



HAL
open science

Rôle des progéniteurs dans l'hypertension artérielle pulmonaire humaine et expérimentale

Natalia Gambaryan

► **To cite this version:**

Natalia Gambaryan. Rôle des progéniteurs dans l'hypertension artérielle pulmonaire humaine et expérimentale. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA11T036 . tel-00639980

HAL Id: tel-00639980

<https://theses.hal.science/tel-00639980>

Submitted on 10 Nov 2011

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.

ANNÉE 2011

SÉRIE DOCTORAT N°

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD XI

Discipline : Physiopathologie Moléculaire et Cellulaire

École Doctorale : Innovation thérapeutique : du fondamental à l'appliqué

Présentée et soutenue publiquement

Par

Natalia GAMBARYAN

Le 04 juillet 2011

**Rôle des progéniteurs dans l'hypertension artérielle
pulmonaire humaine et expérimentale**

Directeur de thèse : Pr Marc HUMBERT

JURY

M. le Pr Gérald SIMONNEAU	Président
M. le Dr Jean-Sébastien HULOT	Rapporteur
Mme. le Dr Nelly FROSSARD	Rapporteur
Mme. le Pr Dominique ISRAEL-BIET	Examineur
Mme. le Dr Sylvia COHEN-KAMINSKY	Examineur
M. le Pr Marc HUMBERT	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Aux membres du Jury.

Au Professeur Gérald Simonneau pour m'avoir fait l'honneur d'être président de mon jury de thèse.

Au Professeur Marc Humbert. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire pendant ces 4 années et toujours soutenu tout au long de ma thèse. J'ai passé de très bons moments au sein de votre laboratoire tant au niveau professionnel que relationnel.

Au Docteur Nelly Frossard, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et pour le temps que vous m'avez consacré à la correction de mon manuscrit.

Au Docteur Jean-Sébastien Hulot, merci également d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant que rapporteur. Merci pour votre réactivité, où que vous soyez sur le globe, ce qui est très appréciable.

Au Docteur Karl Balabanian et au Professeur Dominique Israël-Biet, merci d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse en tant qu'examineurs et de m'avoir consacré de votre temps pour évaluer ce travail. Je vous en suis très reconnaissante.

Au Docteur Sylvia Cohen-Kaminsky. Merci pour votre gentillesse ainsi que pour vos conseils et votre encadrement. Toujours à fond mais toujours là quand il le faut, que demander de plus...

Au laboratoire où j'ai effectué cette thèse.

A l'équipe de cardio, Véronique et Yann, pour vos conseils autant scientifiques que techniques (maintenant je sais ce que c'est le dounce), pour être toujours prêts à rendre service, c'était un plaisir de travailler avec vous. A Alain, Catherine et Elodie de m'avoir encadré dans mes débuts. Au Professeur Jean-François Renaud de la Faverie pour m'avoir accueilli dans son laboratoire tout au début de ma thèse.

A l'équipe physiopath, Docteur Saadia Eddahibi, Christophe, Ly et Charlène, pour vos conseils très précieux et pour les futures collaborations.

Un grand merci à Michel Mazmanian (Maz), avec qui tous les bons moments et les longues discussions "remontage de moral" vont me manquer. Pour la chambre hypoxique, le Figaro Russe, les feuilles de cassis et la complicité tout au long de ma thèse.

A Fred...ah mon Federico. Depuis ma première année de thèse, je suis très fière d'avoir pu travailler avec toi. Je crois que tu es le postdoc le plus gentil que j'ai jamais rencontré. Tu m'as beaucoup appris (en fait à peu près tout) et tu es mon modèle de persévérance. Les bons moments qu'on a passés ensemble (le Mississippi restera gravé dans ma mémoire) vont me manquer. Encore merci d'avoir partagé avec moi un peu de ton immense savoir.

A toute la Dream Team qui ont fait régner la bonne ambiance: Barbara (pour ton efficacité et ton soutien discret mais présent que j'ai beaucoup apprécié), Marie-Camille (pour la bonne humeur et pour ta rigueur), Julie (pour ton fabuleux rire et ta gentillesse), David (pour ta capacité d'aller toujours plus loin), Sébastien (bon courage pour la suite !) et Alice (pour tes conseils précieux et ton côté maternelle, pour m'avoir fait goûter le vrai Limoncello, viva Italia!).

A Peter, pour ton humeur et tous les poumons que tu m'as donné :)

A nos adorables Florence et Isabelle, merci pour votre aide, j'ai également beaucoup appris à vos côtés.

A Yvonne pour s'occuper sans faillir de nos commandes et de la carboglace. Pour ta patience.

A tous les chirurgiens de CCML et les cliniciens de l'Hôpital Antoine Béchère qui m'ont fourni une grande partie du matériel qui m'a été nécessaire pour mener cette thèse.

A toute l'équipe de Myasthénie, pour leur patience et gentillesse tout au début de ma thèse.

A tous ceux que je n'ai pas cités mais qui ont fait partie de cette aventure et que j'ai pu connaître tout au long de ces années.

Pour finir et bien que cela semble évident, je remercie ma famille.

A mes parents. Merci de m'avoir toujours supporté, encouragé et de m'avoir permis de progressivement grimper les échelons universitaires. Je vous aime.

A mon grand-père PP pour m'avoir toujours poussé à faire ce qui m'intéressait et m'avoir toujours écouté et conseillé. A mes grand-mères Tata et Ania qui ne sont plus là mais à qui je dois énormément.

A ma sœur Mashka, c'est bon de savoir que tu seras toujours à mes côtés, même si tu ne le montres pas forcément.

Enfin a Vassili pour être mon amour, mon compagnon, mon confident, mon meilleur ami depuis presque 8 ans et pour être toujours à mes côtés quoi qu'il se passe... pour être toi.

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	5
AVANT PROPOS	6
INTRODUCTION	7
I HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE	7
1 Définition et classification de l'hypertension artérielle pulmonaire	7
2 Pathobiologie de l'HTAP	10
3 Physiopathologie de l'HTAP	13
3.1 HTAP et dysfonction endothéliale	13
3.2 HTAP et Endothelin-1	14
3.3 HTAP et les canaux potassiques	15
3.4 HTAP et la sérotonine	16
3.5 HTAP et BMPR-2	18
3.6 HTAP et l'inflammation	20
3.7 HTAP et les facteurs de croissance	22
4 Traitements	25
II LES CELLULES SOUCHES	28
1 Caractéristiques des cellules souches	28
2 Classification des cellules souches	29
2.1 Classification des cellules souches selon leur degré de différenciation	29
2.2 Classification des cellules souches selon leur origine	32
Cellules souches adultes	43
Applications cliniques	43
3 Mécanismes d'action des cellules souches adultes	44
3.1 Transdifférenciation	44
3.2 Fusion cellulaire	45
3.3 Stimulation de l'angiogenèse tissulaire	46
3.4 Sécrétion des cytokines et des facteurs de croissance	47
3.5 Stimulation de la prolifération des cellules souches endogènes	48
3.6 Inhibition de l'apoptose	49
3.7 Effet immunomodulateur	49
4 Le rôle des progéniteurs dans le remodelage vasculaire	50
4.1 L'origine et la caractérisation des progéniteurs circulants	51
4.2 Les progéniteurs circulants et le remodelage vasculaire systémique	53
4.3 Les progéniteurs circulants et le remodelage vasculaire pulmonaire	56
5 Les progéniteurs et la thérapie	63
5.1 Progéniteurs dans les modèles animaux	63
5.2 Progéniteurs dans des études cliniques	64
5.3 Conclusion	66

III	LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS	68
1	Caractéristiques des chimiokines et leurs récepteurs	68
2	Classification et nomenclature	68
2.1	Les chimiokines	68
2.2	Les récepteurs aux chimiokines	69
2.3	Les chimiokines et récepteurs aux chimiokines viraux	70
3	Structure protéique	71
3.1	Structure des chimiokines	71
3.2	Structure des récepteurs aux chimiokines	74
4	Fixation des chimiokines sur leurs récepteurs et conséquences	76
4.1	Spécificité d'interaction	76
4.2	Le modèle d'interaction à 2 étapes	77
5	Transduction du signal	78
6	Internalisation des récepteurs	79
7	Expression des chimiokines et de leurs récepteurs	80
8	Implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans la physiologie et la physiopathologie humaine	82
8.1	Migration cellulaire	84
8.2	Inflammation	85
8.3	Infection par le VIH	88
8.4	Prolifération cellulaire et angiogenèse	90
8.5	Hématopoïèse	91
9	Implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'HTAP	91
	HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE THESE	94
	MATERIELS ET METHODES	96
1	Modèle expérimental d'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique chez la souris	96
1.1	Principe	96
1.2	Application de l'hypoxie	97
1.3	Hématocrite	97
1.4	Etude hémodynamique	97
1.5	Protocole de conservation des poumons de souris	97
1.6	Etude de l'hypertrophie du ventricule droit	98
2	Prélèvements humains	98
2.1	Echantillons pulmonaires	98
2.2	Prélèvements sanguins	99
3	Morphométrie microscopique et analyse d'image	100
4	Etude de l'expression génique au sein des échantillons pulmonaires	100
4.1	Extraction d'ARN messager de poumon totale	100
4.2	Microdissection laser	101
4.3	Rétrotranscription	101

4.4	PCR quantitative ou « en temps réel »	102
5	Etude de l'expression protéique au sein des échantillons pulmonaires	103
5.1	Western-blot	103
5.2	Immunohistochimie/Immunofluorescence	104
5.3	Etude des protéines plasmatiques par ELISA	105
6	Etude de la migration des progéniteurs hématopoïétiques	105
6.1	Test de polymérisation de l'actine	105
7	Etude des fibrocytes circulants et de progéniteurs hématopoïétiques par cytométrie en flux	106
7.1	Principe	106
7.2	Méthodologie	107
7.3	Analyse des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique	107
7.4	Analyse des fibrocytes circulants	108
RESULTATS		110
I -	RECRUTEMENT DES CELLULES C-KIT+ AUTOURS DES VAISSEAUX REMODELES DANS L'HTAP HUMAINE	110
1	Introduction	110
2	Résultats	112
3	Conclusion	119
II -	LE ROLE DE CXCL12, CXCR4 ET CXCR7 DANS LE RECRUTEMENT DES PROGENITEURS C-KIT+ DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE EXPERIMENTALE	122
1	Introduction	122
2	Résultats	124
3	Conclusion	133
III -	IMATINIB INHIBE LE RECRUTEMENT DES PROGENITEURS C-KIT+ ET AMELIORE L'HYPERTENSION PULMONAIRE EXPERIMENTALE	136
1	Introduction	136
2	Résultats	138
3	Conclusion	142
IV -	FIBROCYTES CIRCULANTS DANS L'HTAP HUMAINE	143
1	Introduction	143
2	Résultats	145
3	Conclusion	153
DISCUSSION & PERSPECTIVES		155
I	PROGENITEURS ET REMODELAGE VASCULAIRE	155
II	LE TRIO CXCL12, CXCR4 ET CXCR7	159
ARTICLES COMPLEMENTAIRES		166
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES		208

ABREVIATIONS

HTP – hypertension pulmonaire	5-HTT - transporteur de la 5-HT
HTAP – hypertension artérielle pulmonaire	ARNm - ARN messenger
HTAPI – HTAP idiopathique	BMPR-2 - <i>bone morphogenic protein receptor 2</i>
HTAPH – HTAP héritable	BMPs - <i>bone morphogenic proteins</i>
VIH- virus de l'immunodéficience humaine	CSH - cellules souches hématopoïétiques
CML – cellules musculaires lisses	G-CSF - <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
CE – cellules endothéliales	CSM - cellules souches mésenchymateuses
MMP – métalloprotéinases de matrice	Sca-1 - <i>stem cell antigen-1</i>
VEGF - <i>vascular endothelial growth factor</i>	MHC I - complexe majeur d'histocompatibilité class I
PDGF - <i>platelet-derived growth factor</i>	CSA - cellules souches adultes
EGF - <i>epidermal growth factor</i>	LBA - lavage broncho-alvéolaire
FGF - <i>fibroblast growth factor</i>	α -SMA – <i>α-smooth muscle actin</i>
TGF- β - <i>transforming growth factor-beta</i>	PCM - progéniteurs des cellules musculaires lisses
AMPc - adénosine monophosphate cyclique	CPA – cellule présentatrice d'antigène
GMPc - guanosine monophosphate cyclique	GFP - <i>green fluorescent protein</i>
eNOS - synthétase endothéliale de monoxyde d'azote	NYHA - <i>New York heart association</i>
ET-1 - endothéline-1	GAGs - glycosaminoglycanes
Kv - canaux potassiques voltage-dépendants	HIF-1 α - <i>hypoxia inducible factor -1α</i>
5-HT - sérotonine	SCF - <i>stem cell factor</i>

AVANT PROPOS

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) correspond à un groupe de maladies d'évolution progressive caractérisées par une augmentation chronique de la pression artérielle pulmonaire moyenne à plus de 25 mmHg avec une prévalence d'environ 15 par million d'habitants en Europe. C'est une maladie qui touche les petites artères pulmonaires et qui se caractérise par une obstruction vasculaire conduisant à une augmentation progressive des résistances à l'écoulement sanguin. La vasoconstriction, le remodelage de la paroi des vaisseaux pulmonaires et la thrombose *in situ* sont autant de facteurs qui contribuent à l'augmentation des résistances vasculaires pulmonaires dans l'HTAP. Jusqu'à ces dernières années, le remodelage vasculaire qui implique toutes les couches de la paroi du vaisseau, et tous les types cellulaires qui les composent (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses, fibroblastes) était considéré comme un élément clé dans la pathogénèse de l'HTAP. Cependant, les progrès récents dans la compréhension des mécanismes à l'origine de cette maladie soulignent le rôle de cellules extrapulmonaires dans le remodelage vasculaire et dans le développement de l'HTAP. Il s'agit des cellules souches circulantes et des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse. Ces cellules ont été impliquées dans d'autres pathologies vasculaires telles que la fibrose pulmonaire et l'athérosclérose. Les mécanismes inflammatoires semblent également tenir une place importante dans la physiopathologie de l'HTAP. La présence d'infiltrats leucocytaires, ainsi que la sécrétion de différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissances ont été mises en évidence et caractérisées dans les lésions vasculaires pulmonaires d'HTAP.

La mise au point de nouvelles thérapeutiques ciblées sur la dysfonction endothéliale a permis une amélioration substantielle de l'espérance de vie des malades. Malheureusement, aucun de ces médicaments ne permet à l'heure actuelle de guérir cette maladie. Il est donc nécessaire d'identifier d'autres mécanismes physiopathologiques permettant de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mes travaux de thèse ont porté sur l'étude du rôle des cellules progénitrices dans le développement de l'HTAP et sur les signaux chimiotactiques permettant leur recrutement au niveau vasculaire pulmonaire.

INTRODUCTION

I HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE

1 Définition et classification de l'hypertension artérielle pulmonaire

Le terme « hypertension pulmonaire » (HTP) décrit l'existence d'une pression accrue dans la circulation pulmonaire. Sous le terme « d'hypertension artérielle pulmonaire » (HTAP) sont regroupées différentes maladies touchant les artères pulmonaires de petit calibre entraînant une augmentation progressive des résistances artérielles pulmonaires et une défaillance ventriculaire droite. L'échographie cardiaque permet le dépistage de l'HTAP, mais le diagnostic formel nécessite un cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) supérieure à 25mmHg au repos et une pression artérielle pulmonaire d'occlusion inférieure ou égale à 15mmHg, éliminant le diagnostic de cardiopathie gauche (Rubin 1997).

La classification des HTP a pour objectif d'individualiser des situations présentant des similitudes physiopathologiques, cliniques et de prise en charge thérapeutique. Une nouvelle classification des HTP a été proposée en 2008 à l'occasion du quatrième congrès mondial de l'hypertension pulmonaire à Dana Point (Tableau 1). Dans cette thèse nous nous intéressons au premier groupe de cette classification – les HTAP. Les maladies regroupées sous le terme d'HTAP sont séparées en cinq principaux sous-groupes: les HTAP idiopathiques (HTAPI, anciennement dénommées HTAP primitives) définies par la survenue de la maladie en l'absence de facteurs de risque connus associés, les HTAP héritables (HTAPH, anciennement dénommées HTAP familiales), définies par plusieurs cas d'HTAP au sein d'une même famille et/ou présence chez un patient d'une mutation d'un des gènes connus pour prédisposer au développement de l'HTAP, les HTAP associées à la consommation de toxines ou la prise d'anorexigènes, les HTAP associées à diverses pathologies (connectivites, infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), cardiopathies congénitales avec shunt gauche-droit, hypertension portale, schistosomiase, l'anémie

hémolytique chronique) et l'HTAP persistante des nouveau-nés (Simonneau et al. 2009).

Dans la nouvelle classification, les HTAP idiopathiques et les HTAP associées à ces diverses pathologies sont rapprochées, car toutes ces situations sont caractérisées par une dysfonction endothéliale pulmonaire et des modifications histologiques semblables, justifiant d'une même conduite dans la prise en charge clinique. 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. Bien que ces deux maladies présentent un risque d'œdème pulmonaire en cas de traitement vasodilatateur, principal traitement de l'HTAPI en particulier par la prostacycline intraveineuse, les très nombreuses similitudes cliniques et physiopathologiques avec les HTAPI ont justifié de les inclure dans le groupe des HTAP (Simonneau et al. 2009).

Par définition, les HTP expliquées par une cause bien identifiée et pouvant bénéficier d'un traitement spécifique comme l'HTP des cardiopathies gauches, des maladies respiratoires chroniques hypoxémiantes, ou post-embolique chronique n'appartiennent pas au groupe des HTAP proprement dites.

Des affections constituant des causes rares d'HTP d'origine indéfinie ou multifactorielle sont maintenant individualisées : maladies hématologiques, sarcoïdose, histiocytose X, neurofibromatose, lymphangioléiomyomatose notamment. Enfin, les HTP dues à une compression extrinsèque des vaisseaux pulmonaires par des adénopathies, des tumeurs, ou une fibrose médiastinale sont également classées à part.

Tableau 1 - Classification révisée lors du quatrième congrès mondial de l'HTP (Dana Point, 2008).

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. Idiopathique 1.2. Héritable <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. BMPR2 1.2.2. ALK1 (ACVRL1), endogline (avec ou sans maladie de Rendu-Osler) 1.2.3. gène inconnu 1.3. Induite par des médicaments ou des toxiques 1.4. Associée à : <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Connectivites 1.4.2. Infection par le VIH 1.4.3. Hypertension portale 1.4.4. Cardiopathies congénitales 1.4.5. Schistosomiasis 1.4.6. Anémies hémolytiques chroniques 1.5. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire
2. Hypertension pulmonaire des cardiopathies gauches
<ul style="list-style-type: none"> 2.1. Dysfonction systolique 2.2. Dysfonction diastolique 2.3. Valvulopathies
3. Hypertension pulmonaire des maladies respiratoires et/ou hypoxémies chroniques
<ul style="list-style-type: none"> 3.1. BPCO 3.2. Pneumopathies interstitielles 3.3. Autres maladies respiratoires restrictives et/ou obstructives 3.4. Syndromes d'apnées du sommeil 3.5. Syndromes d'hypoventilation alvéolaire 3.6. Exposition chronique à l'altitude élevée 3.7. Anomalies du développement
4. Hypertension pulmonaire post-embolique chronique
5. Hypertension pulmonaire de mécanisme multifactoriel ou incertain
<ul style="list-style-type: none"> 5.1. Maladies hématologiques : syndromes myéloprolifératifs, splénectomie. 5.2. Maladies systémiques : sarcoïdose, histiocytose X, lymphangioleiomyomatose, neurofibromatose, vascularites. 5.3. Maladies métaboliques : glyco-génoses, maladie de Gaucher, dysthyroïdies. 5.4. Autres : obstructions vasculaires pulmonaires tumorales, médiastinites fibreuses, insuffisance rénale chronique en dialyse.

2 Pathobiologie de l'HTAP

L'HTAP est caractérisée par plusieurs anomalies structurelles. Parmi celles-ci on distingue tout d'abord la **raréfaction** des artérioles pulmonaires distales. Cette réduction du nombre des vaisseaux du lit vasculaire pulmonaire est accompagnée par une augmentation de la résistance vasculaire, décrite dans des modèles expérimentaux d'HTAP (Hislop et al. 1976; Rabinovitch et al. 1979; Partovian et al. 2000). Malgré ces données, le phénomène de raréfaction vasculaire reste un point de discordance. Une autre caractéristique commune de toutes les HTAP est la **néo-muscularisation** des petites artérioles précapillaires distales, normalement non-musculaires, jusque dans l'acinus respiratoire. Les mécanismes cellulaires responsables de la muscularisation de cette partie des vaisseaux pulmonaires ne sont pas complètement élucidés, mais l'une des hypothèses possibles est la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) des artères pulmonaires pré-existantes ou encore de la différenciation à partir des cellules précurseurs – pericytes (Meyrick et al. 1980). Les vaisseaux de plus gros calibre, entre 100 et 500 μm , sont également touchés par l'**hypertrophie médiale et adventitielle**. De plus, l'épaississement de la paroi des artères pulmonaires proximales a été attribué à la prolifération et la migration anormale des cellules musculaires lisses existantes, ou leur différenciation à partir d'une population de cellules souches ou de fibrocytes (Davie et al. 2004) ou encore des cellules endothéliales (CE) qui sont capables d'acquérir le phénotype de CML (Frid et al. 2002). Une caractéristique majeure des HTAP est la formation de la **néo-intima**, une couche supplémentaire constituée de myofibroblastes, de matrice extracellulaire et d'infiltrats inflammatoires entre l'endothélium et la limitante élastique interne. Dans certains modèles, en particulier dans les modèles hypoxiques, les fibroblastes adventitiels semblent être les premières cellules activées à proliférer et à synthétiser des protéines de matrice 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) MMP2 et MMP9, et que ces enzymes sont impliquées dans la migration des fibroblastes adventitiels et la formation de la néo-intima. La néo-intima favorise l'occlusion et la recanalisation des

vaisseaux et contribue à la formation des **lésions plexiformes**, dernier stade du remodelage vasculaire, spécifique des HTAP sévères. 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 et al. 1985). Toutes les étapes de l'installation et la progression de la maladie sont illustrées dans la figure 1.

