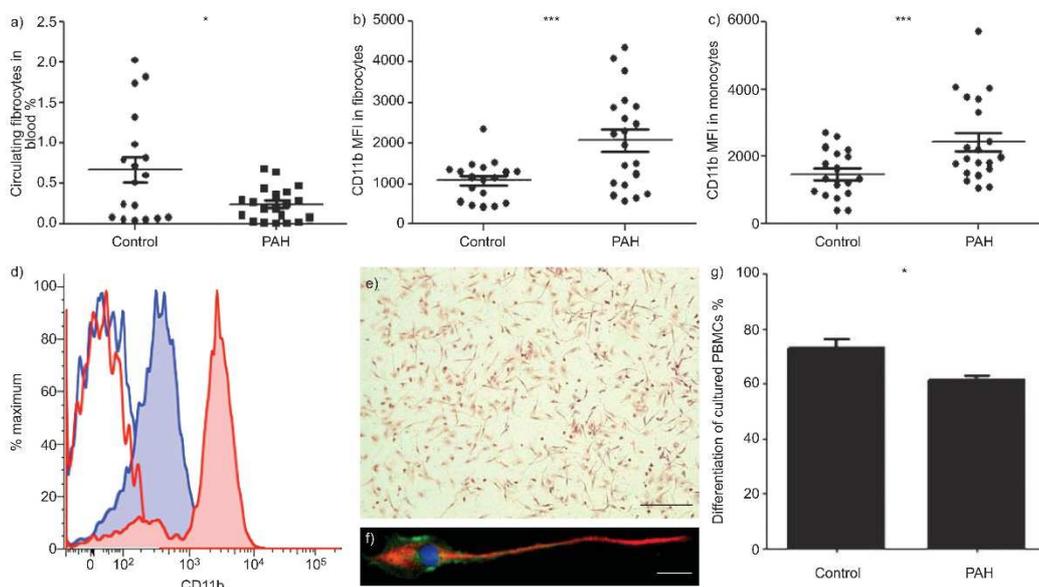


FIGURE 1. *Ex vivo* and *in vitro* analysis of circulating fibrocytes in controls compared to pulmonary arterial hypertension (PAH) patients. a) Circulating fibrocyte count in peripheral blood of healthy control subjects and PAH patients, characterised by allophycocyanin (APC)–Cy7-conjugated anti-CD11b and phycoerythrin (PE)–Cy5-conjugated anti-CD34 surface antibodies (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France), and intracellular staining with PE-conjugated anti-vimentin versus PE-conjugated immunoglobulin G1 isotype control (Abcam, Paris, France). CD11b mean fluorescence intensity (MFI) on the b) fibrocyte and c) monocyte populations in peripheral blood, normalised to isotype controls. n=18 in the control group; n=20 in PAH group. d) Representative histograms for CD11b expression at the cell surface of the CD34+ vimentin+ circulating fibrocyte populations from healthy controls (blue shaded) and PAH patients (red shaded), as compared with isotype controls (blue red and lines, respectively). Flow cytometry data acquisition was performed on a MACSQuant analyser (Miltenyi, Paris, France) and data were analysed using FlowJo software (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA). e) Differentiated fibrocytes in culture (haematoxylin and erythrosin staining). f) Immunofluorescent staining for CD45 (green) and vimentin (red). g) Quantification of fibrocyte differentiation *in vitro*, using antibodies against vimentin (Abcam) and CD45 (BD Pharmingen). Fibrocytes from duplicate wells defined as double-positive, adherent, spindle-shaped cells with an oval nucleus were counted in five different fields per well. n=4 in PAH and control groups. PBMC: peripheral blood mononuclear cell. Data are presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using paired t-test and Mann–Whitney U-test. *: p<0.05; ***: p<0.001.

air dried, acetone-fixed and stained with specific antibodies for fibrocyte quantification (fig. 1e–f). We observed a significant decrease in the percentage of differentiated spindle-shaped CD45+ vimentin+ cells in PAH patients *in vitro* ($73 \pm 3\%$ in control subjects versus $61 \pm 2\%$ in PAH patients; $p < 0.05$) (fig. 1g). In accordance with NIKAM *et al.* [2], who found rare fibrocytes in only two cases out of 10, both with plexiform lesions, we did not observe fibrocyte accumulation (*i.e.* cells expressing both CD45 and vimentin) in the perivascular areas of remodelled small pulmonary arteries in the PAH lungs of four samples we analysed (data not shown). Lastly, we did not find any association between the level of circulating fibrocytes and clinical parameters (pulmonary haemodynamics, New York Heart Association class, 6-min walk distance and plasma brain natriuretic peptide), questioning their overall predictive value in PAH (data not shown).

From this and previous studies of different aspects of fibrocyte biology in PAH, we can conclude that the contribution of circulating fibrocytes in PAH remains a subject of debate. We

have shown a slight decrease in the percentage of circulating fibrocytes in patients with idiopathic and heritable PAH compared with healthy controls, together with a lower capacity to differentiate *in vitro*. Low circulating fibrocyte level might be secondary to defects in cell mobilisation mechanisms. To prove this hypothesis, additional studies on the expression of adhesion molecules, such as very late antigen-4, CC chemokine receptor 5 and CXCR4, on circulating fibrocytes are needed. Alternatively, it might be due to the low proliferation of CD34+ cells, as recently found in patients with chronic ischaemic heart disease [9], which occurred in the absence of obvious mobilisation defects. Another nonexclusive hypothesis is that the low level of circulating fibrocytes is due to their increased pulmonary vascular recruitment. This hypothesis, raised by FRID *et al.* [5], is not consistent with data obtained in PAH lungs here and by others [2] describing normal fibrocyte cell count in the perivascular areas of small pulmonary arteries. Furthermore, it remains difficult to extrapolate from studies in the hypoxic model of PAH to the human disease, in which lungs are examined at the pulmonary transplantation time-point, after

long disease duration. The other important finding of this study is the increased expression of membrane CD11b in fibrocytes. The integrin CD11b (also known as complement receptor type 3, macrophage antigen-1 and $\alpha_M\beta_2$), which is primarily expressed on neutrophils, macrophages and monocytes, is critical for the normal function of these cells and plays an important role in the development of inflammatory responses. CD11b is expressed in a low-affinity, inactive conformation in circulating leukocytes, but is rapidly upregulated on the cell surface during stimulus-dependent activation [10]. The factors triggering upregulation of CD11b in fibrocytes and its biological significance are not known. One hypothesis is that the increased expression of CD11b in fibrocytes reflects their activation in the course of the inflammatory response, as in patients with PAH. As a consequence of CD11b upregulation, fibrocytes might display an increased capability to adhere to endothelial cells, extravasate and subsequently transmigrate into the surrounding interstitial tissue. Fibrocytes therefore can be proposed to play a critical role in the initiation and maintenance of inflammation in PAH, even though they are not detected in the lung tissues. A central question that remains to be answered is whether fibrocytes differentiate into myofibroblasts, or whether they transiently stimulate differentiation and proliferation of other progenitor cells or resident mesenchymal cells within the lung.

In conclusion, our data suggest that the level of circulating fibrocytes may not be predictive of disease activity and progression, and more detailed analysis of their functional capacity and activation is needed. CD11b upregulation by circulating fibrocytes may have a role in the initiation and/or progression of PAH but detailed investigations on fibrocyte function will be required.

N. Gambaryan, S. Cohen-Kaminsky, D. Montani, B. Giererd, A. Huertas, A. Seferian, M. Humbert and F. Perros
Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, France. Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécélère, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Clamart, France. INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire, Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France. Département de la Recherche Médicale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

Correspondence: F. Perros, INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133 avenue de la Résistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France. E-mail: frederic.perros@gmail.com

Support Statement: This study was supported by HTAP France.

Statement of Interest: Statements of interest for D. Montani and M. Humbert can be found at www.erj.ersjournals.com/site/misc/statements.xhtml

REFERENCES

- 1 Stenmark KR, Frid MG, Yeager ME. Fibrocytes: potential new therapeutic targets for pulmonary hypertension? *Eur Respir J* 2010; 36: 1232–1235.
- 2 Nikam VS, Schermuly RT, Dumitrascu R, *et al.* Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow-derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2010; 36: 1302–1314.
- 3 Montani D, Perros F, Gambaryan N, *et al.* C-kit positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184: 116–123.
- 4 Gambaryan N, Perros F, Montani D, *et al.* Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2011; 37: 1392–1399.
- 5 Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, *et al.* Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage. *Am J Pathol* 2006; 168: 659–669.
- 6 Bucala R, Spiegel L, Chesney J, *et al.* Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1: 71–81.
- 7 Strieter RM, Keeley EC, Hughes MA, *et al.* The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* 2009; 86: 1111–1118.
- 8 Pilling D, Vakil V, Gomer RH. Improved serum-free culture conditions for the differentiation of human and murine fibrocytes. *J Immunol Methods* 2009; 351: 62–70.
- 9 Heeschen C, Lehmann R, Honold J, *et al.* Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease. *Circulation* 2004; 109: 1615–1622.
- 10 Hogg N, Leitinger B. Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1. *J Leukoc Biol* 2001; 69: 893–898.

DOI: 10.1183/09031936.00039811

Artificial lung as an alternative to mechanical ventilation in COPD exacerbation

To the Editors:

Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is commonly treated with different kinds of non-invasive positive pressure devices, ranging from helmet or face-mask continuous positive airway pressure (CPAP) to non-invasive pressure support ventilation (NPPV), or Bi-PAP [1].