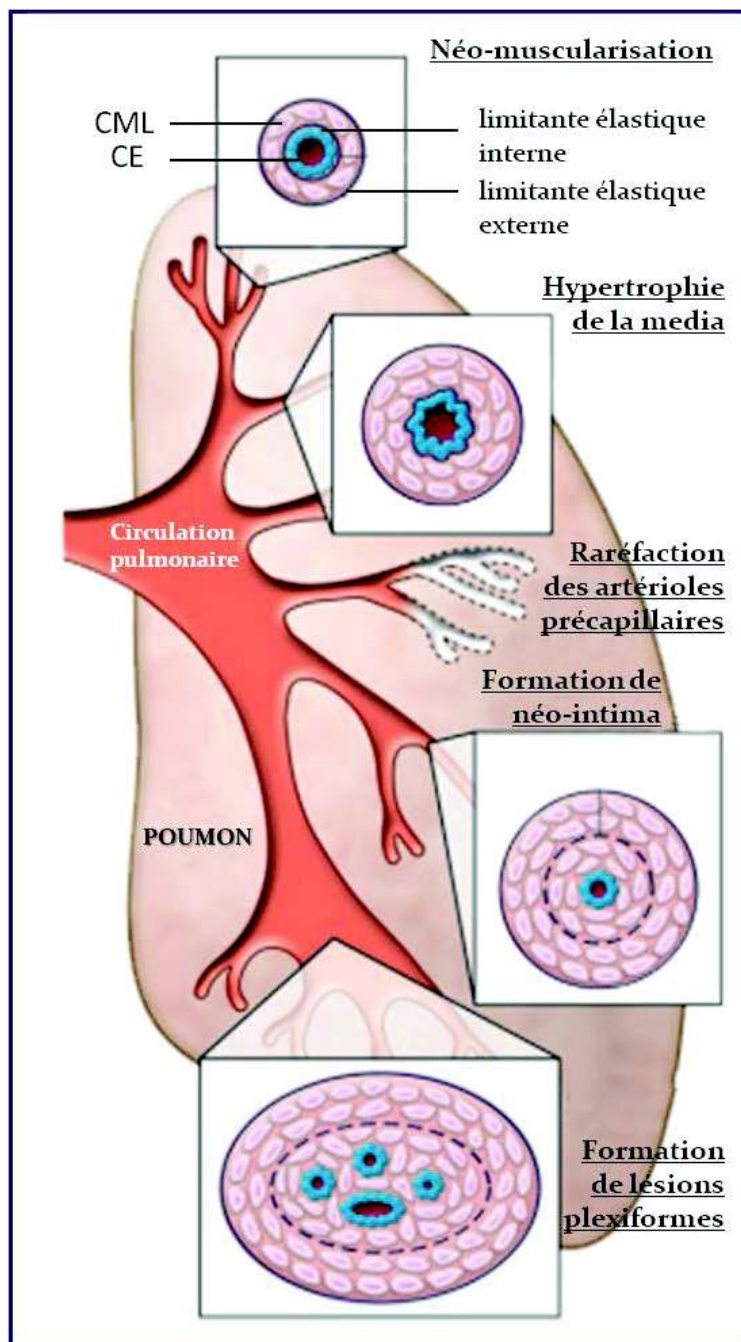


Figure 1 - Pathobiologie de l'HTAP. Ce schéma illustre les anomalies structurelles vasculaires pulmonaires rencontrées dans l'HTAP. On observe une néo-muscularisation des petites artérioles précapillaires distales, une hypertrophie de la média et de l'adventice, une raréfaction du lit vasculaire pulmonaire, et la formation de néo-intima et de lésions plexiformes.

(D'après Rabinovitch 2008)

Le concept classique du rôle important de la vasoconstriction dans l'HTAP est basé sur les observations réalisées dans des modèles d'HTAP induite par l'hypoxie et la monocrotaline. Cependant, ces modèles ne semblent pas être représentatifs de l'HTAP humaine en ce qui concerne la complexité des lésions et l'irréversibilité de la maladie sous traitement (Stenmark et al. 2009). Néanmoins, des études cliniques montrent qu'au moment du diagnostic, 13% des patients atteints d'HTAPI sont « répondeurs » aux antagonistes des récepteurs adrénergiques bêta ou bêtabloquants, qui sont de puissants vasodilatateurs (Sitbon et al. 2005). Cela laisse supposer que l'HTAP est au premier abord une maladie angioproliférative accompagnée par des lésions vasculaires complexes. Les processus impliqués dans la formation de ces lésions sont similaires à ceux que l'on observe dans la tumorigenèse: la prolifération incontrôlée, l'angiogenèse et la résistance à l'apoptose. Ces changements sont favorisés par l'ensemble des facteurs qui participent à la dérégulation des CE et provoquent leur prolifération aberrante. En accord avec cette hypothèse Taraseviciene-Stewart *et al* ont montré qu'un inhibiteur du récepteur au *vascular endothelial growth factor* (VEGF) appliqué à des rats soumis à des conditions d'hypoxie chronique, induit une dysfonction endothéliale conduisant à la formation de lésions vasculaires pulmonaires complexes similaires aux lésions plexiformes rencontrées chez l'homme. Ces lésions sont résistantes aux traitements et non-réversibles en normoxie (Taraseviciene-Stewart et al. 2001). Les effets d'un inhibiteur du récepteur du VEGF (SU5416), associé à un *shear stress* (contraintes de cisaillement) ont été examinés *in vitro* sur des CE microvasculaires pulmonaires, cultivées dans un système capillaire artificiel. Le SU5416 induit initialement l'apoptose des CE. Le *shear stress* augmente par la suite la prolifération des CE sélectionnées et induit leur résistance à l'apoptose (Sakao et al. 2005). Il n'est pas surprenant de constater que les CE d'artère pulmonaire dérivées des patients souffrant d'HTAP présentent une hyperprolifération et une résistance à l'apoptose médié par la surexpression de facteur de transcription STAT3 (Sakao et al. 2009). L'HTAP pourrait donc être associée à une altération de l'équilibre entre la prolifération et l'apoptose, avec comme conséquence une obstruction et un épaississement des artères pulmonaires.

3 Physiopathologie de l'HTAP

Le domaine de l'HTAP a connu ces dernières années des progrès majeurs dans la compréhension des mécanismes de la maladie ainsi que dans le domaine thérapeutique, avec la mise au point de nouveaux médicaments ciblant certaines dysfonctions physiopathologiques. Nous nous limiterons ici aux hypothèses principales participant à la pathogenèse de l'HTAP.

3.1 HTAP et dysfonction endothéliale

Comme nous l'avons vu précédemment, une prolifération aberrante des CE conduisant à la formation de lésions plexiformes a été décrite dans de nombreux cas d'HTAP humaine (Budhiraja et al. 2004). Le stimulus déclenchant ou l'atteinte cellulaire initiale qui provoque cette prolifération endothéliale anormale sont inconnus, mais pourraient avoir une composante hypoxique ou inflammatoire, ou être en partie la conséquence du *shear stress* ou une réponse à des drogues au sens large ou à des toxines sur un fond de susceptibilité génétique. Les CE peuvent répondre à l'agression de différentes façons, ce qui modifie le mécanisme de remodelage vasculaire. Cette agression peut altérer non seulement la prolifération cellulaire et l'apoptose, mais aussi les fonctions hémostatiques de l'endothélium (incluant le contrôle de la coagulation et la production de facteurs de croissance et de substances vasoactives). Les lésions plexiformes sont constituées de CE soutenues par un stroma contenant des protéines de matrice et des myofibroblastes. Ces CE expriment des marqueurs de l'angiogenèse, tels que le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et ses récepteurs (Tuder et al. 1999). De plus, les cellules qui composent les lésions plexiformes des HTAPI auraient une origine monoclonale (Lee et al. 1998). Des défauts de gènes suppresseurs de tumeur ont été découverts dans les lésions plexiformes de patients atteints d'HTAPI: défauts dans les récepteurs de type 2 du *transforming growth factor-beta* (TGF- β R2) et dans le gène pro-apoptotique *BAX* (Yeager et al. 2001). En outre, on observe chez les patients atteints d'HTAP une diminution de la production de prostaglandine I₂ (PGI₂), un vasodilatateur pulmonaire endogène qui agit par le biais de l'activation de voies dépendantes de l'AMPc (adénosine

monophosphate cyclique) (Tuder et al. 1999). La PGI₂ diminue l'agrégation plaquettaire et inhibe la prolifération des CML (Falcetti et al. 2010). Sa synthèse est diminuée dans les CE pulmonaires de patients atteints d'HTAP, comme le montre la réduction dans ces cellules de l'expression de la prostacycline synthétase (Christman et al. 1992). Les traitements fondés sur l'utilisation de la prostacycline ou de ses dérivés ont montré leur efficacité clinique et hémodynamique au cours de l'HTAP. La diminution de la vasodilatation induite par l'endothélium au cours de l'HTAP a été mise en évidence par la réduction de l'expression de la NO synthétase endothéliale (eNOS) dans les CE pulmonaires des malades (Giaid et al. 1995). Par ailleurs, d'autres molécules comme la thrombomoduline (TM) et le *Plasminogen Activator Inhibitor type 1* (PAI-1), qui inhibent la formation de fibrine et fibrinolyse, sont sous-exprimées par les CE des patients atteints d'HTAP (Welsh et al. 1996). Il existe également une réduction des facteurs anti-thrombotiques et des taux élevés de PAI-1 et de thromboxane A₂ dans le plasma des patients hypertendus pulmonaires (Christman et al. 1992). Ces événements, ainsi que la surexpression cytokine-dépendante de P-sélectines par les CE favorisent la formation de thrombose *in situ* chez les patients souffrant d'HTAP (Chaouat et al. 1996).

3.2 HTAP et Endothelin-1

L'endothéline-1 (ET-1) est impliquée dans la physiopathologie de diverses anomalies vasculaires dont l'HTAP. Il existe des arguments solides pour affirmer que l'ET-1 issue de l'endothélium est un acteur essentiel du déséquilibre entre vasodilatation et vasoconstriction caractéristique de l'HTAP. Les niveaux pulmonaires et circulants d'ET-1 sont augmentés en pathologie humaine et dans l'HTAP expérimentale chez l'animal (Giaid et al. 1993). Ces observations indiquent que l'ET-1 contribue probablement à la composante vasoactive de l'HTAP, mais également au remodelage vasculaire pulmonaire anormal caractéristique de cette maladie. L'HTAP se caractérise donc par une augmentation de l'ET-1, mais aussi par une augmentation du rapport ET-1/ET-3 et une diminution des concentrations plasmatiques d'ET-3. Toutes ces modifications sont corrélées avec les marqueurs hémodynamiques et

cliniques de sévérité de la maladie (Rubens et al. 2001). Ainsi, le rapport ET-1/ET-3 pourrait représenter un nouveau facteur pronostique de l'HTAP (Montani et al. 2007). L'ET-1 agit de façon paracrine sur 2 types de récepteurs à l'endothéline, ETA et ETB. ETA et 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, de la PGI₂ (Sato et al. 1995; Nicaud et al. 1999).

3.3 HTAP et les canaux potassiques

La vasoconstriction pulmonaire observée dans l'hypoxie se développe *via* l'inhibition d'un ou plusieurs canaux potassiques voltage-dépendants. Ces canaux potassiques (Kv) situés sur la membrane des CML des artères pulmonaires ont un rôle sur le potentiel de membrane. La dépolarisation membranaire provoque l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendants et augmente la concentration cytosolique en calcium avec pour conséquence, l'initiation de la contraction. Leur inhibition est à l'origine d'une dépolarisation membranaire elle-même à l'origine d'une augmentation de la concentration du calcium intracellulaire. Ces modifications entraînent une vasoconstriction associée à une prolifération des CML des artères pulmonaires (Ghofrani et al. 2009). Le canal Kv_{1.5} est sous-exprimé dans les CML des artères pulmonaires des patients qui souffrent d'HTAP (Yuan et al. 1998) ; Kv_{1.5} et Kv_{2.1} sont également sous-exprimés chez les rats qui ont une HTAP provoquée par une hypoxie chronique (Weir et al. 1996). La perte sélective de ces canaux Kv entraîne une dépolarisation des CML des artères pulmonaires, augmente la concentration de calcium intracellulaire et conduit à la fois à une vasoconstriction et à une prolifération cellulaire. On ignore encore si ces anomalies des canaux Kv sont acquises ou innées. Cependant, il est prouvé que les anorexigènes dexfenfluramine et aminorex inhibent directement Kv_{1.5} et Kv_{2.1} (Weir et al. 1996). Favoriser la voie des canaux Kv devrait avoir pour conséquence une vasodilatation et une régression du remodelage pulmonaire. Des médicaments comme le dichloroacétate et le sildénafil (utilisé dans le traitement de l'HTAP) pourraient augmenter l'expression et la fonction de ces canaux

potassiques. La plupart des effets hémodynamiques du NO sont médiés par le GMPc (guanosine monophosphate cyclique). Le GMPc provoque une vasodilatation *via* l'activation de la protéine kinase G qui phosphoryle et active les canaux potassiques calcium-dépendants de grande conductance (BKCA). Cette voie constitue l'un des nombreux mécanismes permettant de réduire la concentration calcique cytosolique.

3.4 HTAP et la sérotonine

Au cours de l'HTAP, les concentrations de sérotonine (5-hydroxytryptamine, 5-HT) plasmatiques sont élevées (Herve et al. 1995). La 5-HT est produite par les cellules entérochromaffines du tractus gastro-intestinal et par les corps neuroépithéliaux pulmonaires, puis stockée dans les plaquettes. La 5-HT est un puissant vasoconstricteur, qui est impliqué dans l'HTAP. Initialement, on a été observé des concentrations plasmatiques élevées en 5-HT et une HTAP sévère chez un patient ayant une thrombopathie congénitale caractérisée par un défaut dans la capacité des plaquettes à stocker la 5-HT (maladie du pool des plaquettes vides). Par la suite, des concentrations plasmatiques élevées en 5-HT ont été mesurées chez de nombreux patients atteints d'HTAP (Herve et al. 1995). Ces élévations n'ont pas pu être normalisées après transplantation pulmonaire ou traitement par la prostacycline, ce qui indique que cette augmentation de la concentration plasmatique en 5-HT n'est pas la simple conséquence de l'élévation de la pression artérielle pulmonaire (Herve et al. 1995). Dans les années soixante, une association entre HTAP et l'anorexigène aminorex a été établie. L'aminorex induit la libération de 5-HT par les plaquettes et inhibe la monoamine oxydase, empêchant potentiellement son inactivation. Ces deux actions conjuguées augmentent les concentrations plasmatiques en 5-HT. Il a été mis en évidence que l'exposition à des dérivés de la fenfluramine augmentait les risques de développer une HTAP. Cet anorexigène interagit avec le transporteur de la 5-HT (5-HTT) et cette interaction conduit à la libération de 5-HT par les plaquettes et inhibe sa recapture, ce qui augmente la concentration de 5-HT libre circulante. Enfin, l'exposition à la 5-HT potentialise les effets de l'hypoxie sur la pression artérielle pulmonaire et le remodelage chez le rat. Le mécanisme par lequel la 5-HT affecte les

vaisseaux, est encore débattu. La variabilité de l'expression du 5-HTT ou de son activité ou des 2 conjugués sur les CML des artères pulmonaires contribuent au remodelage vasculaire pulmonaire qui se développe dans les HTAP humaines et expérimentales (Long et al. 2006). Des souris surexprimant le gène du 5-HTT développent spontanément des hypertensions pulmonaires en absence d'hypoxie (et des hypertensions pulmonaires exagérées en hypoxie) (Long et al. 2006). De la même façon, l'expression du 5-HTT dans les CML d'artères pulmonaires, à un niveau proche de celui trouvé dans les HTAPI humaines, entraîne une HTAP chez la souris (Guignabert et al. 2006). Des études ont montré qu'un inhibiteur sélectif de la recapture de la 5-HT comme la fluoxétine prévenait l'hypertension pulmonaire hypoxique chez la souris (Marcos et al. 2003).

Dans les grosses artères pulmonaires humaines, le récepteur 5-HT₁ médie la contraction induite par la 5-HT. D'autres recherches ont montré que le récepteur 5-HT_{1B} médiait cette contraction dans les petites artères pulmonaires musculaires humaines (Long et al. 2006). Il y a une augmentation de l'expression du 5-HT_{1B} dans l'HTAP. La réponse contractile à la 5-HT dans la circulation pulmonaire du rat est médiée par le récepteur 5-HT_{2A} chez les rats contrôle. Cependant, chez les rats qui développent une HTAP induite par l'hypoxie, la réponse à la 5-HT est augmentée et médiée par le récepteur 5-HT_{1B} et des études moléculaires ont révélé que la quantité d'ARN messager (ARNm) du récepteur 5-HT_{1B} est augmentée au niveau des vaisseaux pulmonaires. Le récepteur 5-HT_{1B} pourrait être impliqué dans le développement de l'HTAP induite par l'hypoxie (études menées avec un antagoniste des récepteurs 5-HT_{1B/1D} et avec des souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur 5-HT_{1B}) (Keegan et al. 2001). Après exposition à une hypoxie chronique, ces souris ne développent pas d'hypertrophie du ventricule droit, à la différence des souris de type sauvage. De la même manière, le remodelage vasculaire et l'augmentation de la réponse à la stimulation par la 5-HT sont diminués chez les souris invalidées pour 5-HT_{1B} par rapport aux souris sauvages. D'autres récepteurs de la 5-HT pourraient intervenir, tels que 5-HT_{2B}. En effet, le récepteur 5-HT_{2B} est activé par la nordexfenfluramine, le métabolite actif de la dexfenfluramine. De plus, les souris invalidées pour le gène codant pour le récepteur 5-HT_{2B} ne développent pas d'HTAP

en hypoxie chronique et la quantité de transcrits du 5-HT_{2B} est augmentée dans l'HTAPI (Launay et al. 2002). Les rôles respectifs des canaux potassiques et de la 5-HT peuvent être reliés dans l'HTAP. D'une part, les inhibiteurs des canaux potassiques déclenchent la libération de 5-HT et inhibent les courants potassiques dans les mégacaryocytes (Weir et al. 1998). D'autre part, les anorexigènes qui inhibent la recapture de 5-HT et déclenchent sa libération sont des bloqueurs des canaux potassiques. Ces constatations conduisent à l'hypothèse que la dépolarisation chronique des plaquettes et des CML des artères pulmonaires pourrait être à l'origine d'un état pro-prolifératif, avec une vasoconstriction pulmonaire et une hyper-sérotoninémie.

Par ailleurs, le lien entre le récepteur de la famille TGF- β BMPR-2 et 5-HT a été établi dans l'HTAP. Les artères pulmonaires issues des souris *BMPR-2 +/-* ont une capacité contractile augmentée sous l'effet de 5-HT, comparées à des artères systémiques ou à des artères pulmonaires de souris sauvages (Long et al. 2006). Les auteurs ont montré que l'administration prolongée de 5-HT chez les souris *BMPR-2 +/-* induisait l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire, le remodelage pulmonaire et l'hypertrophie du ventricule droit, à la différence des souris sauvages. Le mécanisme moléculaire d'interaction entre 5-HT et BMPR-2 est médié par l'inhibition de la voie de signalisation des Smad. Les Smad-1 et Smad-5 maintient le phénotype anti-prolifératif des CML. L'inhibition des Smad-1/-5 par 5-HT peut expliquer l'effet hyperprolifératif induit par l'administration de 5-HT (Yang et al. 2005).