The use of positive end-expiratory pressure (PEEP) and NPPV often results in the successful treatment of COPD patients with respiratory distress [1, 2]. If, despite maximal medical management, respiratory distress and gas exchange deteriorate with increasing tachypnoea and acidosis, and with altered level of consciousness, then tracheal intubation and mechanical

**Endothelial-FGF-2 and IL-6 Promote Pericyte Coverage and Give Rise to
Smooth Muscle-Like Cells in Pulmonary Hypertension**

Running title: *Ricard et al.; Pericytes in pulmonary arterial hypertension*

Nicolas Ricard (PhD)^{1,2}, Ly Tu (PhD)^{1,2}, Morane Le Hiress (MSc)^{1,2}, Alice Huertas (MD, PhD)^{1,2,3}, Carole Phan (MSc)^{1,2}, Caroline Sattler (MD, MSc)^{1,2,3}, Elie Fadel (MD, PhD)^{1,2}, Andrei Seferian (MD, MSc)^{1,2,3}, David Montani (MD, PhD)^{1,2}, Peter Dorfmueller (MD, PhD)^{1,2}, Marc Humbert (MD, PhD)^{1,2,3}, Christophe Guignabert (PhD)^{1,2}.

¹INSERM UMR 999, LabEx LERMIT, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France; ²Univ Paris-Sud, School of medicine, Kremlin-Bicêtre, France; ³AP-HP, Service de Pneumologie, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, DHU Thorax Innovation, Hôpital de Bicêtre, France.

Address for correspondence:

Christophe Guignabert, PhD
INSERM UMR 999
Centre Chirurgical Marie Lannelongue
133, Avenue de la Resistance
92350 Le Plessis-Robinson, France.
Tel: +33-1-40948833
Fax: +33-1-40942522
Email: christophe.guignabert@inserm.fr

Manuscript word count: 6275

Authors' contributions: Conception and design: NR, LT, MLH, MH, CG; Analysis and interpretation: all; Drafting manuscript: NR, MH and CG.

Journal Subject Codes: Pulmonary circulation and disease:[18]

Abstract:

Background—Pericytes and their crosstalk with endothelial cells (ECs) are critical for the development of a functional microvasculature and vascular remodeling. It is also known that pulmonary endothelial dysfunction is intertwined with the initiation and progression of pulmonary arterial hypertension (PAH). We hypothesized that pulmonary endothelial dysfunction, characterized by abnormal fibroblast growth factor (FGF)-2 and interleukin (IL)-6 signaling, leads to abnormal microvascular pericyte coverage causing pulmonary arterial medial thickening.

Methods and Results—In human lung tissues, numbers of pericytes are substantially increased (up to 2-fold) in distal PAH pulmonary arteries as compared to controls. Interestingly, human pulmonary pericytes exhibit, *in vitro*, an accentuated proliferative and migratory response to conditioned media from human pulmonary idiopathic PAH (iPAH) ECs as compared to conditioned media from control cells. Importantly, by using an anti-FGF-2 neutralizing antibody, we attenuated these proliferative and migratory responses, whereas by using an anti-IL-6 neutralizing antibody, we decreased the migratory response without affecting the proliferative response. Furthermore, in our murine retinal angiogenesis model, both FGF-2 and IL-6 administration increased pericyte coverage. Finally, we found that both FGF-2 and IL-6 maintain human pericytes in an undifferentiated state but that transforming growth factor (TGF)- β promotes pericyte differentiation into contractile smooth muscle-like cells.

Conclusions—This is the first report of defective pericyte coverage in distal pulmonary arteries in human PAH. We are also showing this phenomenon is directly linked with pulmonary endothelial dysfunction.

Key words: pulmonary arterial hypertension, endothelial dysfunction, mural cells, fibroblast growth factor-2, interleukin-6, transforming growth factor beta.



Inflammation in Pulmonary Arterial Hypertension

Laura C. Price, MBChB; S. John Wort, MBChB, PhD; Frédéric Perros, PhD; Peter Dorfmueller, MD, PhD; Alice Huertas, MD, PhD; David Montani, MD, PhD; Sylvia Cohen-Kaminsky, PhD; and Marc Humbert, MD, PhD

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterized by pulmonary vascular remodeling of the precapillary pulmonary arteries, with excessive proliferation of vascular cells. Although the exact pathophysiology remains unknown, there is increasing evidence to suggest an important role for inflammation. Firstly, pathologic specimens from patients with PAH reveal an accumulation of perivascular inflammatory cells, including macrophages, dendritic cells, T and B lymphocytes, and mast cells. Secondly, circulating levels of certain cytokines and chemokines are elevated, and these may correlate with a worse clinical outcome. Thirdly, certain inflammatory conditions such as connective tissue diseases are associated with an increased incidence of PAH. Finally, treatment of the underlying inflammatory condition may alleviate the associated PAH. Underlying pathologic mechanisms are likely to be “multihit” and complex. For instance, the inflammatory response may be regulated by bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR II) status, and, in turn, BMPR II expression can be altered by certain cytokines. Although antiinflammatory therapies have been effective in certain connective-tissue-disease-associated PAH, this approach is untested in idiopathic PAH (iPAH). The potential benefit of antiinflammatory therapies in iPAH is of importance and requires further study.

CHEST 2012; 141(1):210–221

Abbreviations: BMPR II = bone morphogenetic protein receptor type 2; CCL = chemokine (C-C motif) ligand; CD = cluster differentiation; CHD = congenital heart disease; CRP = C-reactive protein; CTD = connective tissue disease; CX3CR1 = chemokine (C-X3-C motif) receptor 1 (fractalkine receptor); DC = dendritic cell; EC = endothelial cell; ET-1 = endothelin-1; GC = glucocorticoid; iPAH = idiopathic pulmonary arterial hypertension; MCP = monocyte chemoattractant protein; MCT = monocrotaline; MCTD = mixed connective tissue disease; PAH = pulmonary arterial hypertension; PASMC = pulmonary artery smooth muscle cells; PDGF = platelet-derived growth factor; PH = pulmonary hypertension; POEMS = polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal gammopathy, skin changes; PoPH = portopulmonary hypertension; RANTES = regulated upon activation, normal T cell expressed and secreted; SLE = systemic lupus erythematosus; SSc = scleroderma; Tc = cytotoxic T; Th = T helper; Treg = T regulatory; VEGF = vascular endothelial growth factor

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a progressive condition defined by mean pulmonary artery pressure > 25 mm Hg, leading to chronic elevation of pulmonary vascular resistance, right ventricular failure, and early death.¹ According to the most recent classification, patients with PAH include those with idiopathic PAH (iPAH), heritable PAH, congenital heart disease (CHD)-associated PAH, connective tissue disease (CTD)-associated PAH, HIV-PAH, portopulmonary hypertension (PoPH), and schistosomiasis-associated PAH.² Genetic mutations in the gene encoding the bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR II) (a member of the transforming growth factor superfamily) are seen in 80% of patients with heritable PAH^{3,4} and in 25% of patients with

iPAH.⁵ The key pathologic change observed in PAH is remodeling of precapillary resistance pulmonary arteries, characterized by thickening of the intima, media, and adventitia. As the disease progresses, intimal fibrosis occurs, along with in situ thrombosis and the development of the characteristic plexiform lesions. Despite the development of “advanced therapies,” based on uncovering abnormalities of endothelial cell (EC) function, survival prospects remain poor.⁶

A common observation in histopathologic specimens and studies of blood-borne cells and mediators from patients with PAH is the presence of “inflammation.” Inflammation has been defined as a complex series of interactions among soluble factors and cells

Expert Opinion

1. Introduction
2. Epoprostenol
3. Conclusion
4. Expert opinion

Pharmacokinetic evaluation of continuous intravenous epoprostenol

Marie-Camille Chaumais, Marion Jobard, Alice Huertas, Claire Vignand-Courtin, Marc Humbert, Olivier Sitbon, André Rieutord & David Montani[§]

[§] Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Béclère, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, France

Importance of the field: Prostacyclin is the main arachidonic acid metabolite and its decrease has been proven to be important in the pathophysiology of the pulmonary arterial hypertension (PAH). Epoprostenol has been the first analog of prostacyclin to be approved for the treatment of PAH and despite the development of therapeutic options, the last recommendations of European Societies of Cardiology and Pulmonology maintain it as the first choice therapy for severe patients in the WHO functional class IV. In this review, we focus on pharmacokinetics of epoprostenol characterized by its instability in aqueous biological fluids and compare its pharmacokinetics with other stable analogs of prostacyclin. Moreover, pharmacodynamics, clinical efficacy and safety of epoprostenol were studied.

Areas covered in this review: A literature search and review of the studies published on epoprostenol were carried out using the MEDLINE database.

What the reader will gain: The paper provides the reader with information on epoprostenol pharmacokinetics and comparison with other analogs of prostacyclin. This paper also provides data on pharmacodynamics, clinical efficacy, safety and tolerability of epoprostenol.

Take home message: Despite epoprostenol's short half-life and complicated delivery system, this treatment remains the first choice therapy for severe PAH patients.

Keywords: epoprostenol, pharmacokinetics, prostacyclin, pulmonary arterial hypertension

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. (2010) 6(12):1587-1598

1. Introduction

Prostanoids are arachidonic acid (AA) metabolites including prostaglandins and thromboxanes [1]. The prostaglandin I₂ (PGI₂), also known as prostacyclin, and thromboxane A₂ (TXA₂) are mediators with opposite actions. PGI₂ is a potent vasodilator and has antithrombotic and antiproliferative properties [2] whereas TXA₂ is a platelet activator and a vasoconstrictor. Thus, they maintain vascular homeostasis by exerting their functions locally [3].

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a chronic, progressive disease characterized by an increase in mean pulmonary arterial pressure (mPAP) and pulmonary vascular resistance (PVR), which ultimately results in right ventricular failure and death [4]. Three factors are thought to cause the increased PVR: vasoconstriction, remodeling of the pulmonary vessel wall and thrombosis *in situ* [5]. Endothelial dysfunction plays a crucial role in the pathophysiology of PAH, by decreasing vasoactive mediator production such as PGI₂ [6]. Prior to the development of recent therapeutic options, the prognosis of the disease

informa
healthcare

www.expert-reviews.com/toc/ers/5/2

For reprint orders, please contact reprints@expert-reviews.com

EXPERT
REVIEWS

Pulmonary veno-occlusive disease: advances in clinical management and treatments

Expert Rev. Resp. Med. 5(2), 217–231 (2011)

Alice Huertas^{1,2,3},
Barbara Girerd^{1,2,3},
Peter Dorfmueller^{1,2,3},
Dermot O'Callaghan^{1,2,3},
Marc Humbert^{1,2,3} and
David Montani^{1,2,3}

¹Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, Kremlin-Bicêtre, F-94276, France

²AP-HP, Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécélère, Clamart, F-92140, France

³INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France

⁴Author for correspondence:
Tel.: +33 145 374 772
Fax: +33 146 303 824
david.montani@abc.aphp.fr

Pulmonary veno-occlusive disease (PVOD) is a rare disorder that can be misdiagnosed as idiopathic pulmonary arterial hypertension (PAH) and accounts for 5–10% of cases initially considered as idiopathic PAH. PVOD and idiopathic PAH share a similar clinical presentation, genetic background and hemodynamic profile. A definite diagnosis of PVOD necessitates a surgical biopsy, but since it represents a high-risk procedure in these patients, it is contraindicated. Therefore, a noninvasive diagnostic approach using chest high-resolution computed tomography, arterial blood gas analysis, pulmonary function tests and bronchoalveolar lavage is helpful to detect PVOD. PVOD is characterized by a poor prognosis and the possibility of developing severe pulmonary edema with specific PAH therapy. Lung transplantation remains the treatment of choice.

KEYWORDS: chest high-resolution computed tomography • pulmonary arterial hypertension • pulmonary veno-occlusive disease • small pulmonary vein obstruction • vasodilator drugs

Medscape
EDUCATION

Medscape: Continuing Medical Education Online

This activity has been planned and implemented in accordance with the Essential Areas and policies of the Accreditation Council for Continuing Medical Education through the joint sponsorship of Medscape, LLC and Expert Reviews Ltd. Medscape, LLC is accredited by the ACCME to provide continuing medical education for physicians.

Medscape, LLC designates this Journal-based CME activity for a maximum of **1 AMA PRA Category 1 Credit(s)**[™]. Physicians should claim only the credit commensurate with the extent of their participation in the activity.

All other clinicians completing this activity will be issued a certificate of participation. To participate in this journal CME activity: (1) review the learning objectives and author disclosures; (2) study the education content; (3) take the post-test and/or complete the evaluation at <http://www.medscape.org/journal/expertrespiratory> (4) view/print certificate.

Release date: 21 April 2011; Expiration date: 21 April 2012

Learning objectives

Upon completion of this activity, participants should be able to:

- Distinguish the epidemiology of PVOD
- Compare findings in PVOD and idiopathic PAH
- Evaluate diagnostic tools for PVOD
- Analyze treatment options for PVOD

Financial & competing interests disclosure

EDITOR

Elisa Manzotti, Editorial Director, Future Science Group, London, UK

Disclosure: Elisa Manzotti has disclosed no relevant financial relationships.

CME AUTHOR

Charles P. Vega, MD, Associate Professor; Residency Director, Department of Family Medicine, University of California, Irvine

Disclosure: Charles P. Vega, MD, has disclosed no relevant financial relationships.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdalla SA, *et al.* Primary pulmonary hypertension in families with hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Eur Respir J* 2004; 23:373-377
- Abenheim L, *et al.* Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group. *N Engl J Med* 1996; 335:609-616
- Abraham WT, *et al.* Angiotensin-converting enzyme DD genotype in patients with primary pulmonary hypertension: increased frequency and association with preserved haemodynamics. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 2003; 4:27-30
- Ahima RS, *et al.* Leptin accelerates the onset of puberty in normal female mice. *J Clin Invest* 1997; 99:391-395
- Ahima RS and Flier JS. Leptin. *Annu Rev Physiol* 2000; 62:413-437
- Alastalo TP, *et al.* Disruption of PPAR γ / β -catenin-mediated regulation of apelin impairs BMP-induced mouse and human pulmonary arterial EC survival. *J Clin Invest* 2011; 121:3735-3746
- Aldred MA, *et al.* Somatic chromosome abnormalities in the lungs of patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1153-1160
- Ambrosini G, *et al.* Transcriptional activation of the human leptin gene in response to hypoxia. Involvement of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 2002; 277:34601-34609
- Anders HJ, *et al.* Leptin serum levels are not correlated with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Metabolism* 1999; 48:745-748
- Archer SL, *et al.* Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 1996; 78:431-442
- Archer SL, *et al.* Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294:H570-578
- Arcot SS, *et al.* Basic fibroblast growth factor alterations during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Growth Factors* 1995; 12:121-130
- Armulik A, *et al.* Endothelial/pericyte interactions. *Circ Res* 2005; 97:512-523
- Atkinson C, *et al.* Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002; 105:1672-1678
- Austin ED, *et al.* Alterations in oestrogen metabolism: implications for higher penetrance of familial pulmonary arterial hypertension in females. *Eur Respir J* 2009; 34:1093-1099
- Austin ED, *et al.* T lymphocyte subset abnormalities in the blood and lung in pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2010; 104:454-462
- Austin ED, *et al.* Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5:336-343
- Balabanian K, *et al.* CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165:1419-1425

- Balasubramaniam V, *et al.* Role of platelet-derived growth factor in vascular remodeling during pulmonary hypertension in the ovine fetus. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:L826-833
- Barbier M, *et al.* Elevated plasma leptin concentrations in early stages of experimental intestinal inflammation in rats. *Gut* 1998; 43:783-790
- Barst RJ, *et al.* A comparison of continuous intravenous epoprostenol (prostacyclin) with conventional therapy for primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1996; 334:296-301
- Barst RJ, *et al.* Long-term outcome in pulmonary arterial hypertension patients treated with subcutaneous treprostinil. *Eur Respir J* 2006; 28:1195-1203
- Bauer M, *et al.* Selective upregulation of endothelin B receptor gene expression in severe pulmonary hypertension. *Circulation* 2002; 105:1034-1036
- Bendeck MP, *et al.* Smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase expression after arterial injury in the rat. *Circ Res* 1994; 75:539-545
- Benezra M, *et al.* Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 1993; 81:3324-3331
- Benisty JI, *et al.* Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2004; 126:1255-1261
- Bennett CL, *et al.* The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001; 27:20-21
- Beppu H, *et al.* BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 2000; 221:249-258
- Berk BC. Vascular smooth muscle growth: autocrine growth mechanisms. *Physiol Rev* 2001; 81:999-1030
- Bjornsson J and Edwards WD. Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases. *Mayo Clin Proc* 1985; 60:16-25
- Blanc J, *et al.* Potts shunt in patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2004; 350:623
- Blanchet E, *et al.* E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism. *Nat Cell Biol* 2011; 13:1146-1152
- Blanpain C, *et al.* Serotonin 5-HT_{2B} receptor loss of function mutation in a patient with fenfluramine-associated primary pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2003; 60:518-528
- Bonnet S, *et al.* An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006; 113:2630-2641
- Botto L, *et al.* Biochemical and morphological changes in endothelial cells in response to hypoxic interstitial edema. *Respir Res* 2006; 7:7
- Bordron A, *et al.* The binding of some human antiendothelial cell antibodies induces endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998; 101:2029-2035
- Bouloumié A, *et al.* Leptin, the product of Ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998; 83:1059-1066
- Brenner B, *et al.* Plasma serotonin levels and the platelet serotonin transporter. *J Neurochem* 2007; 102:206-215

- Brenot F, *et al.* Primary pulmonary hypertension and fenfluramine use. *Br Heart J* 1993; 70:537-541
- 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* 2009; 104:1184-1191
- Buczek-Thomas JA and Nugent MA. Elastase-mediated release of heparan sulfate proteoglycans from pulmonary fibroblast cultures. A mechanism for basic fibroblast growth factor (bFGF) release and attenuation of bfgf binding following elastase-induced injury. *J Biol Chem* 1999; 274:25167-25172
- Bunting S, *et al.* Arterial walls generate from prostaglandin endoperoxides a substance (prostaglandin X) which relaxes strips of mesenteric and coeliac arteries and inhibits platelet aggregation. *Prostaglandins* 1976; 12:897-913
- Bussone G, *et al.* IgG from patients with pulmonary arterial hypertension and/or systemic sclerosis binds to vascular smooth muscle cells and induces cell contraction. *Ann Rheum Dis* 2012; 71:596-605
- Cacoub P, *et al.* Endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 1997; 33:196-200
- Caldefie-Chezet F, *et al.* Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils. *Free Radic Res* 2003; 37:809-814
- Campbell AI, *et al.* Cell-based gene transfer to the pulmonary vasculature: Endothelial nitric oxide synthase overexpression inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999; 21:567-575
- Campbell AI, *et al.* Cell-based gene transfer of vascular endothelial growth factor attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 104:2242-2248
- Carmeliet P, *et al.* Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; 380:435-439
- Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 2005; 438:932-936
- Carvalho D, *et al.* IgG antiendothelial cell autoantibodies from scleroderma patients induce leukocyte adhesion to human vascular endothelial cells in vitro. Induction of adhesion molecule expression and involvement of endothelium-derived cytokines. *J Clin Invest* 1996; 97:111-119
- Chalasani N, *et al.* Does leptin play a role in the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis? *Am J Gastroenterol* 2003; 98:2771-2776
- Champion HC, *et al.* Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase to the lung of the mouse in vivo. Effect on agonist-induced and flow-mediated vascular responses. *Circ Res* 1999; 84:1422-1432
- Channick RN, *et al.* Effects of the dual endothelin-receptor antagonist bosentan in patients with pulmonary hypertension: a randomised placebo-controlled study. *Lancet* 2001; 358:1119-1123
- Chaouat A, *et al.* Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2004; 59:446-448
- Chatila TA, *et al.* JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000; 106:R75-81