3.5 HTAP et BMPR-2

De nombreuses études montrent le rôle de la mutation germinale du gène codant pour BMPR-2 (*Bone Morphogenic Protein Receptor 2*) chez les patients atteints d'HTAPH (Morrell 2006; Eickelberg et al. 2007; Davies et al. 2008). La mutation de *BMPR-2* a été retrouvée dans 80% des cas de HTAPH et 20% des cas de HTAPI (Machado et al. 2006; Machado et al. 2009). Les protéines BMPs (*Bone Morphogenic Proteins*) sont sécrétées sous forme d'homodimères ou d'hétérodimères et se fixent sur des récepteurs ayant une activité sérine-thréonine kinase. On distingue des récepteurs

de type I (ALK-3/BMPR-IA, ALK-6/BMPR-IB, ALK-2) et de type II (BMPR-2, ActR2). Chacun de ces récepteurs peut, individuellement, se lier à la cytokine correspondante, mais la formation d'un complexe hétéromérique entre un récepteur de type I et un récepteur de type II, induite par la fixation du ligand correspondant, est nécessaire au déclenchement du signal de transduction. Parmi les différentes classes des BMP-ligands, deux sont exprimés par les CE et les CML des artères pulmonaires et régulent les fonctions de ces cellules (Dorai et al. 2001; Valdimarsdottir et al. 2002; Zhang et al. 2003). La première classe comprend les protéines BMP2 et BMP4, ayant une affinité prédominante pour le récepteur de type I par rapport au récepteur de type II (ten Dijke et al. 1994; Knaus et al. 2001; Nohe et al. 2002). La deuxième classe du BMP-ligand comprend les protéines BMP5, BMP6, BMP7 et BMP8, ayant une forte affinité pour le récepteur de type II (Yamashita et al. 1995; Macias-Silva et al. 1998; Ebisawa et al. 1999; Greenwald et al. 2003). L'hétérodimerisation des récepteurs de type I et II induit ensuite la phosphorylation de protéines cytoplasmiques, connues sous le nom de Smads, responsables de la voie de signalisation de la superfamille du TGF- β (Massague et al. 2005). Une fois activé, le complexe Smad-récepteur (Smad1, Smad5, Smad8) s'associe à Smad 4 (co-Smad 4) et rentre dans le noyau pour y déclencher la transcription. Cette voie est contrôlée par différents facteurs comme la liaison directe du complexe Smad à l'ADN, l'interaction avec la protéine AP-1, le facteur de transcription E3, le recrutement de co-activateurs (ou de co-répresseurs) transcriptionnels. Bien que la signalisation *via* les Smads soit bien caractérisée, il y a également de plus en plus d'arguments en faveur d'une activation des MAP kinases, dont ERK, p38MAPK et JNK kinases, par le TGF- β et les BMP dans des types cellulaires spécifiques. La voie de la p38MAPK pourrait même court-circuiter la voie Smad dans certains cas, et médier certains effets de la voie BMPR-2 sur la transcription et l'apoptose. Des découvertes récentes suggèrent que l'activation anormale de voies alternatives pourrait être décisive dans la pathogenèse de l'HTAP (Rudarakanchana et al. 2002).

L'atténuation de l'expression du récepteur BMPR-2 dans l'HTAP augmente la prolifération et diminue l'apoptose des cellules endothéliales pulmonaires (Valdimarsdottir et al. 2002; Zhang et al. 2003; Teichert-Kuliszewska et al. 2006). Dans

une étude portant sur 11 patients atteints d'HTAP, Atkinson *et al* ont montré que l'expression du récepteur BMPR-2 était significativement diminuée chez les patients porteurs de la mutation de *BMPR-2*, les patients n'ayant pas de mutation exprimant BMPR-2 essentiellement dans les cellules endothéliales par rapport aux cellules musculaires lisses (Atkinson et al. 2002). Fantozzi *et al* ont constaté que la dysfonction de la voie de signalisation des protéines BMP est responsable d'un déséquilibre entre la prolifération et l'apoptose des CML avec augmentation du signal mitogénique et diminution du signal pro-apoptotique (Fantozzi et al. 2005).

Le développement au cours de ces dernières années de nouvelles techniques de biologie moléculaire a permis d'identifier de façon systématique des mutations du gène *BMPR-2* chez les patients porteurs d'HTAP. L'analyse des mutations de *BMPR-2* participe à la stratégie thérapeutique actuelle en permettant d'identifier des patients non répondeurs aux vasodilatateurs, dont certains sont porteurs de la mutation du gène *BMPR-2*. Notons néanmoins que plus de 30 % des cas d'HTAPH ne sont pas liés à des mutations géniques identifiées, ce qui nous laisse supposer qu'un autre facteur comme l'inflammation (Lagna et al. 2007; Upton et al. 2009) ou la prise des anorexigènes est nécessaire pour le développement de l'HTAP chez ces individus.

3.6 HTAP et l'inflammation

L'inflammation est importante pour l'initiation et l'entretien du remodelage vasculaire pulmonaire dans les modèles animaux d'HTAP les plus courants, et son ciblage thérapeutique bloque le développement de l'HTAP dans ces modèles. Chez l'homme, les lésions vasculaires pulmonaires d'HTAP sont également le siège d'une intense production de chimiokines associées à un recrutement parfois important de cellules inflammatoires. Il est notable que les thérapeutiques actuelles de l'HTAP possèdent toutes des propriétés immunomodulatrices et que certaines études ont montré une relation entre les taux circulants de certains médiateurs de l'inflammation et la survie des patients. L'étude de l'autoimmunité dans la physiopathologie de l'HTAP est un domaine d'investigation en plein développement. De nouvelles approches immunopathologiques de l'HTAP pourrait permettre le développement de

thérapeutiques innovantes pour le traitement de cette affection sévère encore incurable.

3.6.1 Autoimmunité

Le lien entre autoimmunité et HTAP est un champ d'investigation en plein développement depuis qu'il a été proposé pour la première fois en 2005 (Mouthon et al. 2005; Nicolls et al. 2005). Une étude a mis en évidence la présence d'autoanticorps dans le sérum des patients porteurs des maladies auto-immunes associées à l'HTAP, comme le lupus et la sclérodémie (Renaudineau et al. 2002; Satoh et al. 2006). Des dépôts d'anticorps et de complément sont retrouvés également dans les parois vasculaires (Quismorio et al. 1984; Nakagawa et al. 2003). Il s'agit d'anticorps spécifiques anti-centromères, - topoisomérase 1 et -ARN-polymérase III ainsi que d'anticorps non spécifiques dirigés contre les CE et les fibroblastes (Tamby et al. 2005; Tamby et al. 2006). Il est estimé que 30-40% des patients avec HTAPI ont des anticorps anti-nucléaires, et 10-15 % de ces patients présentent des anticorps anti-phospholipides (Karmochkine et al. 1996). Ces résultats ont été confirmés récemment par deux autres équipes (Arends et al. 2010; Li et al. 2010).

Les anticorps dirigés contre les CE pourraient participer à la pathogenèse de l'HTAP. Ils sont capables d'activer les CE *in vitro*, d'induire l'expression de molécules d'adhésions et l'apoptose. Il faut noter que le profil de réactivité des anticorps dérivés des patients HTAP est différent de ceux, retrouvés chez les patients atteints d'HTAP associée à la sclérodémie, ce qui laisse supposer qu'ils sont dirigés contre des antigènes différents. La prévalence des anticorps anti-cellules endothéliales a été récemment estimée à 82% chez les patients avec HTAP associée à une connectivite (Li et al. 2010). Les anticorps anti-fibroblastes ont été également détectés dans 40% des cas d'HTAPI comparés à 30% d'HTAP associée à la sclérodémie. En utilisant l'approche de protéomique en gels bidimensionnels les auteurs ont déterminé plusieurs antigènes pour ces anticorps. On y retrouve des protéines impliquées dans des processus importants pour le maintien de l'homéostasie comme les protéines impliquées dans la régulation du cytosquelette, la contraction, le stress oxydant, le métabolisme énergétique et d'autres voies clés de la biologie cellulaire (Tamby et al. 2006). Les

études *in vitro* ont montré le rôle pathologique de ces anticorps sur des cultures des fibroblastes. En leur présence les fibroblastes acquièrent un phénotype pro-inflammatoire et pro-adhésif, ce qui confirme l'implication des autoanticorps dans le remodelage vasculaire (Chizzolini et al. 2002).

3.6.2 Cytokines et chimiokines

De nombreuses études montrent l'implication de différentes cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et homéostatiques dans l'initiation du remodelage vasculaire pulmonaire. Leur rôle sera discuté en détail dans le chapitre III de cette thèse.

3.7 HTAP et les facteurs de croissance

Plusieurs publications récentes mettent en évidence l'implication de certains facteurs de croissance comme le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) (Sakao et al. 2007), le *Platelet-Derived Growth Factor* (PDGF) (Humbert et al. 1998; Schermuly et al. 2005), l'*Epidermal Growth Factor* (EGF) (Merklinger et al. 2005) et le *Fibroblast Growth Factor* (FGF) (Arcot et al. 1995; Benisty et al. 2004) dans la pathogenèse de l'HTAP. Ils ont un effet mitogène et chimioattractant sur les CE, les CML et les fibroblastes.

3.7.1 VEGF

Le VEGF est capable d'induire la prolifération des cellules endothéliales vasculaires par le biais de 3 récepteurs tyrosine kinase à haute affinité (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1 et VEGFR-3/Flt-4). Dans l'HTAP, l'expression du VEGF est accrue dans les lésions plexiformes. Bien que le rôle physiologique du VEGF, qui est abondamment exprimé dans le poumon, soit inconnu, il a été proposé que ce facteur de croissance soit responsable de processus comme la vasculogénèse, l'angiogénèse et la lymphangiogénèse. Bien que l'isoforme VEGF-A ait été largement étudiée dans le contexte de l'hypertension pulmonaire et qu'on lui ait prêté un rôle protecteur, une étude récente a attribué au VEGF-B un rôle pathogénique. Au contraire du VEGF-A, le VEGF-B semble en effet accentuer le remodelage puisque des souris invalidées pour

VEGF-B exposées à une hypoxie chronique ont un remodelage vasculaire significativement moindre par comparaison aux souris sauvages (Wanstall et al. 2002). Des études chez l'animal ont montré les effets positifs du VEGF-A dans des modèles d'hypertension pulmonaire (Campbell et al. 1990). En effet, une thérapie cellulaire fondée sur l'utilisation de cellules musculaires lisses syngéniques surexprimant le VEGF-A a permis de prévenir le développement et la progression de l'HTAP dans le modèle de rats exposés à la monocrotaline (Campbell et al. 1990). Le VEGF-A réduirait la progression de la maladie en prévenant la perte des vaisseaux existants ou en induisant le développement de nouveaux vaisseaux pulmonaires (Campbell et al. 1990). Dans les HTAPI, l'expression de VEGFR-2 est augmentée dans les lésions plexiformes alors que c'est VEGFR-1 qui est exprimé dans les CE adjacentes (Hirose et al. 2000). Chez le rat, il a été montré que l'association du blocage chronique du VEGFR-2 et de l'hypoxie chronique pouvait causer une dysfonction cellulaire endothéliale et une mort cellulaire permettant de sélectionner un phénotype prolifératif et résistant à l'apoptose parmi les CE. La conséquence de ce traitement est le développement d'une hypertension pulmonaire sévère (Taraseviciene-Stewart et al. 2001).

3.7.2 PDGF

Un autre facteur de croissance, le PDGF a été impliqué dans le remodelage artériel pulmonaire. Le PDGF est sécrété par de nombreux types cellulaires y compris les CE, les CML et les macrophages. Le PDGF est capable d'induire la prolifération et la migration des CML et des fibroblastes *via* sa fixation aux récepteurs α et β (PDGFR α et PDGFR β). Le PDGF joue un rôle clé dans la progression de plusieurs maladies fibroprolifératives comme l'athérosclérose, le fibrose pulmonaire et l'HTAP (Humbert et al. 1998). Son rôle a été également démontré dans les modèles expérimentaux d'HTAP avec une augmentation de l'expression du récepteur PDGFR β , et une normalisation de l'HTAP par blocage du PDGFR (Schermuly et al. 2005). De plus, il a été montré une augmentation de l'expression du PDGF (A et B) et de ses récepteurs (PDGFR α et β) dans les artères pulmonaires de patients atteints d'HTAP sévère (Perros et al. 2008). Dans deux modèles animaux d'HTAP l'administration d'un antagoniste du récepteur du PDGF, l'imatinib (STI571) permet la régression du remodelage pulmonaire (Schermuly et al. 2005). De plus, très récemment il a été montré que l'imatinib a un

effet anti-prolifératif et pro-apoptotique sur les CML des artères pulmonaires dérivées des patients atteints d'HTAP stimulées par le PDGF (Nakamura et al. 2011). Ces données montrent que l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinases dans l'HTAP a un grand potentiel. Cependant, le problème d'une éventuelle toxicité cardiaque pose en pratique. Le rationnel d'utilisation des inhibiteurs de tyrosines kinases sera discuté plus en détails dans le chapitre « résultats ».

3.7.3 EGF

L'EGF est un autre facteur de croissance qui semble être impliqué dans l'HTAP. La prolifération et la migration des CML induites par l'EGF sont dépendantes de l'un des composants de la matrice extracellulaire la ténascine-C (TN-C). De plus, l'EGF est co-localisé avec la TN-C dans des lésions vasculaires chez les patients atteints d'HTAP ce qui confirme son rôle direct dans la progression de la maladie (Jones et al. 1997). Chez le rat, le blocage de la voie du récepteur de l'EGF permet la régression de l'HTAP induite par la monocrotaline (Merklinger et al. 2005; Dahal et al. 2011). Les effets bénéfiques des antagonistes du récepteur de l'EGF sont médiés par leur effet antiprolifératif sur les CML pulmonaires (Dahal et al. 2011).

3.7.4 FGF

L'un des aspects principaux du développement et de la maturité des vaisseaux est la production de facteurs de croissance par les CE qui recrutent des cellules matures et stabilisent la paroi du vaisseau (Armulik et al. 2005). Ces facteurs de croissance dérivés de CE qui modulent la migration et la prolifération des CML durant le développement, peuvent être impliqués dans le remodelage pathologique. Le FGF2 est le seul facteur de croissance, dont l'expression accrue a été retrouvée dans les CE pulmonaires. Le FGF2 est exprimé principalement par les cellules tumorales, les fibroblastes, les CE et les macrophages (Arcot et al. 1995; Potgens et al. 1995; Smith et al. 1999). Après sa sécrétion il est séquestré et stocké dans la matrice extracellulaire. Lors du processus protéolytiques le FGF2 est libéré et active les cellules cibles, en stimulant la prolifération cellulaire (Benezra et al. 1993; Thompson et al. 1996; Buczek-Thomas et al. 2004). Après sa libération le FGF2 est capable de se fixer à son récepteur (FGFR1) exprimé sur la surface des cellules vasculaires (Inoue et al. 2002). Dans l'HTAP

humaine et expérimentale les taux de FGF2 circulant et pulmonaire sont accrus (Arcot et al. 1995; Benisty et al. 2004). Il a été montré chez les rats hypertendus pulmonaires, que l'inhibiteur de FGFR₁, SU5402, atténuait l'hypertension pulmonaire. Dans l'HTAP humaine le FGF2 est produit par les CE des artères pulmonaires et agit de façon autocrine, en stimulant leur prolifération et leur résistance à l'apoptose (Izikki et al. 2009).

4 Traitements

Le traitement de l'HTAP tente de s'opposer aux effets délétères de la vasoconstriction, de l'obstruction vasculaire pulmonaire par remodelage et thrombose, et de l'insuffisance cardiaque droite. Le traitement conventionnel repose sur des mesures simples (limitation des efforts) et des traitements non spécifiques (anticoagulant, diurétique, oxygénothérapie). Cependant, des progrès considérables ont été réalisés dans le traitement de l'HTAP. Les traitements spécifiques de l'HTAP à présent disponibles sont :

- l'époprosténol (prostacycline) administré en intraveineux continu, augmente les concentrations d'AMPc dans les cellules musculaires lisses, résultant en une relaxation et une vasodilatation,
- le bosentan administré par voie orale, est un inhibiteur compétitif des récepteurs de l'endothéline,
- le sildénafil administré par voie orale, est un inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5 qui augmente les concentrations de GMPc dans les cellules musculaires lisses, résultant en une relaxation et une vasodilatation,
- l'iloprost, un analogue de la prostacycline administré en inhalation, est un vasodilatateur et antiagrégant plaquettaire.
- Les inhibiteurs calciques ne sont actifs que dans moins de 10% des formes idiopathiques (Sitbon et al. 2005). La réponse à ce type de médicament peut

néanmoins être testée par un test de vasodilatation au cours du cathétérisme droit.

Ces médicaments améliorent l'essoufflement et la tolérance à l'effort mais leurs effets en termes de survie sont controversés. En dernier recours, il sera éventuellement proposé une transplantation bi-pulmonaire ou une transplantation du bloc cœur-poumons. Une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à cette maladie devrait permettre le développement de nouveaux traitements ciblant directement la prolifération anormale des CE et CML vasculaires pulmonaires. De telles avancées pourraient faire envisager l'émergence d'un traitement curatif de cette maladie orpheline.

Les cibles des traitements disponibles et en voie de développement dans l'HTAP sont résumés dans la figure 2.

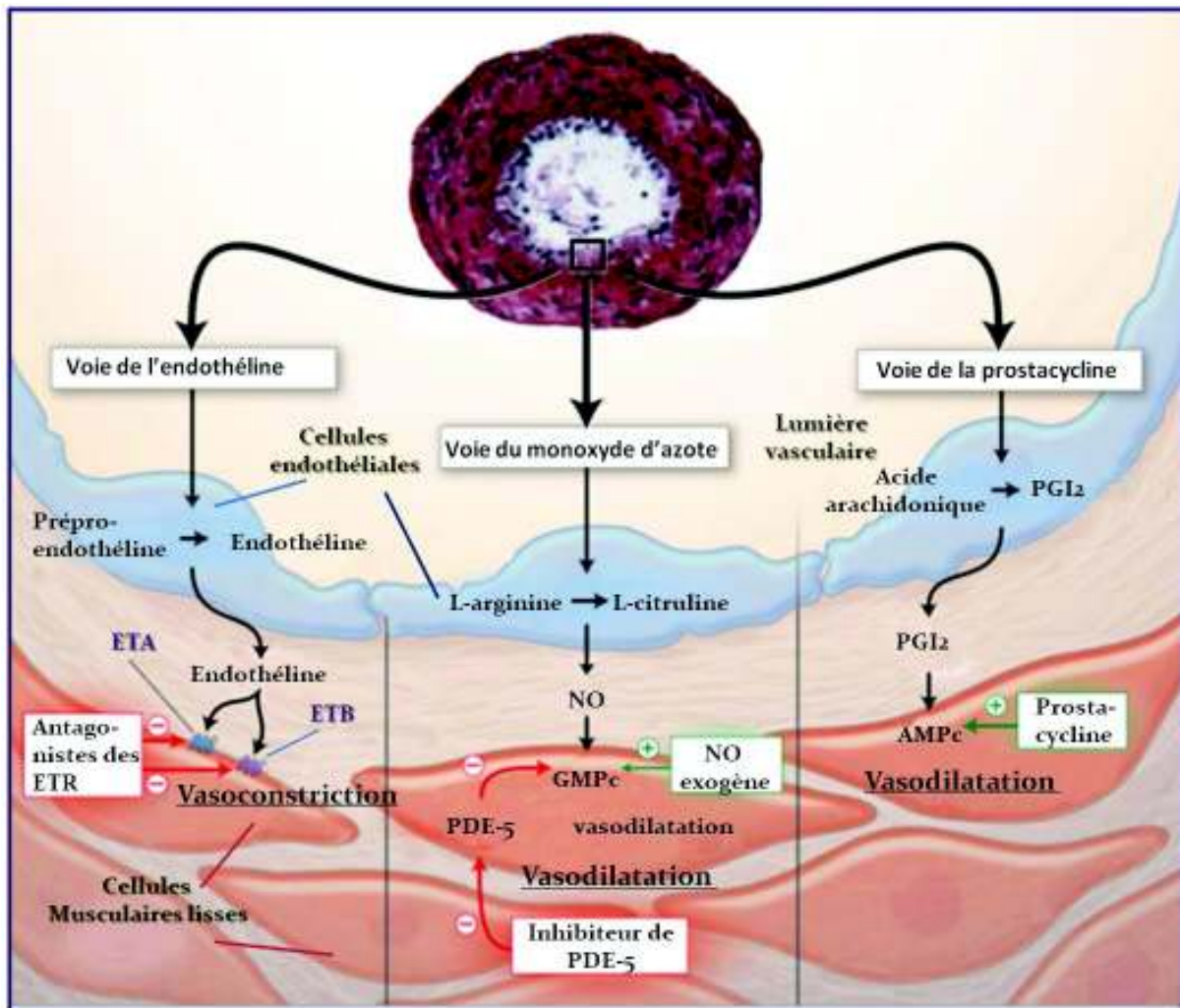


Figure 2 - Cibles des traitements actuels de l'HTAP. Coupe transversale d'une artère pulmonaire de petit calibre d'un patient souffrant d'une HTAP sévère montrant une prolifération intimale et une hypertrophie de la média. La dysfonction des cellules endothéliales des artères pulmonaires se traduit par une diminution de la production de prostacycline et de monoxyde d'azote (NO) associée à une augmentation de la production d'endothéline-1. Ces modifications conduisent à une vasoconstriction et une prolifération des cellules musculaires lisses au niveau des artères pulmonaires.

Abréviations : AMP_C: adénosine monophosphate cyclique ; GMP_C: guanosine monophosphate cyclique ; ET: endothéline ; ET_A: récepteur A de l'endothéline ; ET_B: récepteur B de l'endothéline ; PDE₅: phosphodiésterases de type 5 ; PGI₂, prostaglandine I₂ (prostacycline). (D'après Humbert 2004)

II LES CELLULES SOUCHES

De nos jours, les cellules souches constituent des sujets d'actualité aussi passionnants que controversés. Les premiers travaux sur les cellules souches datent d'il y a 50 ans lorsque les pionniers dans ce domaine de recherche, Till et McCulloch, ont publié leurs découvertes. Ils ont permis d'établir deux propriétés des cellules souches embryonnaires et post-natales : leur capacité à s'auto-renouveler et à engendrer différents types de cellules spécialisées (McCulloch et al. 1960; Becker et al. 1963). Ainsi, Till et McCulloch ont développé une méthodologie efficace pour l'étude des cellules souches et ont contribué de façon importante à une meilleure compréhension du comportement des cellules souches de la moelle osseuse. Les résultats de leurs travaux de recherche ont permis de développer d'outils et de concepts toujours en application aujourd'hui.

1 Caractéristiques des cellules souches

Les cellules souches sont des cellules immatures définies et caractérisées par deux propriétés spécifiques (Hall et al. 1989) (Figure 3) : leur capacité d'**autorenewement**, c'est-à-dire la multiplication sans différenciation permettant de maintenir intact un pool de cellules souches primitives. Cette propriété permet ainsi le maintien d'un stock stable et permanent de cellules souches rapidement mobilisables en cas d'atteinte tissulaire (Smith 2006), et leur degré de **plasticité**, c'est-à-dire la possibilité, sous l'influence de facteurs de croissance, de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers une ou plusieurs lignées cellulaires. La cellule perd alors sa totipotence pour devenir une cellule souche engagée.

Ces deux propriétés font des cellules souches des éléments indispensables à l'organisme puisqu'elles assurent le renouvellement des tissus en remplaçant les cellules mortes naturellement ou après une lésion. Elles permettent ainsi aux organes de continuer à fonctionner de façon normale pendant toute la vie de l'organisme.

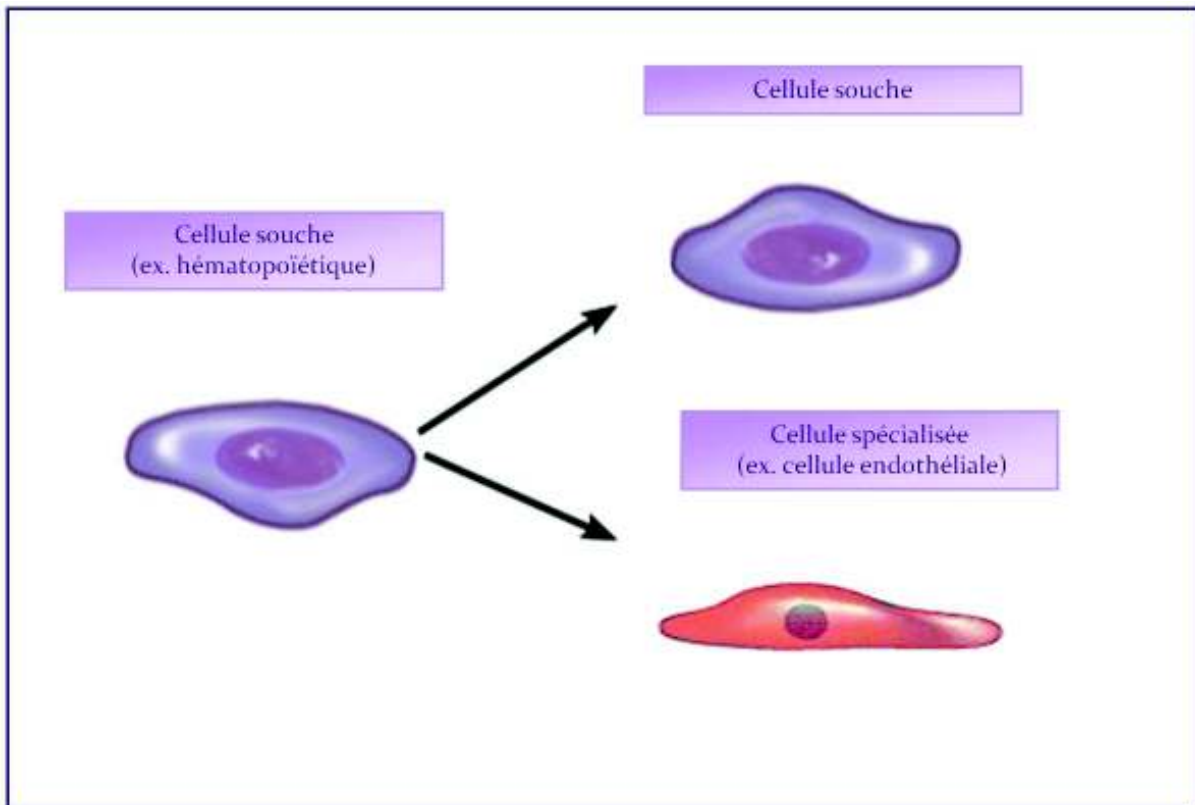


Figure 3 – Caractéristiques des cellules souches. Les cellules souche sont capables de se multiplier afin de maintenir le pool des cellules souches intact ainsi que de se différencier en cellules spécialisées (par exemple cellule endothéliale). Ci-dessus un exemple de cellule souche hématopoïétique donnant lieu à une autre cellule souche et à une cellule endothéliale.

2 Classification des cellules souches

2.1 Classification des cellules souches selon leur degré de différenciation

Suivant leur potentiel de différenciation, on peut mettre en évidence quatre types de cellules souches: les cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes, les cellules souches multipotentes et les cellules souches unipotentes (Smith 2006).

2.1.1 Les cellules souches totipotentes

Il s'agit des blastomères, cellules provenant des premières divisions de l'œuf fécondé ou zygote. Les blastomères sont dit totipotents car ils sont à l'origine de toutes les cellules de l'organisme (issues des trois feuillets embryonnaires : ectoderme, mésoderme et endoderme) ainsi que des annexes extra-embryonnaires (placenta, membranes). De ce fait, la cellule souche totipotente est la seule à pouvoir conduire au développement d'un organisme entier (Figure 4).

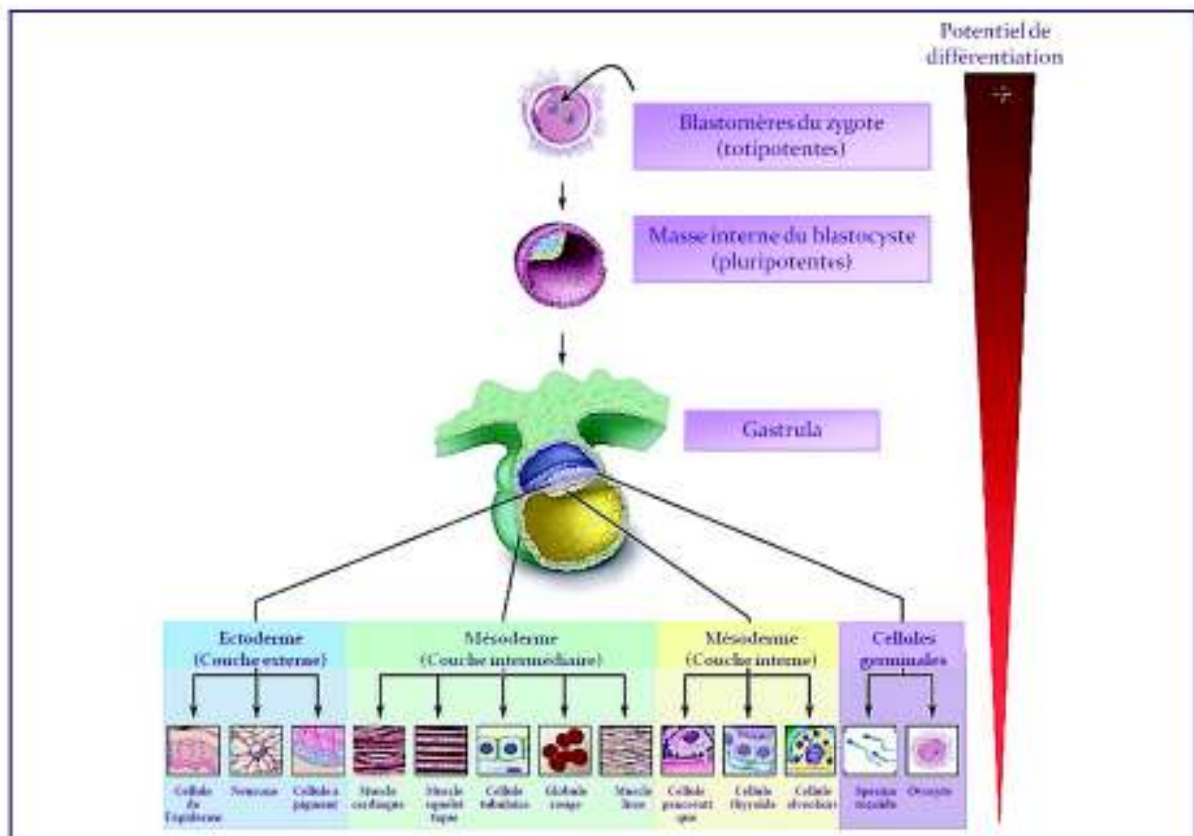


Figure 4 – Potentiel de différenciation des cellules souches totipotentes et pluripotentes. Une cellule souche totipotente est capable d'engendrer un organisme entier et tous les types cellulaires (cellules neuronales, hépatiques, hématologiques, cardiaques etc.). Les premières divisions embryonnaires produisent des cellules souches totipotentes. Après 4 jours de division cellulaire embryonnaire, les cellules deviennent pluripotentes. (D'après Winslow 2001)

2.1.2 Les cellules souches pluripotentes

Ce sont les cellules souches embryonnaires. Elles proviennent de la masse cellulaire interne du blastocyste et constituent le bouton embryonnaire alors que la couche cellulaire externe, le trophoctoderme, contribue à la formation du placenta (Figure 4). De ce fait et contrairement aux cellules souches totipotentes, les cellules souches pluripotentes peuvent générer toutes les lignées cellulaires constituant un individu hormis les annexes embryonnaires et ne peuvent donc pas conduire à la formation d'un organisme entier.

2.1.3 Les cellules souches multipotentes

Il s'agit des cellules souches fœtales, de nouveau-nés ou adultes. Ces cellules sont déjà engagées dans des voies de différenciation mais gardent la capacité de s'autorenouveler. En effet, les cellules souches multipotentes ne sont pas totalement immatures, on dit qu'elles sont « déterminées » pour donner différents types de cellules différenciées et fonctionnelles. Leur plasticité (ou pouvoir de différenciation) est donc plus limitée que celle des cellules souches embryonnaires. C'est le cas des cellules souches hématopoïétiques qui peuvent générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) mais qui ne peuvent pas se différencier naturellement en cellules nerveuses par exemple (Figure 5).

2.1.1 Les cellules souches unipotentes

Ces cellules ne peuvent produire qu'un seul type cellulaire tout en s'autorenouvelant. C'est le cas notamment des cellules souches de la peau, de la muqueuse intestinale et du foie. En effet, ces cellules ont déjà acquis un certain degré de spécialisation durant leur division et sont fonctionnelles.

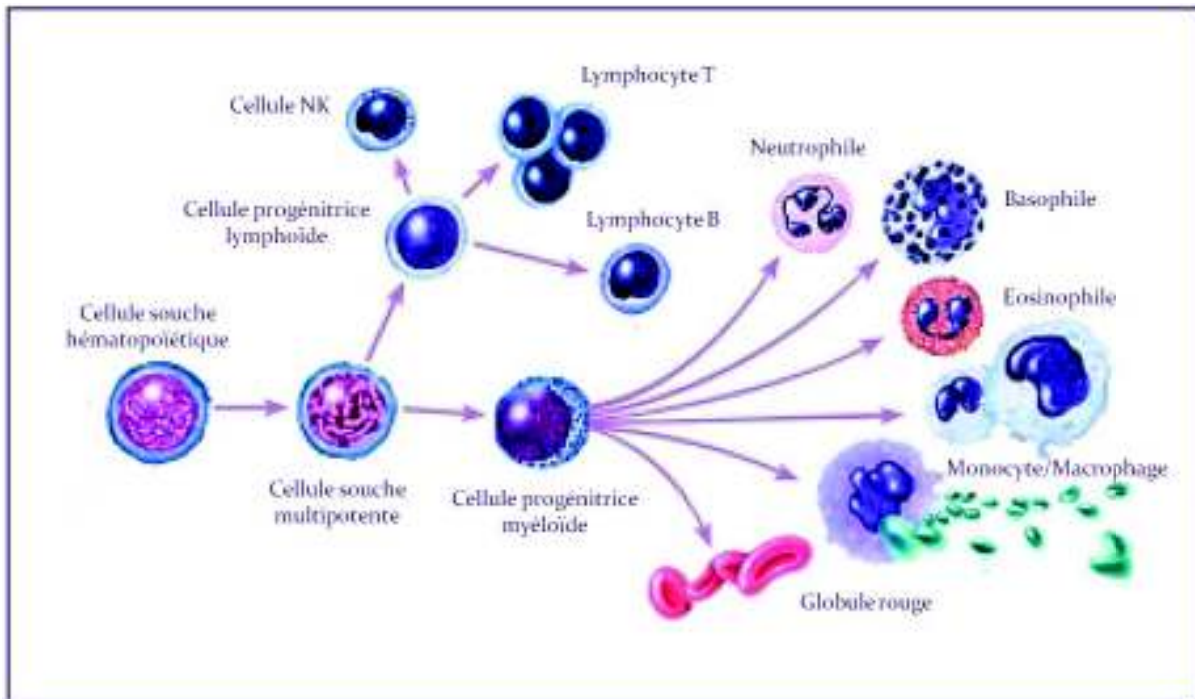


Figure 5 - Potentiel de différenciation des cellules souches multipotentes. Un exemple des cellules souches multipotentes - la cellule hématopoïétique. Elle est capable de générer toutes les cellules de la lignée sanguine (globules rouges, polynucléaires, lymphocytes T ou B, macrophages) mais ne peut pas se différencier naturellement en cellules nerveuses par exemple. (D'après Winslow 2001)

2.2 Classification des cellules souches selon leur origine

Les cellules souches peuvent provenir de l'embryon (cellules souches embryonnaires), du fœtus (cellules souches fœtales) ou de l'organisme adulte (cellules souches adultes). De ce fait, ces cellules ne possèdent pas le même pouvoir de différenciation et leur utilisation dans la réparation tissulaire repose sur la capacité à les isoler, les amplifier et les manipuler ainsi que sur leur degré de plasticité.

2.2.1 Les cellules souches embryonnaires

Comme nous l'avons mentionné précédemment les cellules souches embryonnaires, dites ES (pour *Embryonic Stem cells*) sont des cellules souches pluripotentes issues de la masse interne du blastocyste. Elles sont capables de donner l'ensemble des cellules présentes chez l'adulte tout en gardant leur capacité

d'autorenouvellement (Thomson et al. 1998; Biswas et al. 2007). Rapidement après leur isolement (Martin 1981), des études ont été développées visant à étudier la croissance et la différenciation de ces cellules. Elles ont pu être différenciées en cellules provenant des trois feuillets embryonnaires (ectoderme, mésoderme et endoderme) et notamment en cardiomyocytes, neurones, hépatocytes, cellules endothéliales, cellules pancréatiques et progéniteurs hématopoïétiques (Guan et al. 1999; Carpenter et al. 2003; D'Amour et al. 2006; Roy et al. 2006; Levenberg et al. 2007; Lu et al. 2007; Blancas et al. 2008; Nury et al. 2009). Les cellules souches embryonnaires présentent donc un intérêt pour leur utilisation en médecine régénérative et notamment dans le traitement des pathologies cardiaques, neuronales, hépatiques, sanguines et du diabète de type I. Cependant, l'utilisation expérimentale et le transfert en clinique de ces cellules posent plusieurs problèmes (Pucéat et al. 2007). Le premier, d'ordre éthique, est celui de l'utilisation d'embryons humains dans la recherche expérimentale (McLaren 2001). Le deuxième problème majeur de ces cellules est lié à leur fort pouvoir mitogène et tumorigène. L'équipe de Yamamoto, notamment, a mis en évidence la formation de tératomes après la greffe de ces cellules dans le péritoine de souris Nude (Yamamoto et al. 2006). Finalement, bien que certains travaux ne l'indiquent pas, la greffe de cellules souches embryonnaires est contraignante puisqu'elle requiert un traitement immunosuppresseur.

2.2.2 Les cellules souches fœtales

Les cellules souches fœtales sont des cellules souches multipotentes présentant un fort pouvoir de prolifération et pouvant être isolées aussi bien à partir du sang fœtal et de la moelle osseuse qu'à partir d'autres tissus fœtaux comme le foie ou les reins (O'Donoghue et al. 2004). Parmi ces cellules, on distingue des cellules souches somatiques et des cellules souches germinales dites EG (pour *Embryonic Germ cells*). Contrairement aux cellules embryonnaires, ces cellules sont déjà engagées vers un type cellulaire particulier. Cependant, même si leur utilisation en médecine régénérative semble prometteuse, elle pose, au même titre que les cellules souches embryonnaires, certains problèmes éthiques. Le tableau suivant présente les différents types de cellules souches fœtales et leurs origines tissulaires.

Tableau 2 - Les différentes sources tissulaires de cellules souches fœtales.
(D'après O'Donoghue and Fisk 2004)

Type de cellules souches fœtales	Origines tissulaires
Hématopoïétiques	Sang / Foie / Moelle osseuse
Mésenchymateuses	Sang / Foie / Moelle osseuse / Poumons / Reins/ Pancréas
Endothéliales	Moelle osseuse / Placenta
Épithéliales	Foie / Pancréas
Neurones	Cerveau / Moelle épinière

2.2.3 Les cellules souches adultes

Malgré leur importante plasticité cellulaire, l'utilisation des cellules souches embryonnaires ou fœtales est très délicate d'un point de vue éthique mais aussi du fait de leur pouvoir tumorigène et immunogène. C'est pourquoi les études pré-cliniques ou cliniques utilisant la greffe de cellules souches adultes sont de plus en plus fréquentes. Les cellules souches adultes sont des cellules souches multipotentes présentes au sein des tissus adultes majoritairement composés de cellules différenciées. En effet, même si leur capacité de différenciation est plus restreinte, les cellules souches adultes présentent de nombreux avantages : elles peuvent provenir du patient lui-même évitant ainsi les rejets d'ordre immunologique (greffe autologue), leur utilisation génère moins de problèmes éthiques et elles ont déjà donné de nombreux résultats très concluants. Le meilleur exemple des cellules souches adultes sont les cellules souches hématopoïétiques (CSH) qui sont situées dans la moelle osseuse. Les CSH peuvent être récoltées directement à partir de la moelle osseuse ou du cordon ombilical ou également à partir du sang périphérique après la mobilisation de la moelle à l'aide de *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) avec ou sans antagoniste de CXCR4 (Flomenberg et al. 2005).

Une autre population des cellules souches mésenchymateuses (CSM) a été décrite peu de temps après les CSH, qui est capable de générer les ostéoblastes, les chondroblastes, les adipocytes, les tissus conjonctifs etc. (Friedenstein et al. 1966;

Friedenstein et al. 1970; Owen 1988) et qui fait partie de la niche hématopoïétique. Elles représentent 1 pour 10^4 à 1 pour 10^5 des cellules mononuclées et sont dix fois moins abondantes que les cellules souches hématopoïétiques (Pittenger et al. 1999). Les différentes cellules souches adultes décrites dans l'organisme humain sont présentées dans le tableau 3.

Récemment, une autre population de progéniteurs qui est capable de se différencier en cellules endothéliales à été isolée à partir du sang périphérique (Asahara et al. 1997), et est originaire de la moelle osseuse (Shi et al. 1998).

Il est important de souligner que des cellules souches adultes ont également pu être isolées à partir de la cornée (Yoshida et al. 2006), de la rétine (Tropepe et al. 2000), du foie (Walkup et al. 2006), du pancréas (Choi et al. 2004), de la pulpe dentaire (Gronthos et al. 2000), du rein (Sagrinati et al. 2006), du tissu adipeux (Sengenes et al. 2005; Gimble et al. 2007), du cœur (Beltrami et al. 2003; Barile et al. 2007) et du cordon ombilical (Lee et al. 2004; Jeong et al. 2005; Prat-Vidal et al. 2007).

Dans des paragraphes suivants nous allons détailler plus précisément l'implication des cellules souches issues de la moelle osseuse dans des processus physiologiques chez l'homme ainsi que leur implication dans des différentes pathologies.

Tableau 3 - Les cellules souches adultes. (D'après Minguell 2001)

Cellules souches adultes	Localisation tissulaire	Cellules produites	Références
Hématopoïétiques	Moelle osseuse	Cellules sanguines, endothéliales, hépatiques et musculaires	(Fukushima et al. 1995; Lansdorp 1995; Gussoni et al. 1999; Petersen et al. 1999)
Neurones	Cerveau	Neurones, astrocytes, oligodendrocytes et cellules sanguines	(McKay 1997; Murphy et al. 1997; Bjornson et al. 1999; Armstrong et al. 2000)
Épithéliales	Intestin et Épiderme	Cellules des cryptes de l'épithélium, cellules des couches épidermiques	(Van Dorp et al. 1999; Bach et al. 2000; Lowell et al. 2000; Wright 2000)
Mésenchymateuses	Moelle osseuse	Os, cartilage, tendon, tissu adipeux, muscle, cellules stromales, cellules neuronales	(Caplan 1994; Kuznetsov et al. 1997; Kopen et al. 1999)

2.2.3.1 Cellules souches issues de la moelle osseuse

La moelle osseuse contient au moins deux types de cellules souches caractérisées: les cellules souches hématopoïétiques et les cellules souches mésenchymateuses. La moelle osseuse contient également la descendance de ces cellules souches, qui constitue le compartiment des progéniteurs et précurseurs, dont nous avons détaillé le rôle plus loin.

Les tests fonctionnels des CSH impliquent une interaction des cellules souches avec leur environnement. Cet environnement crée une niche hématopoïétique qui procure aux cellules souches les facteurs de communication intercellulaire permettant de l'attirer vers cet environnement (chimiokines), une adhésion à cet environnement

(molécules d'adhésion) et de survivre, proliférer et se différencier (facteurs de croissance hématopoïétiques) (Sutherland et al. 1990).