- Chehab FF, *et al.* Correction of the sterility defect in homozygous obese female mice by treatment with the human recombinant leptin. *Nat Genet* 1996; 12:318-320
- Chelladurai P, *et al.* Matrix metalloproteinases and their inhibitors in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2012; 40:766-782
- Chervonsky AV. Influence of microbial environment on autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11:28-35
- Chesney J, *et al.* An essential role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) in angiogenesis and the growth of a murine lymphoma. *Mol Med* 1999; 5:181-191
- Christ G, *et al.* Impairment of the plasmin activation system in primary pulmonary hypertension: evidence for gender differences. *Thromb Haemost* 2001; 86:557-562
- Christie JD, *et al.* Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fifth official adult lung and heart/lung transplantation report--2008. *J Heart Lung Transplant* 2008; 27:957-969
- Christman BW, *et al.* An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327:70-75
- Christou H, *et al.* Increased vascular endothelial growth factor production in the lungs of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998; 18:768-776
- Chu D, *et al.* A new animal model for pulmonary hypertension based on the overexpression of a single gene, angiopoietin-1. *Ann Thorac Surg* 2004; 77:449-456
- Cines DB, *et al.* Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-3561
- Cogan JD, *et al.* High frequency of BMPR2 exonic deletions/duplications in familial pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:590-598
- Cogolludo A, *et al.* Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 2006; 98:931-938
- Coleman DL. Obese and diabetes: two mutant genes causing diabetes-obesity syndromes in mice. *Diabetologia* 1978; 14:141-148
- Condliffe R, *et al.* Connective tissue disease-associated pulmonary arterial hypertension in the modern treatment era. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:151-157
- Conus S, *et al.* Leptin is an eosinophil survival factor. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 116:1228-1234
- Cool CD, *et al.* Three-dimensional reconstruction of pulmonary arteries in plexiform pulmonary hypertension using cell-specific markers. Evidence for a dynamic and heterogeneous process of pulmonary endothelial cell growth. *Am J Pathol* 1999; 155:411-419
- Coppock EA, *et al.* Molecular basis of hypoxia-induced pulmonary vasoconstriction: role of voltage-gated K⁺ channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L1-12
- Coppock EA and Tamkun MM. Differential expression of K(V) channel alpha- and beta-subunits in the bovine pulmonary arterial circulation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281:L1350-L1360
- Cowan KN, *et al.* Regression of hypertrophied rat pulmonary arteries in organ culture is associated with suppression of proteolytic activity, inhibition of tenascin-C, and smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 1999; 84:1223-1233

- Cowan KN, *et al.* Complete reversal of fatal pulmonary hypertension in rats by a serine elastase inhibitor. *Nat Med* 2000; 6:698-702
- Crispin JC *et al.* Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *J Autoimmun* 2003; 21:273-276
- Curotto de Lafaille MA and Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity* 2009; 30:626-635
- Dahal BK, *et al.* Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:158-167
- Daley E, *et al.* Pulmonary arterial remodeling induced by a Th2 immune response. *J Exp Med* 2008; 205:361-372
- Dartevielle P, *et al.* Chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2004; 23:637-648
- David L, *et al.* Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood* 2007; 109:1953-1961
- Davie NJ, *et al.* Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286:L668-L678
- de Kleer IM, *et al.* CD4+CD25bright regulatory T cells actively regulate inflammation in the joints of patients with the remitting form of juvenile idiopathic arthritis. *J Immunol* 2004; 172:6435-6443
- de Man FS, *et al.* Dysregulated renin-angiotensin-aldosterone system contributes to pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:780-789
- 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* 2000; 67:737-744
- Dewachter L, *et al.* Angiotensin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 174:1025-1033
- Dimmeler S and Zeiher AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ* 1999; 6:964-968
- Dorfmueller P, *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003; 22:358-363
- Douglas JG, *et al.* Pulmonary hypertension and fenfluramine. *Br Med J* 1981; 283:881-883
- Dresdale DT, *et al.* Recent studies in primary pulmonary hypertension, including pharmacodynamic observations on pulmonary vascular resistance. *Bull N Y Acad Med* 1954; 30:195-207
- Du L, *et al.* Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348:500-509
- Ducy P, *et al.* Leptin inhibits bone formation through a hypothalamic relay: a central control of bone mass. *Cell* 2000; 100:197-207
- Duffy MJ. Urokinase plasminogen activator and its inhibitor, PAI-1, as prognostic markers in breast cancer: from pilot to level 1 evidence studies." *Clin Chem* 2002; 48:1194-1197

- Dumitrascu R, *et al.* Activation of soluble guanylate cyclase reverses experimental pulmonary hypertension and vascular remodeling. *Circulation* 2006; 113:286-295
- Dumitrascu R, *et al.* Terguride ameliorates monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Eur Respir J* 2011; 37:1104-1118
- Eddahibi S, *et al.* Treatment with 5-HT potentiates development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *Am J Physiol* 1997; 272:H1173-1181
- Eddahibi S, *et al.* Effect of dexfenfluramine treatment in rats exposed to acute and chronic hypoxia. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1111-1119
- Eddahibi S, *et al.* Imbalance between platelet vascular endothelial growth factor and platelet-derived growth factor in pulmonary hypertension. Effect of prostacyclin therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162:1493-1499
- Eddahibi S, *et al.* Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2001; 108:1141-1150
- Eddahibi S, *et al.* Hyperplasia of pulmonary artery smooth muscle cells is causally related to overexpression of the serotonin transporter in primary pulmonary hypertension. *Chest* 2002; 121:97S-98S
- Eddahibi S, *et al.* Polymorphism of the serotonin transporter gene and pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Circulation* 2003; 108:1839-1844
- Eddahibi S, *et al.* Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation* 2006; 113:1857-1864
- Edwards BS, *et al.* Coexistent pulmonary and portal hypertension: morphologic and clinical features. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10:1233-1238
- Eisenberg PR, *et al.* Fibrinopeptide A levels indicative of pulmonary vascular thrombosis in patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1990; 82:841-847
- Fadel E, *et al.* Long-term outcome of double-lung and heart-lung transplantation for pulmonary hypertension: a comparative retrospective study of 219 patients. *Eur J Cardiothorac Surg* 2010; 38:277-284
- Fagan KA, *et al.* The pulmonary circulation of homozygous or heterozygous eNOS-null mice is hyperresponsive to mild hypoxia. *J Clin Invest* 1999; 103:291-299
- Faggioni R, *et al.* Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. *FASEB J* 2001; 15:2565-2571
- Fartoukh M, *et al.* Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114:50S-51S
- Fishman AP. Hypoxia on the pulmonary circulation. How and where it acts. *Circ Res* 1976; 38:221-231
- Fishman AP. Clinical classification of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 2001; 22:385-391
- Flier JS. Obesity wars: molecular progress confronts an expanding epidemic. *Cell* 2004; 116:337-350
- Folkman J and D'Amore PA. Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 1996; 87:1153-1155

- Ford VA, *et al.* Thrombomodulin is preferentially expressed in Balb/c lung microvessels. *J Biol Chem* 1992; 267:5446-5450
- Frank S, *et al.* Leptin enhances wound re-epithelialization and constitutes a direct function of leptin in skin repair. *J Clin Invest* 2000; 106:501–509
- Frasch HF, *et al.* Endothelin-1 is elevated in monocrotaline pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1999; 276:L304-310
- Frid MG, *et al.* Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002; 90:1189-1196
- Frishman WH, *et al.* Serotonin and serotonin antagonism in cardiovascular and non-cardiovascular disease. *J Clin Pharmacol* 1995; 35:541-572
- Frühbeck G. Intracellular signalling pathways activated by leptin. *Biochem J* 2006; 393:7-20
- Furchgott RF and Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-376
- Fuster V, *et al.* Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation* 1984; 70:580-587
- Gainsford T and Alexander WS. A role for leptin in hemopoieses? *Mol Biotechnol* 1999; 11:149-58
- Galiè N, *et al.* Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2004; 25:2243-2278
- Galiè N, *et al.* Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353:2148-2157
- Galiè N, *et al.* Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 2009; 30:2493-2537
- Galiè N, *et al.* Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2009; 119:2894-2903
- Gambaryan N, *et al.* Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit⁺ cell mobilisation in hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2010; 36:1209-1211
- Gambaryan N, *et al.* Targeting of c-kit⁺ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2011; 37:1392-1399
- Gambaryan N, *et al.* Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2012; 39:210-212
- Gangopahyay A, *et al.* Bone morphogenetic protein receptor II is a novel mediator of endothelial nitric-oxide synthase activation. *J Biol Chem* 2011; 286:33134-33140
- Garcia-Cao I, *et al.* Systemic elevation of PTEN induces a tumor-suppressive metabolic state. *Cell* 2012; 149:49-62
- George SJ, *et al.* Plasmin-mediated fibroblast growth factor-2 mobilisation supports smooth muscle cell proliferation in human saphenous vein. *J Vasc Res* 2001; 38:492-501
- George J *et al.* Transgenic expression of human matrix metalloproteinase-1 attenuates pulmonary arterial hypertension in mice. *Clin Sci* 2012; 122:83-92