La notion de niche hématopoïétique a progressé rapidement grâce aux souris invalidées pour un gène (dit *knock-out* ou ko) et transgéniques. Les CSH vont se loger au contact des cellules des travées osseuses, principalement des ostéoblastes (Moore 2004). Les ostéoblastes, d'origine mésenchymateuse, assurent une reconstruction osseuse permanente (10% de la masse osseuse par an) après érosion de l'os par les ostéoclastes d'origine monocytaire. Les ostéoblastes ont donc un autre rôle essentiel, celui de niche hématopoïétique.

Les CSH sont capables, comme nous l'avons mentionné précédemment, d'une part d'autorenouvellement *in vivo*, d'autre part de se différencier en précurseurs hématopoïétiques de plus en plus engagés dans une voie de différenciation. Elles sont capables de donner naissance à une cellule lymphoïde progénitrice (CLP) ou à une cellule myéloïde progénitrice (CMP) qui donneront respectivement naissance aux lignées lymphoïdes et myéloïdes (Figure 6).

Malgré un grand nombre d'articles indiquant que les CSH soient capables de se différencier en cellules non-hématopoïétiques comme les cellules hépatiques (Petersen et al. 1999; Lagasse et al. 2000), les cellules pancréatiques (Ianus et al. 2003) , les cardiomyocytes (Orlic et al. 2003), les cellules gliales (Eglitis et al. 1997) et les cellules reinales (Masuya et al. 2003), sous l'influence de différents facteurs stimulants, ces données restent discutables (Wagers et al. 2002; Vassilopoulos et al. 2003; Wang et al. 2003).

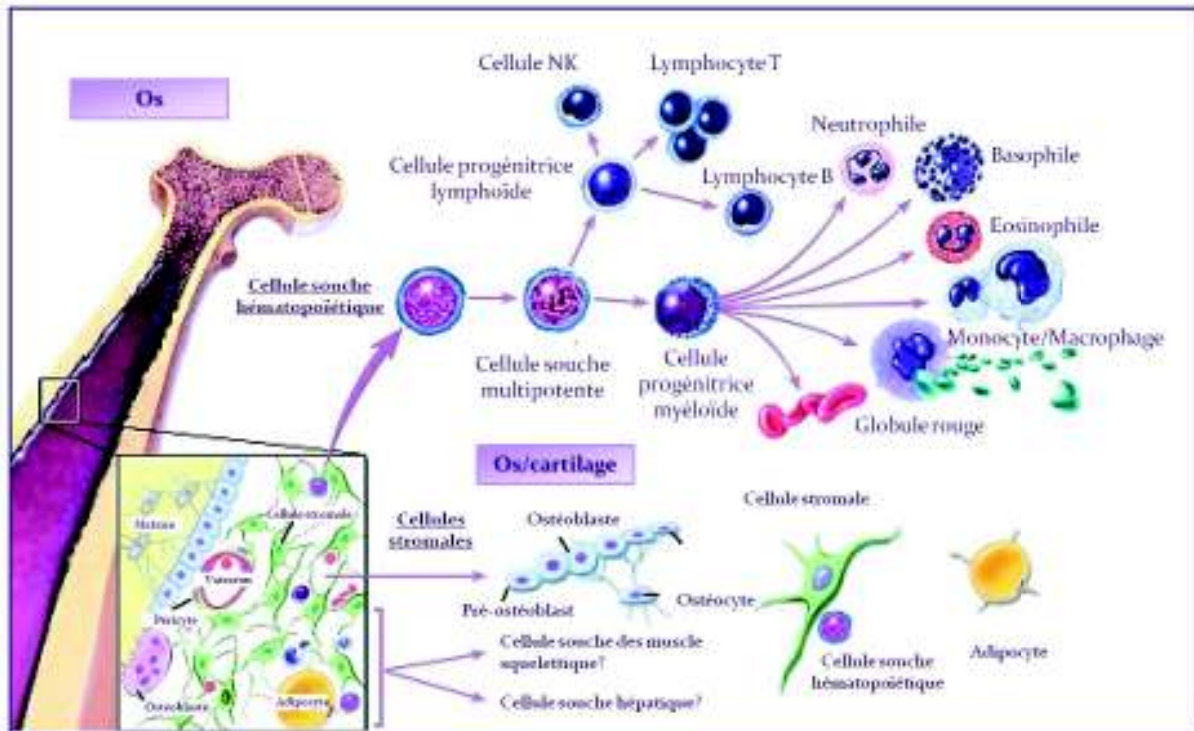


Figure 6 – Représentation schématique de la différenciation des cellules souches dans la moelle osseuse. Les cellules souches sont capables de donner naissance à des cellules progénitrices lymphoïdes et myéloïdes qui donneront respectivement naissance à la lignée lymphoïde et myéloïde. (D'après Winslow 2001)

2.2.3.2 Phénotype des CSH adultes chez l'homme et chez la souris

Des progrès considérables ont été réalisés durant ces 20 dernières années, dans l'isolement et la caractérisation des cellules souches hématopoïétiques murines et humaines (Civin et al. 1993; Uchida et al. 1993; Szilvassy et al. 1995). Ces techniques, font appel à des propriétés physiques et biologiques. L'une d'elles est la technique des anticorps monoclonaux décrite en 1975 par Kohler et Millstein et qui leur a valu le prix Nobel. Cette technique a été à la base d'une révolution dans le domaine des biotechnologies et en particulier dans l'hématopoïèse et l'identification des différents CSH. Cette méthodologie de production d'anticorps monoclonaux a aussi permis de définir différents antigènes ou marqueurs, dont la présence ou l'absence permet de classer les CSH, comme indiqué dans le tableau 4 (Szilvassy 2003).

Chez la souris les CSH sont caractérisées par une forte expression de l'antigène des cellules souches (*stem cell antigen-1*, Sca-1) et du complexe majeur d'histocompatibilité class I (*Major Histocompatibility Complex class I*, MHC I, H-2K). Elles expriment faiblement les marqueurs Thy-1 et c-kit et sont dépourvues des antigènes de linéage (Lin) c'est-à-dire, des marqueurs des cellules différenciées terminales comme les lymphocytes (CD45R/B220, CD3, CD4, CD8), des cellules de lignée myéloïde (CD11b/Mac-1, Ly-6G/Gr-1) et erythroïde (TER-119). Chez l'homme les CSH expriment fortement CD34, moyennement c-kit et Thy-1 et montrent une expression faible ou l'absence d'expression pour les marqueurs CD38, HLA-DR, CD45RA, et CD71. Les CSH murines et humaines ont un fort niveau d'expression de P-glycoprotéine (P-gp), du récepteur transmembranaire qui agit en tant que pompe ATPase, provoquant un phénomène de multi-résistance aux médicaments dans des cellules tumorales. P-gp permet aussi l'exportation de certains fluorochromes, par exemple Rhodamine-123 (Rh-123) (Chaudhary et al. 1992). C'est pourquoi les CSH exposées à Rh-123 émettent un signal fluorescent faible par rapport à des progéniteurs engagés vers une voie de différenciation qui sont Rh-123-bright (Spangrude et al. 1990; Udomsakdi et al. 1991; Li et al. 1992).

En plus de ce phénotype "classique" certains nouveaux marqueurs ont été décrits ces dernières années (Tableau 4).

Tableau 4 - Phénotype des cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques humains et murins. (D'après Szilvassy 2003)

Cellules souches	Progéniteurs
<u>Moelle osseuse d'une souris adulte</u>	
Sca-1+	Sca-1-/+
H-2K+++	H-2K+
Thy-1 lo	Thy-1 -
c-kit lo	c-kit +
CD34-	CD34
CD38+	CD38 -/lo
Rh-123 lo	Rh-123 hi
Ho lo (Bcrp1/Abcg2+) ; SP	HO hi
ALDH+	ALDH-
Flk-2-	Flk-2+
Lin-	Lin-
Endoglobine+	Endoglobine+
<u>Foie fœtale de souris</u>	
AA4.1+	AA4.1+
Mac-1+	Mac-1+
Rh-123 hi	Rh-123 hi
<u>Homme</u>	
CD34-	CD34-
CD38-	CD38-
Thy-1 lo	Thy-1 lo
c-kit lo	c-kit lo
HLA-DR -/lo	HLA-DR -/lo
CD45RA -/lo	CD45RA -/lo
CD71 -/lo	CD71 -/lo
AC133+	AC133+
Rh-123 lo	Rh-123 lo
HO lo	HO lo
KDR+ (Flk-1+)	KDR -/lo
ALDH+	ALDH-

2.2.3.3 Cellules souches et hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines, qui sont pour la plupart d'entre elles très différenciées, et représentent les éléments terminaux et fonctionnels de lignées. L'hématopoïèse assure donc une production quantitativement très

importante: chaque jour elle produit environ 10^{13} cellules sanguines. Cette considérable activité de production est assurée par les CSH.

Après la naissance l'hématopoïèse normale est localisée exclusivement dans la moelle osseuse. Jusque l'âge de 5 ans tous les os ont une activité hématopoïétique. Ensuite cette activité va progressivement se limiter au niveau des os courts et plats (sternum, côtes, vertèbres, os iliaques). Chez les rongeurs la rate et la moelle osseuse ont une activité hématopoïétique. Cette différence avec l'homme est importante pour comprendre et interpréter les nombreuses expériences effectuées sur des souris. Ces études ont permis la mise en évidence et la caractérisation des cellules souches.

2.2.3.4 Cellules souches adultes et homéostasie tissulaire

La prolifération, la différenciation et la migration cellulaires sont trois mécanismes qui permettent de conserver l'homéostasie d'un tissu adulte, c'est à dire le maintien de l'intégrité physiologique des tissus. Ces trois processus cellulaires assurent le remplacement des cellules mortes par apoptose (« naturellement ») ou par nécrose (après une lésion) et préservent ainsi la fonction de l'organe. Ces cellules qui permettent ainsi le renouvellement des tissus de l'organisme adulte sont les cellules souches adultes. Pour pouvoir assurer ce rôle, ces cellules sont capables, d'une part de se multiplier à l'identique pour assurer un stock permanent de cellules souches dans l'organisme, et d'autre part de s'engager dans des voies de différenciation leur permettant d'acquérir les caractéristiques phénotypiques du tissu à réparer.

2.2.3.5 Cellules souches adultes et facteurs paracrines

Plusieurs travaux indiquent que les effets bénéfiques des cellules souches adultes sur la réparation tissulaire seraient dus à leur activité paracrine. En effet, il a été montré que ces cellules produisent et sécrètent de nombreux facteurs de croissance, cytokines et chimiokines. Très récemment, une liste de ces facteurs et de leurs effets tissulaires a d'ailleurs été publiée (Gnecchi et al. 2008) (Tableau 5).

Tableau 5 - Facteurs sécrétés par les cellules souches adultes et leurs effets tissulaires. (D'après Gneccchi 2008)

Facteurs sécrétés	Abréviations	Fonctions proposés
Adrénomédulline	ADM	Cytoprotection
Angio-associated migratory protein	AAMP	Angiogenèse
Angiogénine	ANG	Angiogenèse, prolifération cellulaire
Angiopoïétine-1	AGPT1	Migration cellulaire, stabilisation cellulaire
Bone-morphogenetic protein-2	BMP2	Développement
Bone-morphogenetic protein-6	BMP6	Différenciation cellulaire, croissance
Connective tissue growth factor	CTGF	Angiogenèse, croissance cellulaire
Endothéline-1	EDN1	Cytoprotection, prolifération cellulaire
Fibroblast growth factor-2	FGF2	Prolifération cellulaire, migration
Fibroblast growth factor-7	FGF7	Prolifération et stabilisation cellulaire
Hepatocyte growth factor	HGF	Cytoprotection, angiogenèse, migration
Insuline-like growth factor-1	IGF-1	Cytoprotection, migration, contractilité
Interleukine 1	IL-1	Stimulation du VEGF
Interleukine 6	IL-6	Stimulation du VEGF
Interleukine 11	IL-11	Cytoprotection
Kit ligand/stem cell factor	KITLG (SCF)	Prolifération et migration cellulaire
Leukemia inhibitory factor	LIF	Prolifération cellulaire, cytoprotection
Macrophage migration inhibitory factor	MIF	Prolifération cellulaire, réponse inflammatoire
Métalloprotéase-1	MMP-1	Dégradation de la matrice, formation de tubule
Métalloprotéase-2	MMP-2	Dégradation de la matrice, formation de tubule
Métalloprotéase-9	MMP-9	Dégradation de la matrice
Monocyte chemoattractant protein-1	MCP-1	Migration des monocytes
Macrophage-specific colony-stimulating factor	M-CSF	Prolifération et migration des monocytes
Placenta growth factor	PGF	Prolifération cellulaire

Plasminogen activator	PA	Dégradation des molécules de la matrice
Platelet-derived growth factor	PDGF	Prolifération et migration cellulaire
Pleiotrophine	PTN	Prolifération cellulaire

2.2.3.6 Domaines d'application des cellules souches adultes

Les approches thérapeutiques classiques ne parviennent pas à réparer les organes vitaux, comme le cœur, le cerveau ou les muscles squelettiques lorsqu'ils sont atteints d'une pathologie ou d'une dégénérescence liée à l'âge. Ces organes contiennent pourtant, comme nous l'avons mentionné précédemment, des niches de cellules souches adultes. Mais ces cellules ne semblent pas être suffisamment nombreuses et actives pour régénérer ou réparer leur organe hôte défaillant. C'est pourquoi diverses équipes ont développé des approches permettant d'isoler, de cultiver et d'amplifier ces cellules souches adultes avant de les réinjecter dans l'organe atteint. Des exemples d'applications cliniques des cellules souches de l'organisme adulte sont présentés ci-dessous (Serakinci et al. 2006).

Tableau 6 - Exemples d'applications cliniques des cellules souches adultes. (D'après Serakinci 2006)

Cellules souches adultes	Applications cliniques
Cellules souches mésenchymateuses	Pathologies cardiaques (infarctus du myocarde) / Pathologies osseuses, fractures / Arthrose
Cellules souches neuronales	Maladies neuro-dégénératives (maladie de Parkinson) / Atteintes ou traumatismes du système nerveux central (moelle épinière ou cerveau)
Cellules souches épidermiques	Brûlures / Atteintes cornéennes / Ulcères
Cellules souches hématopoïétiques	Leucémie / Thrombocytopenie / Anémie falciforme etc.

3 Mécanismes d'action des cellules souches adultes

Grâce à leur capacité d'autorenouvellement et leur plasticité les cellules souches adultes (CSA) dérivées de la moelle osseuse ont plusieurs mécanismes d'action. Nous allons détailler certains d'entre eux ci-dessous.

3.1 Transdifférenciation

Plusieurs études *in vitro* indiquent clairement que les CSA présentent une importante plasticité et sont donc capables de se différencier en plusieurs types cellulaires selon les conditions environnementales dans lesquelles elles se trouvent. Il a été montré, par exemple, que le traitement des CSA par un agent déméthylant l'ADN, la 5-azacytidine, entraîne leur différenciation en cardiomyocytes. En effet, après 15 jours de traitement, les CSA acquièrent une morphologie de myotube, changent de phénotype et expriment de nombreux marqueurs spécifiques des cardiomyocytes comme la connexine 43, la desmine ou la myosine (Antonitsis et al. 2007). Les mêmes résultats ont pu être observés lors de co-culture de CSA avec des cardiomyocytes (Wang et al. 2006; Li et al. 2007; Antonitsis et al. 2008). Des études similaires ont montré que les CSA pouvaient *in vitro* et dans des conditions particulières se différencier en plusieurs autres types cellulaires incluant les neurones (Mareschi et al. 2006; Khoo et al. 2008), les cellules pancréatiques (Chen et al. 2004), les hépatocytes (Shu et al. 2004; Ishii et al. 2008), les cellules tubulaires rénales (Imasawa et al. 2001; Kale et al. 2003) et les cellules musculaires squelettiques ou lisses (Westerweel et al. 2008; Gong et al. 2009). Cependant, la possibilité d'une différenciation des CSA *in vivo* est nettement plus difficile à démontrer et reste controversée selon les organes ou les pathologies ciblées et les outils mis en œuvre pour en faire la preuve. Même si ce mécanisme ne semble plus être, à l'heure actuelle, le principal effet médié par les CSA dans la régénération tissulaire, plusieurs travaux démontrent qu'après injection, ces cellules peuvent acquérir les caractéristiques morphologiques et fonctionnelles des cellules constituant l'organe hôte. Des études indiquent que les CSA ont la capacité de se différencier *in vivo* en neurones (Priller et al. 2001), et en cellules épithéliales du foie, du tractus gastro-intestinal ou de la peau (Krause et al. 2001). D'autre part, des études

révèlent que, une semaine après leur injection dans un cœur ischémié, une petite proportion des CSA survivantes acquiert une morphologie proche de celle des cardiomyocytes résidents et exprime des marqueurs cardiaques comme la troponine-T cardiaque, l' α -actinine et la desmine (Shake et al. 2002; Toma et al. 2002). Dans l'HTAP de nombreuses études ont permis d'identifier la présence d'un pool des CSA circulantes qui participent au remodelage de l'adventice au niveau des artérioles pulmonaire. Il a été également montré que ces CSA sont recrutées dans les poumons, qu'elles expriment l'actin- α des CML et produisent le collagène de type I (Frid et al. 2006).

3.2 Fusion cellulaire

Comme nous venons de le voir, plusieurs études suggèrent que les CSA possèdent un large potentiel de différenciation *in vitro* grâce à l'importante plasticité de ces cellules. Cependant, certaines équipes rapportent que des mécanismes de fusion cellulaire pourraient expliquer ce potentiel. En 2003, Alvarez-Dolado et ses collaborateurs ont montré *in vivo*, en utilisant le modèle de recombinaison Cre-Lox, que les CSA peuvent fusionner avec des hépatocytes, des neurones du réseau de Purkinje et des cardiomyocytes, entraînant de ce fait la formation de cellules multinuclées. Cette même équipe n'a pas pu mettre en évidence de mécanismes de transdifférenciation directe des CSA dans tous ces tissus (Alvarez-Dolado et al. 2003). Ce mécanisme de fusion cellulaire a été également étudié et confirmé sur les hépatocytes par d'autres chercheurs (Vassilopoulos et al. 2003; Wang et al. 2006).

Dans le cas du cancer de la prostate il a été démontré que les CSA migrent vers le site du cancer grâce à l'expression de cytokines et de chimiokines dans l'environnement tumorale. Une fois sur place les CSA fusionnent avec les cellules épithéliales, ce qui a permis à Placencio et ses collègues de les utiliser comme vecteurs pour transporter le gène de *SFRP2* – l'antagoniste de la voie de signalisation Wnt, sur le site tumoral afin de pouvoir restaurer la réponse de la tumeur à la castration (Placencio et al. 2010).

Récemment Spees et ses collègues ont pu montrer à l'aide de la méthode FISH sur des cellules isolées, la fusion des CSA avec les cellules pulmonaires endogènes de l'hôte dans le cas de l'hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline chez le rat (Spees et al. 2008). La fréquence de ce phénomène au niveau pulmonaire reste extrêmement rare.

3.3 Stimulation de l'angiogenèse tissulaire

Il a été démontré que les CSA, et en particulier les progéniteurs endothéliaux, sont impliquées dans des pathologies aussi diverses que la rétinopathie diabétique, le cancer, l'arthrite rhumatoïde et le psoriasis (Folkman 1995; Ferrara 2000). Plusieurs articles indiquent qu'une fois injectées dans un tissu ischémié (après infarctus du myocarde ou après ischémie rénale par exemple), les CSA stimulent de façon importante l'angiogenèse tissulaire et favorisent la reprise fonctionnelle de l'organe. En effet, Togel *et al* ont pu mettre en évidence une augmentation significative de l'angiogenèse suite à la greffe de CSA dans un rein ischémié. Cet effet semblerait dû à la sécrétion par ces cellules de différents facteurs de croissance pro-angiogéniques comme le VEGF, le HGF et l'IGF (Togel et al. 2007). De la même manière, une autre étude portant sur un modèle d'ischémie/réperfusion cardiaque montre que les CSA induisent une néo-angiogenèse au sein du tissu cardiaque avec une augmentation significative du nombre de capillaires par rapport aux animaux n'ayant pas reçu ces cellules (Tang et al. 2006).

Les CSA sont également impliquées dans la circulation pulmonaire. Il faut noter que dans le cas de certaines maladies liées à une augmentation du débit cardiaque, la pression artérielle pulmonaire n'est pas altérée. En effet, une partie du réseau capillaire n'est pas perfusée à l'état de base ce qui forme un réseau vasculaire de réserve pouvant tamponner les augmentations de débit. Dans le cas de l'emphysème, les septa alvéolaires s'épaississent et perdent leur élasticité ce qui peut provoquer dans certains cas une augmentation de la pression artérielle pulmonaire et le développement de l'HTAP. Dans cette situation, les CSA, ici les progéniteurs endothéliaux, permettraient la reconstruction du réseau microvasculaire et diminueraient la pression artérielle

pulmonaire (Hopkins et al. 2002). Un scénario pathologique opposé a été décrit dans l'HTAPI, qui ne présente pas de perte capillaire évidente (même si ce point reste controversé). Les auteurs ont pu montrer qu'au sein des lésions plexiformes les cellules endothéliales exprimaient le VEGF et le VEGF récepteur 2, un couple protéine/récepteur impliqué dans l'angiogenèse. Les CSA pourraient jouer un rôle défavorable dans l'angiogenèse aberrante rencontrée dans l'HTAPI (Tuder et al. 2001).