- Geraci MW, *et al.* Pulmonary prostacyclin synthase overexpression in transgenic mice protects against development of hypoxic pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1999; 103:1509-1515
- Ghofrani HA, *et al.* Differences in hemodynamic and oxygenation responses to three different phosphodiesterase-5 inhibitors in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized prospective study. *J Am Coll Cardiol* 2004; 44:1488-1496
- Ghofrani HA, *et al.* Imatinib in pulmonary arterial hypertension patients with inadequate response to established therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182:1171-1177
- Ghofrani HA, *et al.* Riociguat for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013; 369:330-340
- Giaid A, *et al.* Expression of endothelin-1 in lungs of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis. *Lancet* 1993; 341:1550-1554
- Giaid A and Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1995; 333:214-221
- Giaid A. Nitric oxide and endothelin-1 in pulmonary hypertension. *Chest* 1998; 114:208S-212S
- Girerd B, *et al.* Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an ACVRL1 (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 181:851-861
- Goda N and Kanai M. Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism. *Int J Hematol* 2012; 95:457-463
- Gomez-Arroyo JG, *et al.* The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302:L363-369
- Gonçalves LM. Fibroblast growth factor-mediated angiogenesis for the treatment of ischemia. Lessons learned from experimental models and early human experience. *Rev Port Cardiol* 1998; 17:111-20
- Gualillo O, *et al.* Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sci* 2000; 67:2433-2441
- Guignabert C, *et al.* Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circulation* 2005; 111:2812-2819
- Guignabert C, *et al.* Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension. *Circ Res* 2006; 98:1323-1330
- Guignabert C, *et al.* Dichloroacetate treatment partially regresses established pulmonary hypertension in mice with SM22alpha-targeted overexpression of the serotonin transporter. *FASEB J* 2009; 23:4135-4147
- 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* 2009; 297:L1082-1090
- Guilluy C, *et al.* RhoA and Rho kinase activation in human pulmonary hypertension: role of 5-HT signaling. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 179:1151-1158
- Hachulla E, *et al.* Risk factors for death and the 3-year survival of patients with systemic sclerosis: the French ItinérAIR-Sclérodemie study. *Rheumatology* 2009; 48:304-308

- Hamid R, *et al.* Penetrance of pulmonary arterial hypertension is modulated by the expression of normal BMPR2 allele. *Hum Mutat* 2009; 30:649-654
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 1997; 277:48-50
- Haynes WG *et al.* Receptor-mediated regional sympathetic nerve activation by leptin. *J Clin Invest* 1997; 100:270-278
- He H, *et al.* Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 1999; 274:25130-25135
- Herve P, *et al.* Primary pulmonary hypertension in a patient with a familial platelet storage pool disease: role of serotonin. *Am J Med* 1990; 89:117-120
- Hervé P, *et al.* Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension. *Am J Med* 1995; 99:249-254
- Herve P, *et al.* Pathobiology of pulmonary hypertension. The role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med* 2001; 22:451-458
- Higenbottam T, *et al.* The acute effects of dexfenfluramine on human and porcine pulmonary vascular tone and resistance. *Chest* 1999; 116:921-930
- Hironaka E, *et al.* Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats. *Cardiovasc Res* 2003; 60:692-699
- Hoepfer MM, *et al.* Imatinib mesylate as add-on therapy for pulmonary arterial hypertension: results of the randomized IMPRES study. *Circulation* 2013; 127:1128-1138
- Hoffmann J, *et al.* Mast cells promote lung vascular remodelling in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2011; 37:1400-1410
- Hong KH, *et al.* Genetic ablation of the BMPR2 gene in pulmonary endothelium is sufficient to predispose to pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008; 118:722-730
- Hopkins WE. The remarkable right ventricle of patients with Eisenmenger syndrome. *Coron Artery Dis* 2005; 16:19-25
- Hoshikawa Y, *et al.* Prostacyclin receptor-dependent modulation of pulmonary vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164:314-318
- Howard JK, *et al.* Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in *ob/ob* mice. *J Clin Invest* 1999; 104:1051-1059
- Huang ZD, *et al.* Defective pulmonary vascular remodeling in Smad8 mutant mice. *Hum Mol Genet* 2009; 18:2791-2801
- Huber K, *et al.* Fibrinogen, t-PA, and PAI-1 plasma levels in patients with pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150:929-933
- Huertas A, *et al.* Pulmonary veno-occlusive disease: advances in clinical management and treatments. *Expert Rev Respir Med* 2011; 5:217-229
- Huertas A, *et al.* Leptin and regulatory T-lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2012; 40:895-904
- Humbert M, *et al.* Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 151:1628-1631

- Humbert M, *et al.* BMPR2 germline mutations in pulmonary hypertension associated with fenfluramine derivatives. *Eur Respir J* 2002; 20:518-523
- Humbert M, *et al.* Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; **173**:1023-1030
- Humbert M, *et al.* Survival in incident and prevalent cohorts of patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2010; **36**:549-555
- Humbert M. Impression, sunset. *Circulation* 2013; 127:1098-1100
- Ieda M, *et al.* Endothelin-1 regulates cardiac sympathetic innervation in the rodent heart by controlling nerve growth factor expression. *J Clin Invest* 2004; 113:876-884
- Ihle JN. Cytokine receptor signalling. *Nature* 1995; 377:591-594
- Ilkiw R, *et al.* SC-39026, a serine elastase inhibitor, prevents muscularization of peripheral arteries, suggesting a mechanism of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 1989; 64:814-825
- Imaizumi T, *et al.* Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2004; 11:15-21
- Isern RA, *et al.* Autoantibodies in patients with primary pulmonary hypertension: association with anti-Ku. *Am J Med* 1992; 93:307-312
- Izikki M, *et al.* Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:L1045-1052
- Izikki M, *et al.* Endothelial-derived FGF-2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J Clin Invest* 2009; 119:512-523
- Jain RK and Booth MF. What brings pericytes to tumor vessels? *J Clin Invest* 2003; 112:1134-1136
- 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* 2008; 58:521-531
- Jasmin JF, *et al.* Effectiveness of a nonselective ET(A/B) and a selective ET(A) antagonist in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2001; 103:314-318
- Jerkic M, *et al.* Pulmonary hypertension in adult Alk1 heterozygous mice due to oxidative stress. *Cardiovasc Res* 2011; 92:375-384
- Johnson SR, *et al.* Thrombotic arteriopathy and anticoagulation in pulmonary hypertension. *Chest* 2006; 130:545-552
- Jones PL and Rabinovitch M. Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 1996; 79:1131-1142
- Jones PL, *et al.* Regulation of tenascin-C, a vascular smooth muscle cell survival factor that interacts with the alpha v beta 3 integrin to promote epidermal growth factor receptor phosphorylation and growth. *J Cell Biol* 1997; 139:279-293
- Kay JM, *et al.* Electron microscopy of Crotalaria pulmonary hypertension. *Thorax* 1969; 24:511-526
- Keegan A, *et al.* Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935. *Circ Res* 2001; 89:1231-1239

- Keogh AM, *et al.* Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:S67-77
- Kido M, *et al.* Gene transfer of a TIE2 receptor antagonist prevents pulmonary hypertension in rodents. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2005; 129:268-276
- Kim YM, *et al.* Neutrophil elastase is produced by pulmonary artery smooth muscle cells and is linked to neointimal lesions. *Am J Pathol* 2011; 179:1560-1572
- Kouri FM, *et al.* Plasminogen activator inhibitor type 1 inhibits smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40:1872-1882
- Kouyoumdjian C, *et al.* Continuous inhalation of nitric oxide protects against development of pulmonary hypertension in chronically hypoxic rats. *J Clin Invest* 1994; 94:578-584
- Kriegel MA, *et al.* Defective suppressor function of human CD4+ CD25+ regulatory T cells in autoimmune polyglandular syndrome type II. *J Exp Med* 2004; 199:1285-1291
- Kwapiszewska G, *et al.* PAR-2 inhibition reverses experimental pulmonary hypertension. *Circ Res* 2012; 110:1179-1191
- La Cava A and Matarese G. The weight of leptin in immunity. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:371-379
- Labombarda F, *et al.* Potts anastomosis for children with idiopathic pulmonary hypertension. *Pediatr Cardiol* 2009; 30:1143-1145
- Lam QL and Lu L. Role of leptin in immunity. *Cell Mol Immunol* 2007; 4:1-13
- Lane KB, *et al.* Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. *Nat Genet* 2000; 26:81-84
- Langleben D and Reid LM. Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy. *Lab Invest* 1985; 52:298-303
- Langleben D, *et al.* Effects of the thromboxane synthetase inhibitor and receptor antagonist terbogrel in patients with primary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2002; 143:E4
- Launay JM, *et al.* Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension. *Nat Med* 2002; 8:1129-1135
- Lawrie A, *et al.* Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res* 2005; 97:227-235
- Le Cras TD, *et al.* Disrupted pulmonary vascular development and pulmonary hypertension in transgenic mice overexpressing transforming growth factor-alpha. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 285:L1046-1054
- Lee SD, *et al.* Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 1998; 101:927-934
- Lee YS, *et al.* Monocrotaline-induced pulmonary hypertension correlates with upregulation of connective tissue growth factor expression in the lung. *Exp Mol Med* 2005; 37:27-35
- Legradi G, *et al.* Leptin prevents fasting-induced suppression of prothyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 1997; 138:2569-2576

- Lepetit H, *et al.* Smooth muscle cell matrix metalloproteinases in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2005; 25:834-842
- Li H, *et al.* Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia. *J Appl Physiol* 1994; 77:1451-1459
- Li P, *et al.* Fibroblast growth factor mediates hypoxia-induced endothelin-- a receptor expression in lung artery smooth muscle cells. *J Appl Physiol* 2003; 95:643-651
- Liang OD, *et al.* Mesenchymal stromal cells expressing heme oxygenase-1 reverse pulmonary hypertension. *Stem Cells* 2011; 29:99-107
- Liu W, *et al.* CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006; 203:1701-1711
- Loffreda S, *et al.* Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 1998; 12:57-65
- Long L, *et al.* Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res* 2006; 98:818-827
- Lopes AA, *et al.* Endothelial cell dysfunction correlates differentially with survival in primary and secondary pulmonary hypertension. *Am Heart J* 2000; 139:618-623
- Louzier V, *et al.* Role of VEGF-B in the lung during development of chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003; 284:L926-937
- Loyd JE, *et al.* Genetic anticipation and abnormal gender ratio at birth in familial primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152:93-97
- Ma W, *et al.* Calpain mediates pulmonary vascular remodeling in rodent models of pulmonary hypertension, and its inhibition attenuates pathologic features of disease. *J Clin Invest* 2011; 121:4548-4566
- Ma L, *et al.* A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2013; 369:351-361
- Machado RD, *et al.* Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 2006; 27:121-132
- Machado RD, *et al.* Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:S32-42
- MacLean MR, *et al.* Overexpression of the 5-hydroxytryptamine transporter gene: effect on pulmonary hemodynamics and hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 109:2150-2155
- Mandegar M, *et al.* Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 2004; 68:75-103
- Marcos E, *et al.* Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168:487-493
- Marcos E, *et al.* Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res* 2004; 94:1263-1270
- Marcos E, *et al.* Serotonin transporter and receptors in various forms of human pulmonary hypertension. *Chest* 2005; 128:552S-553S
- Maruyama K, *et al.* Chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats and increased elastolytic activity. *Am J Physiol* 1991; 261:H1716-1726
- Mason NA, *et al.* High expression of endothelial nitric oxide synthase in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *J Pathol* 1998; 185:313-318