On observe le même phénomène dans la circulation systémique. Les maladies cérébrovasculaires, et les maladies ischémiques du cœur et des vaisseaux périphériques comme l'athérosclérose, sont caractérisées par une diminution de la perfusion de vaisseaux distaux causée par le dépôt de plaques d'athérome. Dans ce cas, la néo-angiogenèse provoque l'accumulation de cellules inflammatoires au sein de la plaque, et augmente le risque d'hémorragie *via* la rupture des néo-capillaires (Hill et al. 2003; Ribatti et al. 2008). La néo-formation de réseaux microvasculaires et de *vasa vasorum* provoque aussi le développement et la déstabilisation de la plaque (Virmani et al. 2005). En accord avec cette hypothèse Moulton *et al* ont reporté que le blocage de l'angiogenèse avec l'angiostatine dans les stades tardifs de la maladie diminuait l'accumulation des macrophages ainsi que la progression de l'athérosclérose, en ayant un effet bénéfique sur la stabilité des plaques (Moulton et al. 2003).

3.4 Sécrétion des cytokines et des facteurs de croissance

Les études récentes de thérapie cellulaire indiquent que la majorité des effets observés après la greffe de CSA dans des tissus lésés est due à leur importante activité paracrine. En effet, les CSA sont de véritables réservoirs à cytokines, chimiokines et facteurs de croissance ayant des rôles variables sur les organes (Caplan et al. 2006). Les CSA sécrètent notamment des interleukines (IL-6, IL-8, IL-11 et IL-12), des facteurs de croissance pro-angiogéniques, anti-apoptotiques et mitogéniques (VEGF, HGF, b-FGF et IGF-1), des facteurs anti-fibrotiques (les métalloprotéases MMP-1, MMP-2 et MMP-9, activateur plasminogène), des facteurs impliqués dans la prolifération et la migration des monocytes (M-CSF et MCP-1) et des molécules favorisant la domiciliation (le

«homing») de progéniteurs (SCF) (Kinnaird et al. 2004; Nagaya et al. 2005; Ohnishi et al. 2007; Togel et al. 2007; Schinkothe et al. 2008).

3.5 Stimulation de la prolifération des cellules souches endogènes

Un autre mécanisme contribuant aux effets des CSA dans la régénération et la réparation tissulaire a été rapporté par différentes équipes. Il semble que les CSA soient capables d'activer la prolifération de cellules souches résidant au sein de l'organe endommagé. Il a été montré dans un modèle d'infarctus du myocarde chez le porc que la greffe de CSA améliore de façon significative la fraction d'éjection ventriculaire, réduit la taille de l'infarctus et augmente la quantité de tissu cardiaque «néo-formé» viable au niveau des zones d'injection (Mazhari et al. 2007). Ces effets apparaissent indépendamment d'une transdifférenciation des cellules injectées en cardiomyocytes. D'autre part, il a été mis en évidence au stade terminal de l'insuffisance cardiaque, l'apparition de nouvelles cellules aussi bien de type endothéliales que myocytaires au sein du tissu cardiaque. En plus de la découverte récente de la présence de cellules souches cardiaques endogènes (Beltrami et al. 2003; Oh et al. 2003), ces résultats suggèrent que le cœur contient des niches de cellules souches pouvant être activées de façon paracrine après lésions tissulaires. Une autre étude montre que les CSA sont également capables d'augmenter de façon significative la prolifération de cellules souches neurales résidentes chez le rat après une congestion cérébrale (Yoo et al. 2008). Les auteurs rapportent que cet effet serait dû à la sécrétion de facteurs bioactifs par les CSA.

Dans le poumon plusieurs études ont confirmé la présence des CSA résidentielles. Lama *et al* ont effectué des lavages broncho-alvéolaires (LBA) chez 76 transplantés pulmonaires. Les cellules du LBA ont été mises en culture. Celles qui avaient la capacité d'adhérer à la boîte de culture ont été étudiées. Elles avaient un phénotype de fibroblaste dans 62 % des cas, et exprimaient la vimentine et la prolyl 4-hydroxylase, deux marqueurs de cellules mésenchymateuses. D'autres marqueurs de surface de ces cellules confirmaient l'origine mésenchymateuse (CD90, CD105, CD73), par contre, ces cellules n'exprimaient pas les marqueurs de cellules hématopoïétiques (CD34, CD45).

Ces cellules étaient multipotentes car capables en culture de se différencier en adipocytes, en chondrocytes ou en ostéocytes (Sabatini et al. 2005; Lama et al. 2007). Dans le cas de la fibrose pulmonaire l'une des hypothèses sur l'origine des myofibroblasts est l'hypothèse de l'expansion des cellules souches résidentielles pulmonaires sous l'influence de différents facteurs pro-fibrosants (cytokines, facteurs de croissance).

3.6 Inhibition de l'apoptose

Comme il a été mentionné précédemment, les effets anti-apoptotiques des CSA sont également dus à leur activité paracrine. En effet, les CSA sécrètent de nombreux facteurs de croissance qui réduisent considérablement l'apoptose des cellules résidentes au sein de l'organe atteint (Bao et al.; Togel et al. 2005; Togel et al. 2007). Il a d'ailleurs été montré que cet effet serait en partie arbitré par la production de IGF-1, VEGF et HGF (Sadat et al. 2007; Togel et al. 2007).

3.7 Effet immunomodulateur

Les mécanismes expliquant les effets immunomodulateurs de CSM sont multiples. Il a tout d'abord été montré que les CSM n'expriment que très faiblement les CMH de classe I et II, ainsi que les différentes molécules co-stimulatrices (CD40, CD80 et CD86), et inhibent directement les cellules dendritiques. En effet, les CSM humaines sont capables d'inhiber de façon dose-dépendante la prolifération des lymphocytes T induite par les cellules dendritiques (suppression de 65% pour les lymphocytes T CD4+ et de 75% pour les lymphocytes T CD8+) (Di Nicola et al. 2002). Des études *in vitro* indiquent que les CSM modifient le profil d'expression cytokinique des cellules dendritiques, des cellules Natural Killer (NK) et des lymphocytes T en favorisant un phénotype anti-inflammatoire. En effet, les CSM diminuent la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles que l'IL-12 et le TNF- α et stimulent la production de cytokines anti-inflammatoires telle que l'IL-10 par les cellules dendritiques (Aggarwal et al. 2005). D'autre part, les CSM sont elles aussi capables d'inhiber le pouvoir

immunogène des cellules NK en réduisant de façon significative leur production d'INF- γ . Finalement, les CSM peuvent agir directement sur les lymphocytes T en augmentant la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β et en diminuant la sécrétion de INF- γ (Di Nicola et al. 2002; Tse et al. 2003; Aggarwal et al. 2005). Cependant, lorsque l'IL-10 et le TGF- β sont bloqués avec des anticorps neutralisants, l'effet immunosuppresseur des CSM n'est pas totalement supprimé. Par ailleurs, l'équipe de Aggarwal a montré que la majorité des effets immunomodulateurs des CSM serait due à la sécrétion de prostaglandine E₂ (PGE₂) (Aggarwal et al. 2005). Enfin, les CSM pourraient moduler la réponse immune *via* la génération de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ spécifiques d'antigènes (Ye et al. 2008; Tasso et al. 2009).

4 Le rôle des progéniteurs dans le remodelage vasculaire

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'HTAP est caractérisée par des changements cellulaires et structurels qui touchent tous les compartiments des parois artérielles pulmonaires : formation de néo-intima, hypertrophie de la media, changements fibroprolifératifs dans l'adventice, et expansion des CML dans les artérioles distales normalement non-musculaires. Une grande partie de ces changements est associée à la présence de cellules inflammatoires et de cellules exprimant l' α -SMA. Cependant, à ce jour, ni l'origine de ces cellules, ni les mécanismes moléculaires responsables de leur accumulation au sein des 3 compartiments de la paroi vasculaire ne sont complètement élucidés.

Selon l'hypothèse classique les cellules α -SMA⁺ au sein des lésions vasculaires sont originaires des CML vasculaires pulmonaires résidentes ou encore le résultat de la « dé-différenciation » des fibroblastes locaux. Néanmoins, les données expérimentales obtenues au cours de la dernière décennie élargissent cette hypothèse et apportent plusieurs sources alternatives quant à l'origine de ces cellules α -SMA⁺ dans différentes maladies vasculaires, dont l'HTAP. Il a été montré que les cellules épithéliales et endothéliales sont capables d'acquérir un phénotype mésenchymateux (Arciniegas et al. 2007; Hinz et al. 2007). Des progéniteurs vasculaires sont également présents au sein de la paroi vasculaire et sont capables, sous l'influence des facteurs inflammatoires, de

migrer, proliférer et exprimer les marqueurs des myofibroblastes, des cellules endothéliales ou encore des marqueurs hématopoïétiques (Ergun et al.; Hu et al. 2003; Stenmark et al. 2006; Zengin et al. 2006; Torsney et al. 2011). La présence des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse et des progéniteurs circulants capables d'acquérir les phénotypes des CE et des CML a été également décrite (Liu et al. 2004; Frid et al. 2006; Sata 2006). Dans ce paragraphe nous ferons un point sur les populations de précurseurs circulants participant au remodelage vasculaire pulmonaire et systémique, actuellement connues.

4.1 L'origine et la caractérisation des progéniteurs circulants

4.1.1 Les précurseurs endothéliaux circulants

Les précurseurs endothéliaux circulants (PEC) représentent la population la plus étudiée parmi toutes les sous populations de progéniteurs humains. Leur découverte remonte à 1997 quand Ashara *et al* font un grand pas dans la compréhension du développement vasculaire chez les adultes (Asahara et al. 1997). Les PEC classiquement originaires de la moelle osseuse ont été retrouvés dans l'adventice (Tanaka et al. 2008; Sirker et al. 2009), ou encore dans l'endothélium vasculaire (Urbich et al. 2004; Zengin et al. 2006; Alvarez et al. 2008). La définition des PEC reste actuellement très controversée (Yoder et al. 2009). La combinaison de marqueurs la plus récurrente pour l'identification des PEC comprend certains marqueurs hématopoïétiques comme CD133, CD34, VEGFR-2, Tie-2 et la lectine UEA-1 (Peichev et al. 2000; Urbich et al. 2004; Barber et al. 2006; Yoder et al. 2009). Cependant les études récentes permettent d'inclure les progéniteurs myéloïdes en tant que PEC fonctionnels contribuant à la régénération endothéliale et l'angiogenèse tumorale ou ischémique. Ces cellules sont caractérisées par l'expression de CD14 et représentées par les sous-populations suivantes : CD14+/CD34^{low}, CD14+/VEGFR-2+, CD14+/VEGFR2+/CXCR2+, et CD14^{low}/CD16+/Tie-2+ (Hristov et al. 2007; Venneri et al. 2007). En conclusion, la population des PEC correspond à une population hétérogène d'origines multiples, avec un phénotype complexe et une large distribution tissulaire. Les propriétés communes de ces cellules sont l'expression de certains marqueurs (par exemple CD34, VEGFR2,

CD31, VE-cadherin, von Willebrand Factor), la capacité à former des colonies, à se différencier en CE et à former un réseau vasculaire *in vitro* et *in vivo* (Urbich et al. 2004; Hristov et al. 2007; Yoder et al. 2009). Les chercheurs ont également exploré le potentiel des PEC à former des colonies *in vitro*, ce qui pourrait être un indicateur des maladies cardiovasculaires, dont l'HTAP (Hill et al. 2003; Burnham et al. 2005; Smadja et al. 2009; Smadja et al. 2010).

4.1.2 Les précurseurs circulants des cellules musculaires lisses

Une autre population de progéniteurs – les progéniteurs des cellules musculaires lisses (PCM), n'a pas été aussi intensivement étudiée que les PEC. Les PCM circulants ou résidants, peuvent également provenir de la moelle osseuse ou des tissus périphériques. Cette population est déterminée par l'ensemble des marqueurs mésenchymateux et des marqueurs des CML comme l'endogline (CD105), α -SMA, calponine, SM-MHC (*smooth muscle-myosin heavy chain*), SM22, ou PDGFR β (Simper et al. 2002; Zerneck et al. 2005; Sugiyama et al. 2006; Campagnolo et al. 2010). Chez la souris une population c-kit-/Sca1+/Lin/PDGFR β + isolée et cultivée en présence de PDGF-BB présentait le phénotype des CML (Zerneck et al. 2005). Il a été ensuite proposé que ces cellules participent à la formation des plaques d'athérome grâce à leur production de matrice extracellulaire (Bentzon et al. 2010; Campagnolo et al. 2010). Une population humaine myéloïde CD14+ PCM a été récemment identifiée en circulation (population CD14+/CD105+) (Sugiyama et al. 2006).

4.1.3 Les précurseurs circulants putatifs des fibroblastes: les fibrocytes

Une autre population de progéniteurs vasculaires – les fibrocytes, attire de plus en plus l'attention des chercheurs. Les fibrocytes sont des progéniteurs mésenchymateux d'origine hématopoïétique qui co-expriment des antigènes de progéniteurs hématopoïétiques, de lignée monocyttaire, et de fibroblastes (Bucala et al. 1994). Les fibrocytes produisent de la matrice extracellulaire ainsi que des

métalloprotéinases de la matrice et peuvent se différencier en myofibroblastes *in vitro* et *in vivo*, en fonction des conditions de culture (Bellini et al. 2007). Les fibrocytes sont caractérisés par l'expression de CD45, CD11a et b ainsi que de CD14 et de CD34. Après stimulation, ces cellules expriment le collagène de type I, la fibronectine, la vimentine et la MMP-9. Les fibrocytes expriment les CMH de classe I et II et les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Ils possèdent les propriétés des CPA et sont capables d'activer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Herzog et al.; Balmelli et al. 2005; Bellini et al. 2007). La combinaison d'un marqueur mésenchymateux (Collagène I, vimentine) et d'un marqueur hématopoïétique ou myéloïde (CD11b, CD13, CD34) est considérée suffisante pour discriminer les fibrocytes des leucocytes, des CE et des fibroblastes tissulaires. Une fois recrutés, les fibrocytes cessent d'exprimer les marqueurs hématopoïétiques ou monocytaires.

Certains facteurs, comme le SAP (*Serum Amyloid Protein*) inhibent la différenciation des précurseurs monocytaires CD14+ en fibrocytes (Pilling et al. 2003). Une étude récente montre que les cytokines de type Th-1 (comme IL-12, IFN- γ) ont le même effet, alors que les cytokines de type Th-2 (comme IL-4, IL-12) ainsi que TGF- β favorisent cette différenciation. Le TGF- β ou l'endothéline induisent ensuite la différenciation des fibrocytes en fibroblastes lésionnels ou en myofibroblastes (Schmidt et al. 2003). Ces cellules expriment l' α -SMA, produisent des quantités importantes de collagène et de fibronectine, et perdent l'expression des marqueurs leucocytaires.

4.2 Les progéniteurs circulants et le remodelage vasculaire systémique

La contribution des progéniteurs au remodelage vasculaire a largement été étudiée dans les maladies vasculaires systémiques. Une partie de ces études sert de rationnel pour les études portant sur le remodelage pulmonaire. Il est important de détailler l'implication des progéniteurs circulants dans le remodelage vasculaire systémique afin de mieux comprendre leur impact dans la circulation pulmonaire.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, et contrairement au dogme indiquant qu'une atteinte tissulaire est suivie par la migration et la prolifération des cellules résidentes adjacentes, les cellules précurseurs multifonctionnelles sont mobilisées dans la circulation et recrutées vers le site lésionnel. Plusieurs études semblent indiquer que les PEC dérivés de la moelle osseuse contribuent à la néo-vascularisation et la ré-endothélialisation après une atteinte vasculaire (Asahara et al. 1997; Murasawa et al. 2005). Les études réalisées sur les animaux ainsi que les études cliniques indiquent que la transplantation de PEC autologues ou de cellules non fractionnées de la moelle osseuse est efficace pour le traitement des maladies cardiovasculaires ischémiques (Khakoo et al. 2005; Sata 2006). Néanmoins, de nombreuses études soulignent le double rôle des précurseurs circulants: ils participent à la fois à la restauration et à la maintenance de l'homéostasie vasculaire, mais aussi à la pathogenèse de différentes maladies cardiovasculaires. Dans ce mémoire de thèse, nous nous focalisons d'avantage sur le rôle des précurseurs circulants dans l'angiogenèse pathologique et la formation des lésions intimes, étant donné la pertinence de ces processus dans le remodelage vasculaire au cours de l'HTAP.

Une angiogenèse aberrante est impliquée dans la pathogenèse des nombreux désordres systémiques, comme la rétinopathie diabétique, les tumeurs, l'arthrite rhumatoïde et le cirrhose (Folkman 1995; Ferrara 2000). Les PEC semblent participer à l'angiogenèse observée dans ces conditions (Asahara et al. 1999; Grant et al. 2002; Hu et al. 2003). L'angiogenèse tumorale en particulier est associée avec le recrutement de précurseurs hématopoïétiques et de PEC (Lyden et al. 2001). Les données expérimentales montrent que le VEGFR-1 exprimé à la surface des progéniteurs hématopoïétiques est nécessaire pour la dissémination des métastases (Kaplan et al. 2005). Les CE, originaires de la moelle osseuse et de la circulation qui s'accumulent dans les lésions néo-intimes des allogreffes, sont responsables de la formation de micro-vaisseaux (Hu et al. 2003). Cette observation laisse supposer que la transplantation de PEC ou de cellules de la moelle osseuse, dans certaines conditions, va favoriser le développement de la tumeur, de la rétinopathie diabétique et de l'athérosclérose, *via* l'augmentation de l'angiogenèse pathologique associée à ces pathologies. Néanmoins, certaines études cliniques ont démontré que le nombre des

PEC est inversement corrélé avec les facteurs de risque de la maladie coronaire (Hill et al. 2003). De plus, le taux des PEC a été inversement corrélé avec la fréquence des accidents cardiovasculaires (Schmidt-Lucke et al. 2005). Ceci suggère que les taux physiologiques de PEC ont plutôt une fonction bénéfique dans la prévention de l'athérosclérose, sans provoquer d'angiogenèse pathologique. Le nombre élevé de cellules exprimant l' α -SMA dans des lésions néo-intimales a été initialement lié aux CML adjacentes qui migrent de la media vers l'espace sous-endothéliale, prolifèrent et synthétisent de la matrice extracellulaire en contribuant à la formation de la néo-intima (Ross 1999). Cependant, il a été montré récemment que les cellules CML situées dans la néo-intima ont un phénotype différent des CML situées dans la media. Par exemple, contrairement aux CML médiales qui ont un appareil contractile bien développé, les CML intimales présentent un grand nombre d'organelles à fonction sécrétrice et de synthèse. Ces CML particulières synthétisent de la matrice extracellulaire et sont déficientes en protéines contractiles, spécifiques des CML contractiles et différenciées (Campbell et al. 1990). Elles migrent et prolifèrent en réponse aux différents facteurs de croissance présents dans la paroi des vaisseaux endommagés (Owens et al. 2004). Beaucoup d'efforts ont été déployés pour comprendre les mécanismes impliqués dans la transition entre des CML différenciées (dans des conditions normales) à des cellules CML-« like » de-différenciées (en présence de signaux pathologiques). En plus de la de-différenciation des CML résidentes en cellules macrophage-« like », les données récentes étayaient une autre hypothèse selon laquelle ces cellules sont issues de la circulation (Tanaka et al. 2003; Tanaka et al. 2008). Les précurseurs des CML sont potentiellement capables de contribuer à la formation des plaques grâce à leur production de matrice extracellulaire (Campagnolo et al. 2010).

En plus des PEC et des PCM, la présence de fibrocytes a également été décrite dans la paroi des vaisseaux systémiques remodelés. Les fibrocytes (définis comme procollagen-1+/CD34+) ont récemment été décrits dans des lésions athérosclérotiques (Medbury et al. 2008). De plus, des myofibroblastes sous-endothéliaux α -SMA+ et co-exprimant CD68 ou CD34 ont été retrouvés dans des endroits riches en lipides au sein de l'intima athérosclérotique dans l'aorte et la carotide, ce qui laisse supposer que ces

cellules sont des fibrocytes (Andreeva et al. 1997). Dans ces modèles murins d'athérosclérose, l'une des sous populations monocytaires recrutée au niveau des parois artérielles lésées, représente l'équivalent d'une population de monocytes humains pro-inflammatoires CD14+/CD16-, qui exprime le récepteur de MCP-1, CCR2 (Tacke et al. 2006). La sous-population CD14+/CD16-/CCR2+ peut être impliquée dans l'athérogenèse et peut contenir les précurseurs des fibrocytes, contribuant à la formation des lésions. Les fibrocytes sont impliqués dans le remodelage vasculaire pathologique de différentes maladies comme la bronchiolite oblitérante (Andersson-Sjoland et al. 2009), l'asthme (Westergren-Thorsson et al.), la fibrose pulmonaire (Keeley et al. 2010) et la cardiopathie ischémique (Haudek et al. 2006).

Dernièrement, les données montrent que la chimiokine CCL2 (aussi appelée MCP-1) a un rôle majeur dans la pathogenèse de l'athérosclérose et permet le recrutement des fibrocytes dans les parois vasculaires (McDermott et al. 2005).