- Masri FA, *et al.* Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:L548-554
- Matarese G, *et al.* Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4(+)CD25+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102:5150-5155
- Mattioli B, *et al.* Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway. *FEBS Lett* 2009; 583:1102-1106
- McGoon M, *et al.* Screening, early detection, and diagnosis of pulmonary arterial hypertension: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2004; 126:14S-34S
- Meyrick B and Reid L. Ultrastructural findings in lung biopsy material from children with congenital heart defects. *Am J Pathol* 1980; 101:527-542
- Michelakis ED, *et al.* Dichloroacetate, a metabolic modulator, prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension in rats: role of increased expression and activity of voltage-gated potassium channels. *Circulation* 2002; 105:244-250
- Mitani Y, *et al.* Mast cell chymase in pulmonary hypertension. *Thorax* 1999; 54:88-90
- Moncada S, *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142
- Montani D, *et al.* Reversibility of pulmonary arterial hypertension in HIV/HHV8-associated Castleman's disease. *Eur Respir J* 2005; 26:969-972
- Montani D, *et al.* Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J* 2009; 33:189-200
- Montani D, *et al.* Long-term response to calcium-channel blockers in non-idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2010; 31:1898-1907
- Montani D, *et al.* C-kit-positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011; 184:116-123
- Montani D, *et al.* Letter regarding article Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2011; 123:e614; author reply e615
- Montani D, *et al.* Pulmonary arterial hypertension in patients treated by dasatinib. *Circulation* 2012; 125:2128-2137
- Moore SI, *et al.* Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Immun* 2003; 71:4182-4185
- Morecroft I, *et al.* 5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor. *Br J Pharmacol* 1999; 128:730-734
- Morecroft I, *et al.* In vivo effects of a combined 5-HT_{1B} receptor/SERT antagonist in experimental pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2010; 85:593-603
- Morrell NW, *et al.* Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:S20-31
- Morse JH and Barst RJ. Detection of familial primary pulmonary hypertension by genetic testing. *N Engl J Med* 1997; 337:202-203
- Morton GJ, *et al.* Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* 2005; 2:411-420
- Mueller MM and Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:839-849

- Mulvany MJ and Aalkjaer C. Structure and function of small arteries. *Physiol Rev* 1990; 70:921-961
- Mushaben EM, *et al.* Chronic allergic inflammation causes vascular remodeling and pulmonary hypertension in BMPR2 hypomorph and wild-type mice. *PLoS One* 2012; 7:e32468
- Mutch DM and Clément K. Unraveling the genetics of human obesity. *PLoS Genet* 2006; 2:e188
- Myers TJ, *et al.* Mesenchymal stem cells at the intersection of cell and gene therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2010; 10:1663-1679
- Naeije R and Dewachter L. Animal models of pulmonary arterial hypertension. *Rev Mal Respir* 2007; 24:481-496
- Nasim MT, *et al.* Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat* 2011; 32:1385-1389
- Ng WF, *et al.* Human CD4+CD25+ cells: a naturally occurring population of regulatory T cells. *Blood* 2001; 98:2736-2744
- Nichols WC, *et al.* Localization of the gene for familial primary pulmonary hypertension to chromosome 2q31-32. *Nat Genet* 1997; 15:277-280
- Nilsson O, *et al.* Subcellular localization of serotonin immunoreactivity in rat enterochromaffin cells. *Histochemistry* 1985; 82:351-355
- Nishida M, *et al.* Roles of endothelin ETA and ETB receptors in the pathogenesis of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004; 44:187-191
- Nishihara A, *et al.* Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* 2002; 13:3055-3063
- O'Callaghan DS, *et al.* Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* 2011; 8:526-538
- Obata H, *et al.* Single injection of a sustained-release prostacyclin analog improves pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:195-201
- Ono M, *et al.* Hepatocyte growth factor suppresses vascular medial hyperplasia and matrix accumulation in advanced pulmonary hypertension of rats. *Circulation* 2004; 110:2896-2902
- Opitz CF, *et al.* Clinical efficacy and survival with first-line inhaled iloprost therapy in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Heart J* 2005; 26:1895-1902
- Orens JB, *et al.* International guidelines for the selection of lung transplant candidates: 2006 update--a consensus report from the Pulmonary Scientific Council of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006; 25:745-755
- Otero M, *et al.* Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. *FEBS Lett* 2005; 579:295-301
- Ozata M, *et al.* Human leptin deficiency caused by a missense mutation: multiple endocrine defects, decreased sympathetic tone, and immune system dysfunction indicate new targets for leptin action, greater central than peripheral resistance to the effects of leptin, and spontaneous correction of leptin-mediated defects. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3686-3695

- Ozawa K, *et al.* Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs). *J Autoimmun* 2008; 30:121-127
- Partovian C, *et al.* Heart and lung VEGF mRNA expression in rats with monocrotaline- or hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Physiol* 1998; 275:H1948-1956
- Partovian C, *et al.* Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000; 23:762-771
- Pénicaud L, *et al.* Leptin and the central control of feeding behavior. *Biochimie* 2012; 94:2069-2074
- Perros F, *et al.* Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007; 29:937-943
- Perros F, *et al.* Understanding the role of CD4+CD25(high) (so-called regulatory) T cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration* 2008; 75:253-256
- Perros F, *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178:81-88
- Perros F, *et al.* Pulmonary lymphoid neogenesis in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 185:311-321
- Perros F, *et al.* Cytotoxic cells and granulysin in pulmonary arterial hypertension and pulmonary veno-occlusive disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013; 187:189-196
- Pietra GG, *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* 1989; 80:1198-1206
- Price LC, *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012; 141:210-221
- Puzio-Kuter AM. The Role of p53 in Metabolic Regulation. *Genes Cancer* 2011; 2:385-391
- Quinn TP, *et al.* Cyclic mechanical stretch induces VEGF and FGF-2 expression in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:L897-903
- Rabinovitch M, *et al.* Abnormal endothelial factor VIII associated with pulmonary hypertension and congenital heart defects. *Circulation* 1987; 76:1043-1052
- Rabinovitch M. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol* 1999; 277:L5-12
- Rabinovitch M. Pathobiology of pulmonary hypertension. Extracellular matrix. *Clin Chest Med* 2001; 22:433-449
- Rabinovitch M. Linking a serotonin transporter polymorphism to vascular smooth muscle proliferation in patients with primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2001; 108:1109-1111
- Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary hypertension conference summary. *Chest* 2005; 128:642S-646S
- Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2008; 118:2372-2379
- Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 2012; 122:4306-4313

- Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004; 15:237-254
- Raso GM, *et al.* Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1. *Br J Pharmacol* 2002; 137:799-804
- Ray L, *et al.* Early increase in pulmonary vascular reactivity with overexpression of endothelin-1 and vascular endothelial growth factor in canine experimental heart failure. *Exp Physiol* 2008; 93:434-442
- Remillard CV, *et al.* Function of Kv1.5 channels and genetic variations of KCNA5 in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C1837-1853
- Ren W, *et al.* Serotonin transporter interacts with the PDGF β receptor in PDGF-BB-induced signaling and mitogenesis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2011; 300:L486-497
- Reynolds AM, *et al.* Targeted gene delivery of BMPR2 attenuates pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2012; 39:329-343
- Rich S, *et al.* Thromboxane synthetase inhibition in primary pulmonary hypertension. *Chest* 1987; 91:356-360
- Rich S, *et al.* The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 1992; 327:76-81
- Rich S, *et al.* Long-term effects of epoprostenol on the pulmonary vasculature in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2010; 138:1234-1239
- Roberts JD Jr, *et al.* Nitric oxide inhalation decreases pulmonary artery remodeling in the injured lungs of rat pups. *Circ Res* 2000; 87:140-145
- Rondelet B, *et al.* Bosentan for the prevention of overcirculation-induced experimental pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2003; 107:1329-1335
- Rozkovec A, *et al.* Factors that influence the outcome of primary pulmonary hypertension. *Br Heart J* 1986; 55:449-458
- Rubin LJ, *et al.* Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2002; 346:896-903
- Rubin LJ, *et al.* Long-term treatment with sildenafil citrate in pulmonary arterial hypertension: the SUPER-2 study. *Chest* 2011; 140:1274-1283
- Rudarakanchana N, *et al.* Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 2002; 11:1517-1525
- Rudge JS, *et al.* Angiopoietin-1 and pulmonary hypertension: cause or cure? *Circ Res* 2003; 92:947-949
- Ruf A and Morgenstern E. Ultrastructural aspects of platelet adhesion on subendothelial structures. *Semin Thromb Hemost* 1995; 21:119-122
- Said SI, *et al.* Moderate pulmonary arterial hypertension in male mice lacking the vasoactive intestinal peptide gene. *Circulation* 2007; 115:1260-1268
- Sakaguchi S, *et al.* Study on cellular events in postthymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med* 1982; 156:1577-1586

- Sakaguchi S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155:1151-1164
- Sakaguchi S, *et al.* Foxp3⁺ CD25⁺ CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006; 212:8-27
- Sakaguchi S, *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell* 2008; 133:775-787
- Sakaguchi S, *et al.* Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? *Int Immunol* 2009; 21:1105-1111
- Sakamaki F, *et al.* Increased plasma P-selectin and decreased thrombomodulin in pulmonary arterial hypertension were improved by continuous prostacyclin therapy. *Circulation* 2000; 102:2720-2725
- Sakao S, *et al.* VEGF-R blockade causes endothelial cell apoptosis, expansion of surviving CD34⁺ precursor cells and transdifferentiation to smooth muscle-like and neuronal-like cells. *FASEB J* 2007; 21:3640-3652
- Sakao S, *et al.* Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation. *Respir Res* 2009; 10:95
- Sakao S, *et al.* Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010; 43:629-634
- Sanchez O, *et al.* Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2006; 130:182-189
- Sanchez O, *et al.* Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 176:1041-1047
- Sánchez-Margalet V, *et al.* Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. *Clin Exp Immunol* 2003; 133:11-19
- Santos-Alvarez J, *et al.* Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. *Cell Immunol* 1999; 194:6-11
- Sato K, *et al.* Factors influencing the idiopathic development of pulmonary hypertension in the fawn hooded rat. *Am Rev Respir Dis* 1992; 145:793-797
- Savale L, *et al.* Impact of interleukin-6 on hypoxia-induced pulmonary hypertension and lung inflammation in mice. *Respir Res* 2009; 10:6
- Savale L, *et al.* Pulmonary hypertension associated with benfluorex exposure. *Eur Respir J* 2012; 40:1164-1172
- Schermuly RT, *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115:2811-2821
- Schols AM, *et al.* Plasma leptin is related to proinflammatory status and dietary intake in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160:1220-1226
- Shintani M, *et al.* A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet* 2009; 46:331-337
- Sierra-Honigmann MR, *et al.* Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998; 281:1683-6
- Simonneau G, *et al.* Clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43:5S-12S
- Simonneau G, *et al.* Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2009; 54:S43-54

- Sitaraman S, *et al.* Colonic leptin: source of a novel proinflammatory cytokine involved in IBD. *FASEB J* 2004; 18:696-698
- Sitbon O, *et al.* Long-term intravenous epoprostenol infusion in primary pulmonary hypertension: prognostic factors and survival. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:780-788
- Sitbon O, *et al.* Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 111:3105-3111
- Soon E, *et al.* Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2010; 122:920-927
- Souza R, *et al.* Pulmonary arterial hypertension associated with fenfluramine exposure: report of 109 cases. *Eur Respir J* 2008; 31:343-348
- Steiner MK, *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res* 2009; 104:236-244
- Stenmark KR and Frid MG. Smooth muscle cell heterogeneity: role of specific smooth muscle cell subpopulations in pulmonary vascular disease. *Chest* 1998; 114:82S-90S
- Stenmark KR *et al.* Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling. *Chest* 2002; 122:326S-334S
- Stenmark KR, *et al.* Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297:L1013-1032
- Stitham J, *et al.* Prostacyclin: an inflammatory paradox. *Front Pharmacol* 2011; 2:24
- Sullivan CC, *et al.* Induction of pulmonary hypertension by an angiopoietin 1/TIE2/serotonin pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:12331-12336
- Sundaram N, *et al.* High levels of placenta growth factor in sickle cell disease promote pulmonary hypertension. *Blood* 2010; 116:109-112
- Sztrymf B, *et al.* Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in carriers of BMPR2 mutation. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1377-1383
- Takabatake N, *et al.* Circulating leptin in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1215-1219
- Tamby MC *et al.* Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2005; 60:765-772
- Tamosiuniene R, *et al.* Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res* 2011; 109:867-879
- Tanabe Y, *et al.* Mechanical stretch augments PDGF receptor beta expression and protein tyrosine phosphorylation in pulmonary artery tissue and smooth muscle cells. *Mol Cell Biochem* 2000; 215:103-113
- Taraseviciene-Stewart L, *et al.* Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001; 15:427-438
- Taraseviciene-Stewart L, *et al.* Absence of T cells confers increased pulmonary arterial hypertension and vascular remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; 175:1280-1289
- Teichert-Kuliszewska K, *et al.* Bone morphogenetic protein receptor-2 signaling promotes pulmonary arterial endothelial cell survival: implications for loss-of-function mutations in the pathogenesis of pulmonary hypertension. *Circ Res* 2006; 98:209-217

- Terrier B, *et al.* Identification of target antigens of antifibroblast antibodies in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 177:1128-1134
- Thistlethwaite PA, *et al.* Outcomes of pulmonary endarterectomy for treatment of extreme thromboembolic pulmonary hypertension. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131:307-313
- Thompson K and Rabinovitch M. Exogenous leukocyte and endogenous elastases can mediate mitogenic activity in pulmonary artery smooth muscle cells by release of extracellular-matrix bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol* 1996; 166:495-505
- Toyoda Y, *et al.* Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Ann Thorac Surg* 2008; 86:1116-1122
- Trembath RC, *et al.* Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med* 2001; 345:325-334
- Tu L, *et al.* Autocrine fibroblast growth factor-2 signaling contributes to altered endothelial phenotype in pulmonary hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 45:311-322
- Tu L, *et al.* A critical role for p130Cas in the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *Am J Respir Crit Care Med* 2012; 186:666-676
- Tudor RM, *et al.* Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 1994; 144:275-285
- Tudor RM, *et al.* Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159:1925-1932
- Tudor RM, *et al.* Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis. *J Pathol* 2001; 195:367-374
- Ulrich S, *et al.* Increased regulatory and decreased CD8+ cytotoxic T cells in the blood of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respiration* 2008; 75:272-280
- Uygun A, *et al.* Serum leptin levels in patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:3584-3589
- Vane JR, *et al.* Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36
- Veillat V, *et al.* Macrophage migration inhibitory factor elicits an angiogenic phenotype in human ectopic endometrial cells and triggers the production of major angiogenic factors via CD44, CD74, and MAPK signaling pathways. *J Clin Endocrinol Metab* 2010; 95:E403-412
- Vieillard-Baron A, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer or doxycycline aggravates pulmonary hypertension in rats. *Circ Res* 2000; 87:418-425
- Vieillard-Baron A, *et al.* Inhibition of matrix metalloproteinases by lung TIMP-1 gene transfer limits monocrotaline-induced pulmonary vascular remodeling in rats. *Hum Gene Ther* 2003; 14:861-869
- Vieira PL, *et al.* IL-10 secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 172:5986–5993

- Viglietta V, *et al.* Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004; 199:971-979
- Vignali DA, *et al.* How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:523-532
- Voelkel NF and Tudor RM Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of severe pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 1995; 8:2129-2138
- Voelkel NF, *et al.* Inhibition of 5-lipoxygenase-activating protein (FLAP) reduces pulmonary vascular reactivity and pulmonary hypertension in hypoxic rats. *J Clin Invest* 1996; 97:2491-2498
- Voelkel NF, *et al.* Primary pulmonary hypertension between inflammation and cancer. *Chest* 1998; 114:225S-230S
- Voelkel NF, *et al.* Janus face of vascular endothelial growth factor: the obligatory survival factor for lung vascular endothelium controls precapillary artery remodeling in severe pulmonary hypertension. *Am J Crit Care Med* 2002; 30:S251-256
- Voelkel NF, *et al.* Vascular endothelial growth factor in the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290:L209-221
- Wang J, *et al.* cDNA cloning and sequencing, gene expression, and immunolocalization of thrombomodulin in the Sprague-Dawley rat. *DNA Res* 1999; 6:57-62
- Wedgwood S, *et al.* Fibroblast growth factor-2 expression is altered in lambs with increased pulmonary blood flow and pulmonary hypertension. *Pediatr Res* 2007; 61:32-6
- Wei L, *et al.* Serotonylated fibronectin is elevated in pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 302:L1273-1279
- Welsh CH, *et al.* Coagulation and fibrinolytic profiles in patients with severe pulmonary hypertension. *Chest* 1996; 110:710-717
- West J, *et al.* Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle. *Circ Res* 2004; 94:1109-1114
- White RJ, *et al.* Plexiform-like lesions and increased tissue factor expression in a rat model of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293:L583-590
- Wildin RS, *et al.* X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001; 27:18-20
- Wildin RS, *et al.* Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome. *J Med Genet* 2002; 39:537-545
- Wing K and Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* 2010; 11:7-13
- Witzenth M, *et al.* Allergic lung inflammation induces pulmonary vascular hyperresponsiveness. *Eur Respir J* 2006; 28:370-377
- Wright L, *et al.* 5-Lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein (FLAP) immunoreactivity in lungs from patients with primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:219-229
- Xu W, *et al.* Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104:1342-1347

- Yamboliev IA and Gerthoffer WT. Modulatory role of ERK MAPK-caldesmon pathway in PDGF-stimulated migration of cultured pulmonary artery SMCs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2001; 280:C1680-1688
- Yang X, *et al.* Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2005; 96:1053-1063.
- Yeager ME, *et al.* Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary hypertension. *Circ Res* 2001; 88:E2-E11
- Yu PB, *et al.* Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2005; 280:24443-24450
- Zarkesh-Esfahani H, *et al.* High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *J Immunol* 2001; 167:4593-4599
- Zhang Y, *et al.* Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 1994; 372:425-432
- Zhao L, *et al.* Beneficial effects of phosphodiesterase 5 inhibition in pulmonary hypertension are influenced by natriuretic Peptide activity. *Circulation* 2003; 107:234-237
- Zhao YD, *et al.* Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 2005; 96:442-450
- Zlotnik A and Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000; 12:121-127

C.V. ABREGE ET LISTE DE PUBLICATIONS

Postes et diplômes :

Depuis 2010 : allocataire de recherche, INSERM UMR_S 999 “Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique”, Université Paris-Sud 11 (France).
Doctorat en Sciences sous la direction du Pr Marc Humbert