4.3 Les progéniteurs circulants et le remodelage vasculaire pulmonaire

4.3.1 HTAP expérimentale

Davie *et al* ont été les premiers à examiner la contribution des progéniteurs circulants au remodelage vasculaire pulmonaire (Davie et al. 2004). Ils ont vérifié l'hypothèse selon laquelle l'hypoxie pourrait stimuler la mobilisation des cellules c-kit+ dérivées de la moelle osseuse dans la circulation et favoriser l'adhésion et le recrutement de ces cellules autour des artères remodelées. Cette étude montre que l'hypoxie provoque une mobilisation des cellules c-kit+ dans la circulation et diminue leur taux dans la moelle osseuse. En effet, les signaux ischémiques induisent la mobilisation des cellules souches dérivées de la moelle osseuse (Takahashi et al. 1999; Davie et al. 2004). Par ailleurs, les gènes régulés par l'hypoxie y compris l'érythropoïétine et le VEGF sont impliqués dans la génération et la différenciation des hémangioblastes, les précurseurs des cellules souches hématopoïétiques et des précurseurs endothéliaux (Ramirez-Bergeron et al. 2001). De plus, le VEGF provoque la mobilisation des cellules souches hématopoïétiques et des PEC, impliqués dans

l'angiogenèse tumorale (Lyden et al. 2001). Les auteurs ont observé une accumulation accrue de progéniteurs c-kit⁺ dans l'adventice des artères remodelées d'animaux soumis à l'hypoxie comparés aux animaux normoxiques. Une démonstration indirecte de la contribution des progéniteurs c-kit⁺ dans l'expansion des *vasa vasorum* et dans l'accumulation des fibroblastes/myofibroblastes a été réalisée *in vitro*. Les PBMC isolées de veau hypoxique étaient capable de se différencier en CE et en CML-« like », en fonction des conditions de culture. Les auteurs ont également montré une expansion des *vasa vasorum* au cours du développement de l'HTAP induite par l'hypoxie. De façon similaire au remodelage vasculaire systémique, l'expansion des *vasa vasorum* permet le recrutement de l'infiltrat inflammatoire et des progéniteurs (c-kit⁺) dans la paroi des vaisseaux pulmonaires remodelés (Andreeva et al. 1997). Suivant la même hypothèse, Hayashida *et al* ont utilisé des souris chimériques transplantées avec de la moelle osseuse exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) afin d'étudier le rôle des cellules dérivées de la moelle osseuse dans le remodelage vasculaire pulmonaire induit par l'hypoxie (Hayashida et al. 2005). Ils ont pu montrer que l'hypoxie induisait le recrutement des cellules GFP⁺ dans la paroi des artères pulmonaires remodelées et que, progressivement, ces cellules exprimaient l' α -SMA. Ces deux études sont une démonstration claire de l'implication des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans le remodelage des artères pulmonaires induit par l'hypoxie (Davie et al. 2004; Hayashida et al. 2005). Par ailleurs, d'autres études confirment le rôle des progéniteurs y compris les fibrocytes et les progéniteurs mésenchymateux dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Les fibrocytes circulants sont impliqués dans la pathogenèse de la fibrose pulmonaire dans le modèle de fibrose pulmonaire induit par la bléomycine (Keeley et al. 2010). Les fibrocytes contribuent également à la fibrose sous-épithéliale observée dans les modèles d'asthme murins (Schmidt et al. 2003).

Dans des modèles expérimentaux de l'HTAP (chez le rat et le veau) Frid *et al* ont pu montrer que l'exposition à l'hypoxie chronique induit une accumulation des fibrocytes dans l'adventice des artères pulmonaires (Frid et al. 2006). Le point le plus important de cette étude est la démonstration directe de lien entre l'accumulation des fibrocytes et le remodelage vasculaire pulmonaire. La déplétion des monocytes/fibrocytes circulants avec 2 stratégies différentes prévient le remodelage

vasculaire chez les rats hypoxiques. Ces résultats sont cohérents avec d'autres études menées dans des organes différents, où la déplétion des fibrocytes se manifestait par la diminution de la production de collagène et de l'accumulation des myofibroblastes (Schmidt et al. 2003; Phillips et al. 2004; Haudek et al. 2006; Varcoe et al. 2006). Cependant, il faut noter que les fibrocytes sont des cellules pro-inflammatoires et produisent eux-mêmes des cytokines et des facteurs de croissance, capables d'induire l'angiogenèse, l'hyperplasie des fibroblastes et la production de matrice extracellulaire par les fibroblastes résidents (Wang et al. 2007). La corrélation entre l'accumulation des fibroblastes et le remodelage tissulaire pourrait également refléter leur effet paracrine sur les cellules vasculaire pulmonaires.

D'autres études confirment l'implication des progéniteurs dérivés de la moelle dans le remodelage vasculaire pulmonaire. En utilisant les souris transgéniques GFP+, Angelini *et al*, ont montré que l'hypoxie induit le recrutement de cellules sca-1+c-kit+CD31-CD34- dans les vaisseaux néo-muscularisés (Angelini et al. 2010). En utilisant la même méthode, des résultats similaires ont été obtenus dans le model d'HTAP induite chez le rat par la monocrotaline (Spees et al. 2008).

L'ensemble de ces données démontre que les précurseurs dérivés de la moelle osseuse jouent un rôle important dans la pathologie vasculaire et que les stratégies basées sur l'inhibition du recrutement de ces cellules pourraient constituer une option thérapeutique importante dans le traitement des maladies vasculaires pulmonaires, et de l'HTAP en particulier.

4.3.2 HTAP humaine

Le rôle des progéniteurs dans la physiopathologie de l'HTAP fait débat et un grand nombre d'études aux résultats parfois contradictoires a été publié (Tableau 7).

Chez les patients souffrant d'HTAPI et chez les sujets témoins, Asosingh *et al* ont décrit la présence de deux populations de PEC: "early" (ou progéniteurs endothéliaux monocytaires) et "late" (Asosingh et al. 2008). La première (caractérisée comme CD34+CD133+) a été augmentée de façon significative chez les patients souffrant

d'HTAPI. Cette augmentation a pu être corrélée avec la pression artérielle pulmonaire chez ces sujets.

Une étude récente de Yao *et al* réalisée chez les patients atteints d'HTAP thromboembolique a montré la présence de progéniteurs endothéliaux (CD34+CD133+KDR+) au sein des tissus endartériectomisés. Le même groupe a montré la présence de progéniteurs mésenchymateux CD44+CD73+CD90+CD166+CD34-CD45- (Firth *et al.* 2010). Les cellules co-exprimaient les filaments intermédiaires comme la vimétine et l' α -SMA, ce qui confirme leur phénotype myofibroblastique au sein des tissus endartériectomisés. De plus, après isolation, ces progéniteurs mésenchymateux sont capables de se différencier en adipocytes et en lignées ostéogéniques. Bien que les progéniteurs mésenchymateux soient capables d'acquérir de nombreux phénotypes, ils ne sont pas capables de s'intégrer eux-mêmes dans la l'architecture vasculaire pulmonaire ce qui confirme l'hypothèse de leur action paracrine (Patel *et al.* 2007).

Chez les patients atteints de broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), susceptibles de développer l'HTAP, le remodelage vaculaire est caractérisé par l'hypertrophie de l'intima, due à l'accumulation de cellules CML-« like ». Les PEC CD133+ ont été également impliqués dans ce processus (Peinado *et al.* 2006). De plus, le nombre de cellules CD133+ recrutées dans des vaisseaux remodelés a été corrélé avec l'épaississement de la paroi artérielle, indiquant un lien potentiel entre le nombre des précurseurs CD133+ et la sévérité du remodelage (Peinado *et al.* 2006). Le même groupe a montré dans des études *in vitro*, que les précurseurs CD133+ sont capables d'acquérir le phénotype des CE mais aussi des cellules CML-« like ». Les auteurs ont également montré qu'après incubation avec une artère pulmonaire humaine isolée, les CD133+ migrent dans l'intima et se différencient en cellules CML-« like » sans fusionner avec les CML différenciées. Cela confirme que les précurseurs CD133+ possèdent un certain degré de plasticité et sont capables de se différencier en CE et en CML-« like », soulignant leur rôle probable dans l'HTAP associé à la BPCO.

D'autres études mettent en évidence une augmentation du nombre de précurseurs circulants CD133+ possédant un phénotype hyperptolifératif et résistant à l'apoptose chez les patients atteints d'HTAPI (Masri *et al.* 2007). Majka *et al* ont

montré une accumulation de cellules CD133+ autour des lésions vasculaires pulmonaires dans l'HTAPI et HTAPH (Majka et al. 2008). Les PEC CD133+ ont été détectés au sein des lésions plexiformes (Toshner et al. 2009). De plus, l'analyse par cryométrie de flux a montré une augmentation des progéniteurs angiogéniques circulants CD133+CD34+VEGFR2+ chez les patients atteints d'HTAP comparé aux contrôles. Après isolation et culture, ces cellules montrent une capacité angiogénique plus importante par rapport aux témoins. Cette étude permet de mieux comprendre les mécanismes de remodelage vasculaire et en particulier, le développement de lésions contenant des CE. En accord avec l'hypothèse selon laquelle l'angiogenèse favorise le développement et la progression des maladies vasculaires, ces études peuvent être interprétées comme une démonstration de l'effet négatif des PEC dans l'HTAP.

Cependant, d'autres études ont apporté des résultats contradictoires. Junhui *et al* ont montré la diminution des progéniteurs circulants définis comme CD133+KDR+ et une dysfonction de ces cellules chez les patients HTAPI comparés aux sujets sains (Junhui et al. 2008). Des résultats similaires ont été obtenus par Diller *et al* montrant une diminution des cellules circulantes CD34+KDR+ chez les patients atteints de syndrome d'Eisenmenger et d'HTAPI (Diller et al. 2008). Par ailleurs, chez les patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique associée à l'HTAP, le nombre de PEC circulants CD34+CD133+KDR+ est également diminué, comparé au patients avec fibrose pulmonaire idiopathique sans HTAP (Fadini et al. 2007). La déplétion des PEC CD34+KDR+ a également été décrite chez les patients avec BPCO, qui sont susceptibles de développer une HTAP (Huertas et al. 2010). Une autre étude intéressante explore l'effet de BMPR-2 sur les cellules endothéliales pulmonaires et sur leurs précurseurs isolés chez les patients HTAP et chez les témoins. Chez les sujets HTAP, il a été démontré que le traitement avec un agoniste de BMPR-2 diminue la survie et augmente l'apoptose des cellules endothéliales et des PEC, alors que l'effet inverse a été observé chez les contrôles (Teichert-Kuliszewska et al. 2006). Dans une autre étude, les PEC des patients HTAP avec une mutation de *BMPR-2*, présentaient un phénotype hyperprolifératif et étaient incapables de former un réseau vasculaire après mise en culture (Toshner et al. 2009). En tenant compte de la mutation de *BMPR-2* dans l'HTAP on peut supposer que la voie de signalisation de *BMPR-2* contribue à

l'atteinte microvasculaire initiale et au remodelage artériel consécutif. En plus, la formation de nouveaux vaisseaux par ces PEC incompetents pourrait avoir un effet délétère sur la circulation pulmonaire.

La question qui se pose est comment est-ce que l'augmentation des précurseurs circulants et recrutés affecte la fonction des cellules résidentes et contribue au remodelage d'une manière générale. L'une des possibilités est la fusion cellulaire, une propriété connue pour les cellules souches et décrite dans des paragraphes précédents. La fusion cellulaire peut aboutir à des changements génétiques qui vont privilégier la prolifération, l'instabilité des microsatellites, les mutations ponctuelles et la perte d'hétérozygotie (Yeager et al. 2001). Le résultat de ces changements - les mutations et l'hyperméthylation - pourrait expliquer en partie la présence de cellules résistantes à l'apoptose. Les auteurs ont ensuite étudié la ploïdie des cellules constituant les lésions vasculaires, mais aucune amplification de contenu chromosomique n'a été détectée. Cela signifie que l'instabilité génétique et l'hyperprolifération des cellules au sein des lésions n'est pas le résultat d'aneuploïdie.

Malgré tous ces exemples il est difficile aujourd'hui de définir de manière non équivoque le rôle des PEC dans les HTAPI ou dans les HTAP associées à une autre pathologie, probablement à cause des approches ou encore des différents stades de développement de la maladie. La contribution des progéniteurs au remodelage vasculaire mérite d'être mieux comprise, afin de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques qui visent au delà du simple contrôle du tonus vasculaire.

Tableau 7 – Les cellules souches et les progéniteurs dans l’HTAP humaine.

Marqueurs	Pathologie	Localisation	Altération	Valeur de P	Cellules produites	Références
CD34+CD133+	HTAPI	Sang	Augmentés	**	CE	(Asosingh et al. 2008)
CD133+	BPCO	Poumon	Augmentés	*	-	(Peinado et al. 2006)
CD34+CD133+KDR+	HTAP thromboembolique	Tissus endartériectomisés	Augmentés	-	CE CML-« like »	(Yao et al. 2009)
CD44+CD73+CD90+ CD166+CD34-CD45-	HTAP thromboembolique	Tissus endartériectomisés	Augmentés	-	Adipocytes Cellules ostéogéniques	(Firth et al. 2010)
CD133+	HTAPI	Poumon	Augmentés	***	-	(Majka et al. 2008)
CD133+	HTAPH	Lésions plexiformes	Augmentés	***	CE	
CD34+CD133+KDR+	HTAPI/H	Sang	Augmentés	*	CE	(Toshner et al. 2009)
CD34+CD133+KDR-	HTAPI/H	Sang	NS	NS	CE	
CD34+	HTAPI	Sang	Augmentés	*	CE	(Smadja et al. 2011)
CD34+KDR+ et CD34+CD133+KDR+	HTAPI	Sang	Diminués	*	CE	(Diller et al. 2008)
CD34+KDR+	HTAPI	Sang	Diminués	*	-	(Fadini et al. 2007)
CD133+KDR+ CD34+CD133+KDR+	HTAPI	Sang	Diminués	*	CE	(Huertas et al. 2010)
CD34+KDR+	BPCO	Sang	Diminués	*	CE	
CD133+KDR+	HTAPI	Sang	Diminués	**	-	(Junhui et al. 2008)

5 Les progéniteurs et la thérapie

5.1 Progéniteurs dans les modèles animaux

Afin de mieux comprendre le rôle des PEC dans l'HTAP, intéressons-nous maintenant à l'application des PEC dans des essais thérapeutiques réalisés dans des modèles animaux. Dans le modèle de l'HTAP induite par l'hypoxie, la tentative de diminuer le remodelage vasculaire et les changements de l'hémodynamique à l'aide des cellules Sca1+KDR+CXCR4+ a échoué (Marsboom et al. 2008). Cependant, Raoul *et al* ont parvenus à prévenir l'HTAP induite par la monocrotaline avec un protocole similaire (Raoul et al. 2007). De même, Zhao *et al* ont montré que cette stratégie est efficace non seulement en prévention mais aussi en traitement de l'HTAP installée induite par la monocrotaline (Zhao et al. 2005).

Le phénotype exact des cellules utilisées pour traiter l'HTAP n'est pas encore clairement défini. Les CSM sont capables elles aussi d'atténuer l'HTAP induite par la monocrotaline ainsi que d'améliorer la fonction endothéliales pulmonaire (Baber et al. 2007). Bien que les CSM soient capables d'acquérir le phénotype des cellules endothéliales ou des cellules musculaires lisses, elles ne sont pas capables de s'intégrer elles-mêmes dans la vasculature pulmonaire ce qui étaye l'hypothèse d'une action paracrine (Patel et al. 2007). Une autre preuve de l'action paracrine des CSM a été rapportée par Liang *et al*, qui ont montré l'efficacité du traitement préventif et curatif de l'HTAP induite par l'hypoxie avec les CSM. Il a été également montré que les CSM injectées en intra-trachéale modulaient la balance immunitaire vers un état anti-inflammatoire même sous hypoxie chronique (Liang et al. 2010). Cette hypothèse paracrine a été également renforcée par d'autres études qui montrent que les PEC transfectées pour produire un vasodilatateur, adrénomédulline sont plus efficaces, comparées aux PEC non-transfectées, dans le traitement de HTAP induite par la monocrotaline (Nagaya et al. 2003).

Nous avons vu que dans certains cas, l'administration des CSM est efficace dans deux modèles animaux d'HTAP (hypoxie chronique et intoxication à la monocrotaline), mais aussi dans d'autres modèles de pathologies pulmonaires comme le modèle murin de dysplasie broncho-pulmonaire, que nous ne détaillons pas ici.

L'effet bénéfique des CSM semble essentiellement résulter d'une action paracrine. Néanmoins, l'administration des PCE est efficace quand l'HTAP est due à une atteinte endothéliale associée à une forte inflammation (monocrotaline), et inefficace quand l'HTAP est provoquée par un stimulus vasoconstricteur (hypoxie chronique). Ces deux modèles ne résumant que très partiellement les processus physiopathologiques à l'œuvre dans l'HTAP humaine, le résultat attendu chez les patients reste imprévisible.

5.2 Progéniteurs dans des études cliniques

Ces 5 dernières années, de nombreux protocoles utilisant les PEC pour traiter des syndromes cardiovasculaires ischémiques chroniques et aigus avec pour but de restaurer le flux sanguin et de diminuer l'atteinte tissulaire et fonctionnelle de différents organes, ont été validés. Malgré les résultats hétérogènes obtenus au cours des expériences sur les animaux (Dimmeler et al. 2009), l'analyse globale montre un effet bénéfique de la thérapie cellulaire chez les patients atteints de l'infarctus du myocarde ou de maladies des artères périphériques (Lipinski et al. 2007; Fadini et al. 2009). Ces résultats ont encouragé le développement de la thérapie cellulaire chez les patients atteints d'HTAP (Clavel et al. 2008).

La première étude humaine a été enregistrée en Chine. Il s'agit d'une étude randomisée dans laquelle 31 patients HTAP bénéficiant de thérapies conventionnelles, ont été transplantés avec les PEC cultivés *ex vivo*. L'effet a été comparé avec les témoins qui ont eu la thérapie conventionnelle seule. Les auteurs ont montré une amélioration de la tolérance à l'effort, ainsi que des paramètres hémodynamiques chez les patients ayant eu les PEC. Presque simultanément, une étude non randomisée a montré que la transplantation des PEC a été associée à une amélioration significative de la capacité d'exercice, de la classe NYHA (*New York Heart Association*) et de l'hémodynamique pulmonaire chez des enfants atteints d'HTAPI (Zhu et al. 2008). Il faut tenir compte que ces deux études proviennent du même groupe et doivent encore être confirmées et reproduites par ailleurs. Dans la base de données des études cliniques disponibles sur ClinicalTrials.gov, deux essais en cours conduits au Canada (NCT00469027) et en Chine (NCT00372346), sont mentionnés, utilisant des PEC chez les patients HTAP, et

dont les résultats seront connus au cours des années à venir. Cependant, les études précoces ont montré des résultats encourageants d'après leurs auteurs, mais il reste beaucoup de questions sans réponse. Les données actuelles sont ainsi incomplètes en ce qui concerne la meilleure source des cellules (la moelle osseuse ou le sang périphérique) et le type de cellules le plus approprié (les PEC, les progéniteurs hématopoïétiques ou les progéniteurs mésenchymateux). Nous n'avons toujours pas de réponse quand à l'effet bénéfique de la thérapie cellulaire chez les patients atteints d'HTAP secondaire en plus des patients HTAPI, et à quel moment de la progression de la maladie le traitement est le plus efficace.

En dehors de la thérapie cellulaire il existe d'autres moyens pour améliorer le taux et la fonction des PEC endogènes. De nombreux médicaments ayant un effet cardiovasculaire pléiotrope se sont montrés capables d'augmenter le niveau des PEC circulantes grâce à leur mobilisation à partir de la moelle ou à une augmentation de leur survie, ainsi que d'améliorer leurs fonctions (Fadini et al. 2007). Ainsi, les statines (l'inhibiteur de hydroxyl-méthyl-glutaryl-CoA) sont capables de stimuler la mobilisation des PEC, leur survie et leur recrutement vers les sites lésionnels principalement par un mécanisme dépendant de l'eNOS (Dimmeler et al. 2001; Aicher et al. 2003). Les statines ont un effet bénéfique sur les HTAP expérimentales (Sun et al. 2008; Rhodes et al. 2009), même s'il n'y a pas de démonstration directe que cet effet soit le résultat de la stimulation des PEC. Un autre médicament – le sildénafil (inhibiteur de la phosphodiesterase de type 5), utilisé dans le traitement de l'HTAP, pourrait mobiliser les PEC dans le sang circulant (Foresta et al. 2009). Par conséquent, les patients HTAPI traités avec sildénafil auraient un taux de PEC supérieur à ceux qui n'ont pas eu ce type de traitement (Diller et al. 2008). Cela suggère que l'effet positif reconnu de ce médicament sur l'HTAP humaine pourrait en partie passer par une stimulation des PEC.

Le rôle des PEC dans la physiopathologie de l'HTAP est illustré sur la figure 7 (Fadini et al. 2010).