2006-2009 : chercheur post-doctorant, “Lung Biology Lab”, Columbia University, New York (USA).
Directeur : Pr Jahar Bhattacharya

2007 : Thèse et diplôme de Spécialisation en Médecine Interne, Université “La Sapienza”, Rome (Italie) sous la direction du Pr Paolo Palange

2002-2007 : Internat, Université “La Sapienza”, Rome (Italie)

2002 : Thèse de Médecine, Université “La Sapienza”, Rome (Italie)

Publications :

1. R. Antonucci, E. Berton, **A. Huertas**, P. Laveneziana, P. Palange. Exercise physiology in COPD. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2003 Apr-Jun;59(2):134-9
2. P. Palange, U. Testa, **A. Huertas**, L. Calabrò, R. Antonucci, E. Petrucci, E. Pelosi, L. Pasquini, A. Satta, G. Morici, MA. Vignola, MR. Bonsignore. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J*. 2006 Mar;27(3):529-41
3. MR. Bonsignore, P. Palange, U. Testa, **A. Huertas**, R. Antonucci, P. Serra, G. Bonsignore. Circulating CD34+ cells are decreased in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc*. 2006 Aug;3(6):537-8
4. MT. Yiming, DJ. Lederer, L. Sun, **A. Huertas**, AC. Issekutz, S. Bhattacharya. Platelets enhance endothelial adhesiveness in high tidal volume ventilation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2008 Nov;39(5):569-75
5. **A. Huertas**, U. Testa, R. Riccioni, E. Petrucci, V. Riti, D. Savi, P. Serra, MR Bonsignore, P. Palange. Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010 Jan 31; 170(1):23-31
6. MR. Bonsignore, G. Morici, R. Riccioni, **A. Huertas**, E. Petrucci, M. Veca, G. Mariani, A. Bonanno, L. Chimenti, M. Gioia, P. Palange, U. Testa. Hemopoietic and angiogenic progenitors in healthy athletes: different responses to endurance and maximal exercise. *J Appl Physiol* 2010 Jul;109(1):60-7
7. MC. Chaumais, M. Jobard, **A. Huertas**, C. Vignand-Courtin, M. Humbert, O. Sitbon, A. Rieutord, D. Montani. Pharmacokinetic evaluation of continuous intravenous epoprostenol. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2010 Dec;6(12):1587-98
8. **A. Huertas** and P. Palange. Circulating endothelial progenitor cells and chronic pulmonary diseases. *Eur Respir J* 2011, Feb;37(2):426-31
9. **A. Huertas** and P. Palange. The systemic manifestations of COPD. *Ther Adv Respir Dis* 2011 Jun;5(3):217-24 (**invited review**)

10. **A. Huertas**, B. Girerd, P. Dorfmüller, M. Humbert, D. Montani. Pulmonary veno-occlusive disease: a state of the art. *Expert Rev Respir Med* 2011 Apr;5(2):217-29 (*invited review*)
11. D. Montani, F. Perros, N. Gambaryan, B. Girerd, P. Dorfmüller, L.C. Price, **A. Huertas**, H. Hammad, B. Lambrecht, G. Simonneau, J-M. Launay, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert. C-KIT positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2011 Jul 1;184(1):116-23
12. DJ. Rowlands, S. Das, **A. Huertas**, MN. Islam, SK. Quadri, K. Horiuchi, N. Inamdar, MT. Emin, J. Lindert, S. Bhattacharya, J. Bhattacharya. Mitochondrial Ca²⁺ oscillations determine severity of inflammation by activating TNFR1 ectodomain shedding in mouse lung microvessels. *J Clin Invest* 2011 May;121(5):1986-99
13. F. Perros, D. Montani, P. Dorfmüller, **A. Huertas**, MC. Chaumais, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert. Novel immunopathological approaches to pulmonary arterial hypertension. *Presse Med* 2011 Apr;40 Suppl 1:1S3-13
14. MC. Chaumais, F. Lecerf, S. Fattal, L. Savale, S. Günther, **A. Huertas**, D. Montani, F. Perros, M. Humbert, M. German-Fattal. A study of magnesium deficiency in human and experimental pulmonary hypertension. *Magnes Res* 2012 Mar 1;25(1):21-7
15. **A. Huertas**, L. Tu, N. Gambaryan, B. Girerd, F. Perros, D. Montani, D. Fabre, E. Fadel, S. Eddahibi, S. Cohen-Kaminsky, C. Guignabert, M. Humbert. Leptin and regulatory T lymphocytes in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J*. 2012 Oct;40(4):895-904
16. L. Tu, FS. De Man, B. Girerd, **A. Huertas**, MC. Chaumais, F. Lecerf, C. François, F. Perros, P. Dorfmüller, E. Fadel, D. Montani, S. Eddahibi, M. Humbert, C. Guignabert. A Critical Role for p130Cas in the Progression of Pulmonary Hypertension in Humans and Rodents. *Am J Respir Crit Care Med* 2012 Oct 1;186(7):666-76
17. MT. Emin, L. Sun, **A. Huertas**, S. Das, J. Bhattacharya, S. Bhattacharya. Platelets induce endothelial tissue factor expression in a mouse model of acid-induced lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012 Jun;302(11):L1209-20
18. LC. Price, SJ. Wort, F. Perros, P. Dorfmüller, **A. Huertas**, D. Montani, S. Cohen-Kaminsky, M. Humbert. Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2012 Jan;141(1):210-21
19. N. Gambaryan, S. Cohen-Kaminsky, D. Montani, B. Girerd, **A. Huertas**, A. Seferian, M. Humbert, F. Perros. Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2012 Jan;39(1):210-2
20. F. Perros, S. Cohen-Kaminsky, N. Gambaryan, B. Girerd, N. Raymond, I. Klingelschmitt, **A. Huertas**, O. Mercier, E. Fadel, G. Simonneau, M. Humbert, P. Dorfmüller D. Montani. Cytotoxic Cells and Granulysin in Pulmonary Arterial Hypertension and Veno-Occlusive Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2013 Jan 15;187(2):189-96
21. **A. Huertas**, S. Das, M. Emin, L. Sun, J. Rifkind, J. Bhattacharya, S. Bhattacharya. Erythrocytes induce proinflammatory endothelial activation in hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2013 Jan;48(1):78-86
22. **A. Huertas**, F. Perros, L. Tu, S. Cohen-Kaminsky, D. Montani, P. Dorfmüller, C. Guignabert, M. Humbert. Immune Dysregulation and Endothelial Dysfunction in

- Pulmonary Arterial Hypertension: a complex interplay. *Circulation, under review*
23. N. Ricard, L. Tu, M. Le Hiress, **A. Huertas**, C. Phan, C. Sattler, E. Fadel, A. Seferian, D. Montani, P. Dorfmueller, M. Humbert, C. Guignabert. Endothelial-FGF-2 and IL-6 Promote Pericyte Coverage and Give Rise to Smooth Muscle-Like Cells in Pulmonary Hypertension. *Circulation, under review*
24. **A. Huertas**, L. Tu, M. Le Hiress, N. Ricard, R. Thuillet, C. Phan, E. Fadel, S. Nadaud, M. Humbert and C. Guignabert. Leptin inhibition prevents hypoxia-induced pulmonary hypertension by restoring regulatory T lymphocyte function. *To be submitted*
25. L. Tu*, M. Le Hiress*, N. Ricard, C. Phan, E. Fadel, P. Dorfmueller, G. Jalce, D. Montani, F. de Man, M. Humbert, **A. Huertas** and C. Guignabert. Endothelial proinflammatory phenotype in pulmonary arterial hypertension is mediated by a MIF/CD74-dependent mechanism. *To be submitted*

DE LA DYSFONCTION ENDOTHELIALE A LA DYSFONCTION IMMUNITAIRE DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE : NOUVELLES CIBLES D'INNOVATION THERAPEUTIQUE

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie grave caractérisée par une obstruction progressive des artères pulmonaires de petit calibre, conduisant à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires et, à terme, à une défaillance cardiaque droite et au décès du patient. La vasoconstriction, le remodelage vasculaire et la dysfonction endothéliale pulmonaire sont autant de facteurs qui contribuent au développement et à la progression de la maladie. Plusieurs arguments sont également en faveur d'une hypothèse de désordres immunologiques, voire autoimmuns, dans la physiopathologie de l'HTAP. Malgré ces données, le lien entre endothélium pulmonaire et système immunitaire dans cette maladie restent peu connus.

Ce travail de thèse a donc eu pour objectif d'étudier et mieux comprendre la nature et les conséquences d'une communication aberrante entre cellules endothéliales pulmonaires et système immunitaire dans la pathogénèse de l'HTAP, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, nous avons analysé le rôle de la dysfonction endothéliale dans la régulation de deux processus de la dysfonction immunitaire : l'autoimmunité pour la réponse adaptative d'une part, et la sécrétion de cytokines en ce qui concerne la réponse innée d'autre part.

A travers ce travail de thèse, nous avons mis en évidence l'existence d'une communication aberrante entre endothélium pulmonaire et système immunitaire dans l'HTAP et montré que l'endothélium pulmonaire jouait un rôle primordial dans le contrôle des réponses adaptatives, en régulant la fonction des lymphocytes T régulateurs *via* la leptine, et dans la participation active à la réponse innée, en acquérant un phénotype pro-inflammatoire.

Cette meilleure compréhension du rôle de la dysfonction endothéliale dans la dérégulation du système immunitaire présente dans l'HTAP pourrait aider au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques dans cette maladie.

Mots clés : HTAP ; dysfonction endothéliale ; système immunitaire ; lymphocytes T régulateurs ; leptine ; hypoxie ; modèles animaux ; innovation thérapeutique

INSERM UMR_S 999
Centre Chirurgical Marie Lannelongue
133 Avenue de la Résistance
92350 Le Plessis-Robinson