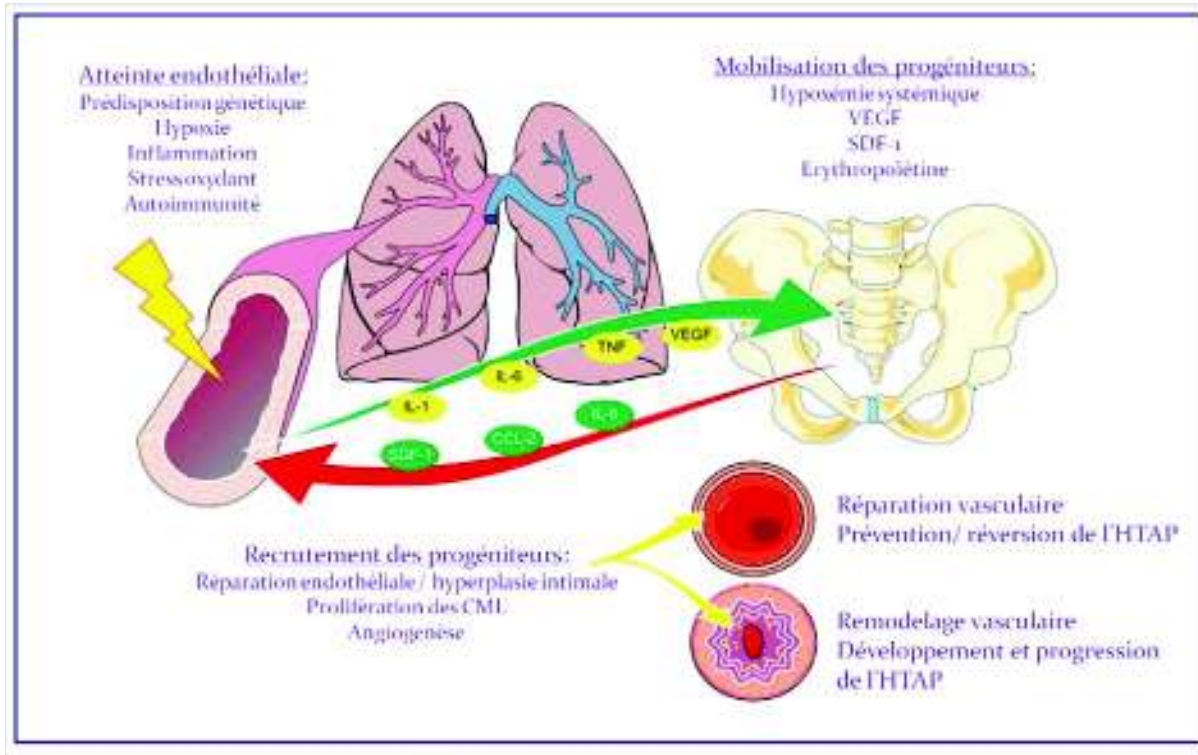


Figure 7 – Le rôle des progéniteurs endothéliaux dans la physiopathologie de l’HTAP. Sous l’influence des signaux de stress, les progéniteurs endothéliaux mobilisés à partir de la moelle osseuse participent à la fois à la réparation de l’endothélium et mais aussi au remodelage vasculaire. (D’après Fadini 2010)

5.3 Conclusion

Dans ce chapitre de thèse nous avons fait un point sur l’implication des cellules souches et des progéniteurs dans la physiopathologie d’HTAP idiopathique et associée à des pathologies. Nous avons détaillé également comment des déséquilibres de l’homéostasie endothéliale et de l’angiogenèse, qui sont liés à la biologie des PEC, pourraient intervenir dans la pathogénèse de l’HTAP. Tandis que les observations effectuées chez l’homme et chez l’animal ne permettent pas de conclure quant au rôle positif ou négatif des PEC endogènes dans l’HTAP (Figure 7), les stratégies utilisant les PEC obtenus *ex vivo*, montrent un effet apparemment bénéfique de ces cellules dans le contrôle du développement et de la progression de la maladie. D’autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes responsables des améliorations hémodynamiques pulmonaires obtenues par les traitements utilisant les PEC.

Néanmoins les PEC restent un objet d'étude fascinant pour comprendre la physiopathologie de l'HTAP, mettre au point des biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques, ainsi que pour développer de nouvelles thérapies chez les malades souffrant d'HTAP.

III LES CHIMIOKINES ET LEURS RECEPTEURS

1 Caractéristiques des chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines doivent leur nom à leur capacité à induire le chimiotactisme et à leur appartenance à la famille des cytokines. On en compte actuellement une cinquantaine chez l'homme, qui ont été clonées et caractérisées (Zlotnik et al. 2000). Ces molécules agissent sur des cellules cibles par fixation à des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G. La réponse principale de ces cellules à cette fixation est le chimiotactisme qui se définit comme une migration cellulaire dirigée, dépendante d'un gradient de chimiokines. Cependant, les chimiokines et leurs récepteurs participent également à d'autres événements biologiques comme l'angiogenèse, la dégranulation, l'apoptose et la prolifération cellulaire.

2 Classification et nomenclature

2.1 Les chimiokines

La découverte rapide de nombreuses chimiokines a eu pour conséquence la description d'une même molécule sous différents noms par plusieurs groupes, créant ainsi une confusion des termes. C'est pourquoi, il a récemment été défini une nouvelle classification des chimiokines. Elles ont été divisées en 4 sous-familles sur la base du nombre et de l'espacement de cystéines conservées au niveau de leur région aminoterminal (Figure 8). Les 2 principales sous-familles de chimiokines sont les CXC (ou α -chimiokines) et les CC (ou β -chimiokines). Les 2 premiers résidus cystéines des CXC chimiokines sont séparés par un seul acide aminé et ceux des CC chimiokines sont adjacents. Les CXC chimiokines comptent 21 membres, et les CC chimiokines 29. Une autre sous-famille, composée de 2 membres, a été décrite. XCL₁, ou lymphotactine- α , et XCL₂, ou lymphotactine- β , sont les 2 C chimiokines (γ -chimiokine), elles ont la particularité de ne posséder que 2 cystéines (Kelner et al. 1994). CX₃CL₁ (fractalkine)

est l'unique CX₃C chimiokine (ou δ-chimiokine), dont 3 acides aminés séparent les 2 premières cystéines (Kelner et al. 1994; Zlotnik et al. 2000).

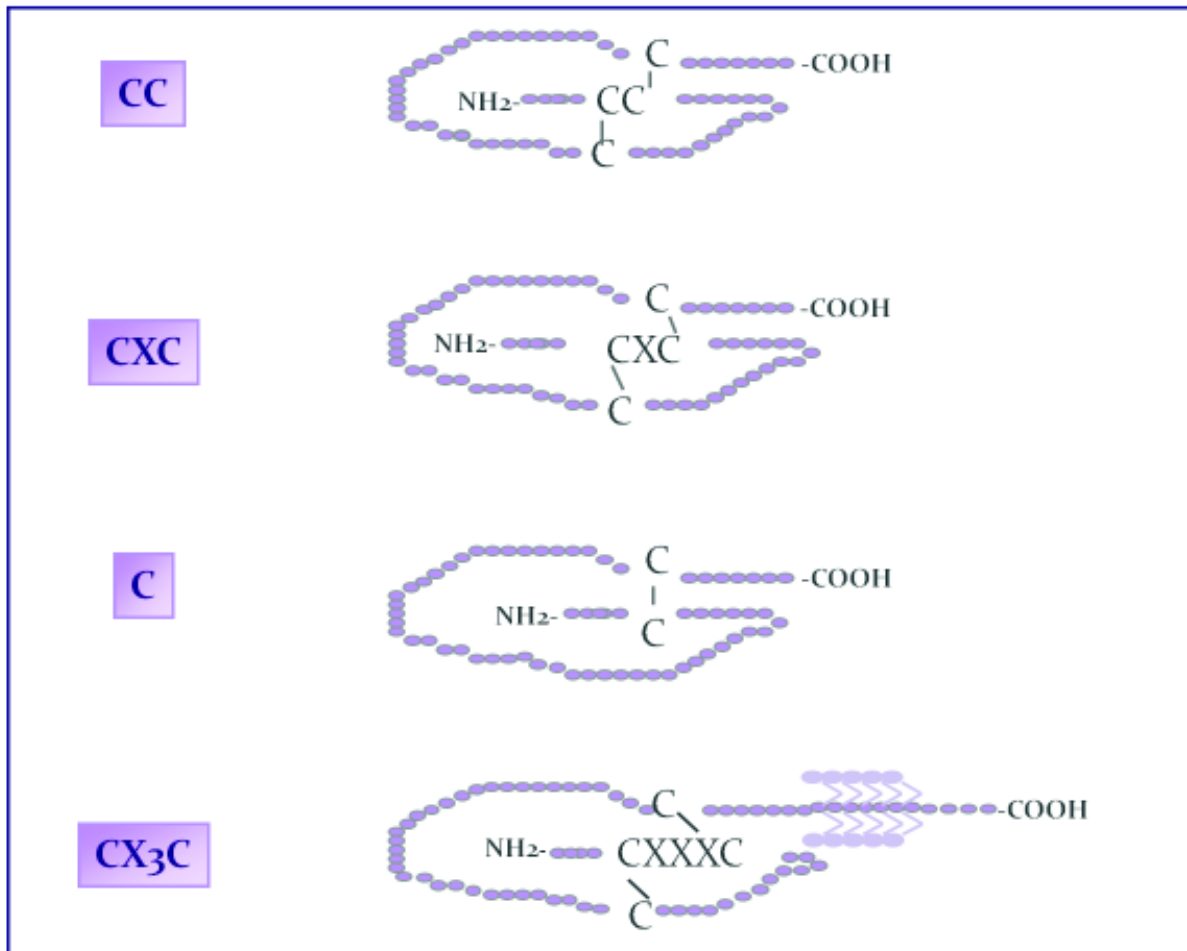


Figure 8 - Les 4 sous-familles de chimiokines. Les chimiokines ont été divisées en 4 sous-familles sur la base du nombre et de l'espacement des cystéines conservées au niveau de leur région amino-terminale.

2.2 Les récepteurs aux chimiokines

Les récepteurs aux chimiokines sont classés en fonction de la sous-famille à laquelle appartiennent les chimiokines qu'ils lient. On distingue ainsi les CCRs (12 membres), les CXCRs (7 membres), le XCR et le CX₃CR (Figure 9).

Il existe également 3 autres récepteurs aux chimiokines, « duffy antigen receptor for chemokines » (DARC), D6 et CCX-CKR, appelés « récepteurs leurres » car ils lient

leurs ligands avec de hautes affinités et spécificités mais sont incapables d'induire un signal intracellulaire en aval (Comerford et al. 2005). DARC peut lier de nombreuses CC et CXC chimiokines (Szabo et al. 1995), mais sert également de récepteur érythrocytaire pour le parasite Plasmodium vivax (Horuk et al. 1993). D6 lie principalement les chimiokines inflammatoires alors que CCX-CKR fixe plutôt les chimiokines constitutives (Comerford et al. 2005).

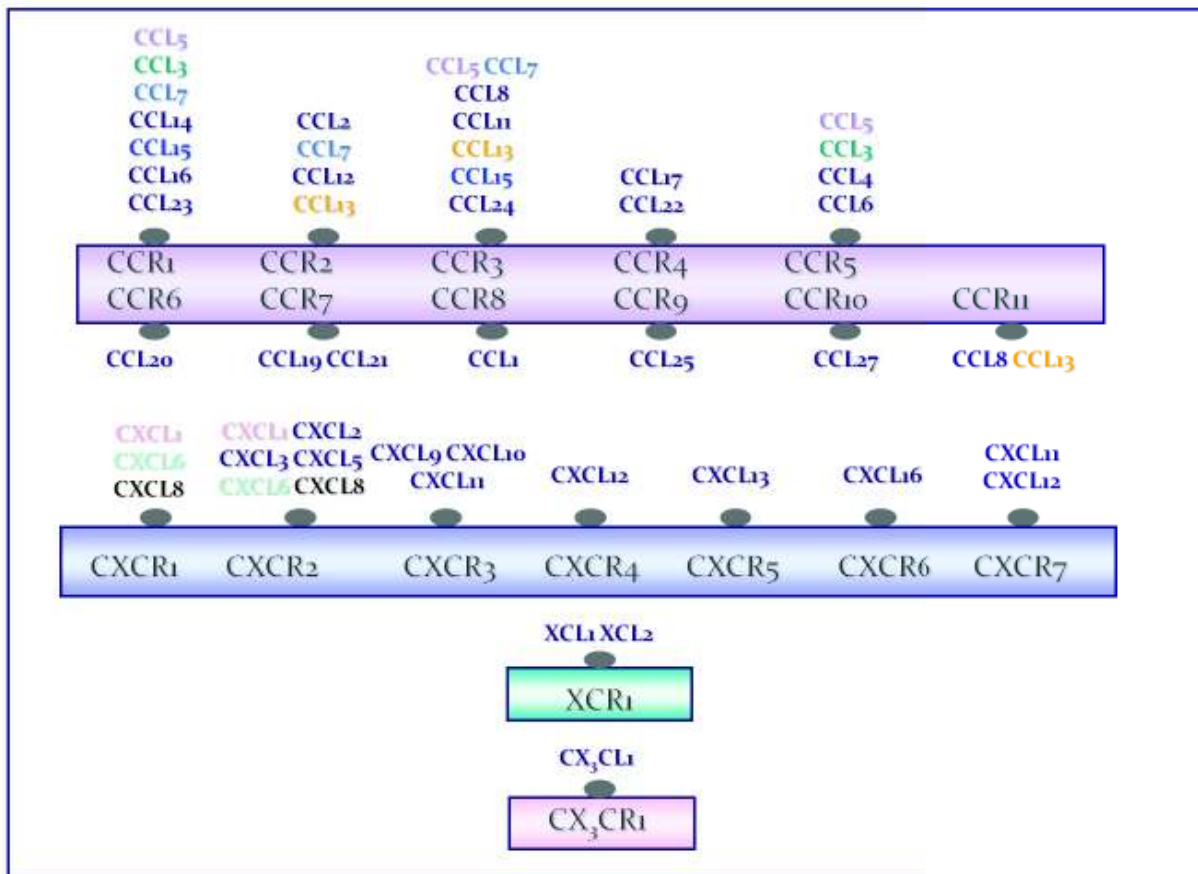


Figure 9 - Les 4 sous-familles de récepteurs aux chimiokines. Ils sont classés en fonction de la sous-famille à laquelle appartiennent les chimiokines qu'ils lient. On distingue les CCRs, les CXCRs, le XCR et le CX₃CR.

2.3 Les chimiokines et récepteurs aux chimiokines viraux

Les virus ont développé de nombreux mécanismes d'échappement afin d'éviter d'être détectés et détruits par le système immunitaire de l'hôte qu'ils infectent. Certains codent notamment dans leur génome des chimiokines, soit agonistes qui leur

permettent d'exploiter le système immunitaire pour faciliter leur dissémination, soit antagonistes permettant alors de bloquer l'action des récepteurs aux chimiokines de l'hôte (Alcami 2003). Par exemple, le virus de l'herpès HHV8 responsable du sarcome de Kaposi code pour 3 CC chimiokines, vMIP-I, vMIP-III et vMIP-II, les 2 premières étant des agonistes et la dernière un antagoniste d'un large spectre de récepteurs aux chimiokines (Garton et al. 2001).

Certains virus possèdent également des gènes codant pour des récepteurs aux chimiokines. Par exemple, le génome du cytomégalovirus humain contient un gène codant la protéine US28 capable de lier plusieurs CC chimiokines humaines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) ainsi que la chimiokine CX₃CL1 (Garton et al. 2001).

3 Structure protéique

3.1 Structure des chimiokines

Les chimiokines sont de petites protéines basiques de 70 à 130 acides aminés (soit 8 à 14kDa). Il existe 20 à 30% d'homologie protéique entre les 4 sous-familles. Mais celle-ci augmente fortement entre les chimiokines d'une même sous-famille allant jusqu'à 70% pour les CC et 90% pour les CXC.

Les structures tridimensionnelles de plusieurs chimiokines ont été déterminées par cristallographie aux rayons X et par résonance magnétique nucléaire. Grâce à la relative conservation de leur composition en acides aminés, les CC et CXC chimiokines présentent de fortes similarités au niveau de leurs structures secondaire et tertiaire.

Les chimiokines se composent d'une partie N-terminale, précédant la première cystéine, flexible et non structurée. Puis suivent, après les 2 premières cystéines, une boucle rigide d'environ 10 résidus, 3 ou 4 feuillets β anti-parallèles et une hélice α C-terminale (Figure 10). La portion N-terminale flexible et la boucle rigide sont les 2 sites majeurs d'interaction des chimiokines avec leurs récepteurs (Onuffer et al. 2002). Les 4 cystéines conservées, sur lesquelles se basent la classification des chimiokines, forment

des ponts disulfures (entre la première et la troisième ainsi qu'entre la deuxième et la quatrième) qui stabilisent la structure de la molécule.

C'est sous la forme de monomères que la plupart des chimiokines ont une activité biologique *in vitro* (Paolini et al. 1994). Cependant, les chimiokines sont capables de s'oligomériser formant une variété de structures pouvant avoir un rôle fonctionnel *in vivo* (Proudfoot et al. 2003). A forte concentration, les chimiokines ont une tendance à l'oligomérisation. Par exemple, les chimiokines, produites par les cellules endothéliales, se fixent aux glycosaminoglycanes (GAGs) de la matrice extracellulaire par des interactions ioniques. Les GAGs concentrent alors les chimiokines de façon locale et les présentent sous forme d'oligomères (Hoogewerf et al. 1997). La fixation des chimiokines aux GAGs et leur oligomérisation seraient nécessaires pour l'activité chimiotactique de certaines chimiokines comme CCL2 ou CCL5 (Proudfoot et al. 2003).

A l'exception d'une forme de CCL27 qui est transloquée au noyau, les chimiokines sont produites avec un peptide signal permettant leur transport dans la machinerie de sécrétion des cellules les produisant (Gortz et al. 2002). Cependant, toutes les chimiokines ne sont pas libérées dans le milieu extracellulaire sous forme soluble. En effet, les chimiokines CX₃CL1 et CXCL16 sont produites sous forme de protéines membranaires, elles sont composées d'un domaine chimiokine, d'un tronc mucine, d'un segment transmembranaire et d'une partie intracellulaire (Frederick et al. 2001) (Figure 11). Sous cette forme, elles agissent comme molécule d'adhésion cellulaire permettant l'adhérence des cellules les exprimant avec celles portant leur récepteur. Cependant après clivage protéolytique par les protéases de la famille ADAM (« a disintegrin and metalloprotéinase »), ces chimiokines peuvent être aussi libérées sous forme soluble (Garton et al. 2001; Gough et al. 2004).

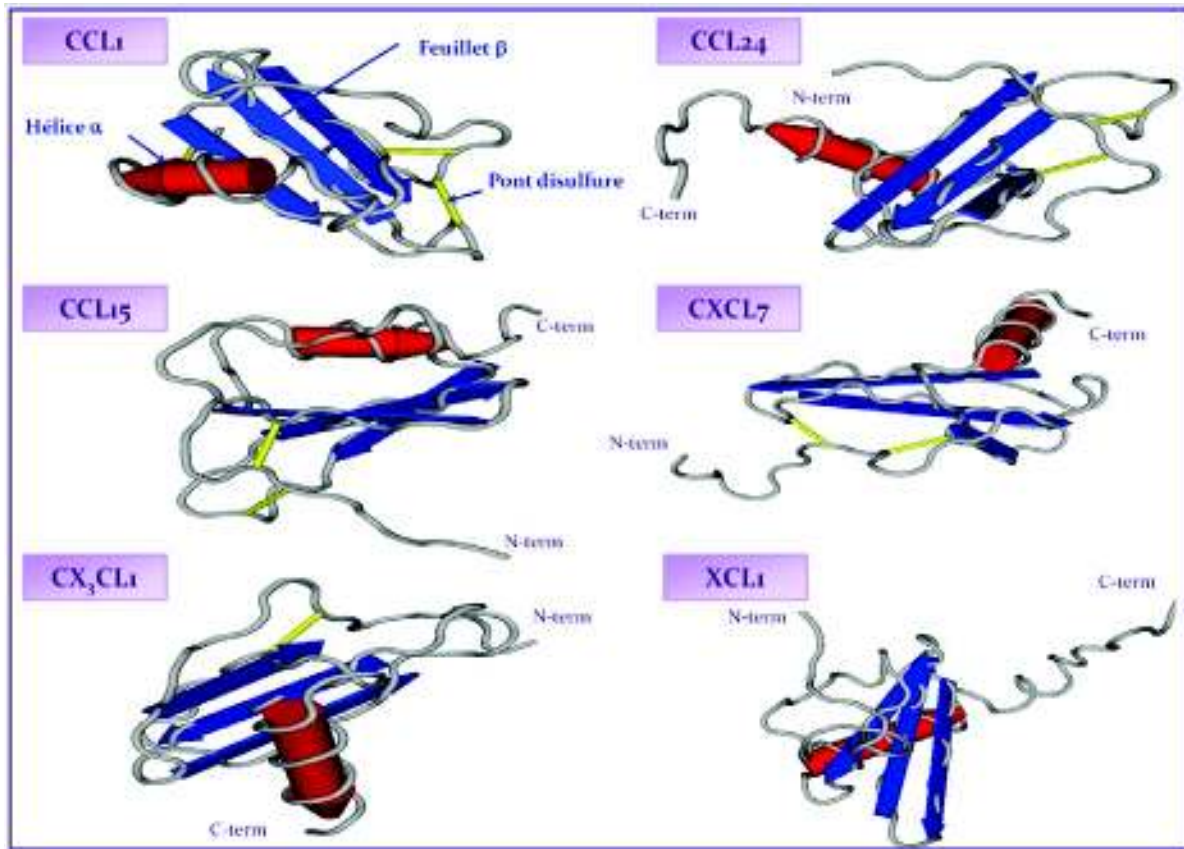


Figure 10 - Structure tridimensionnelle des chimiokines humaines.

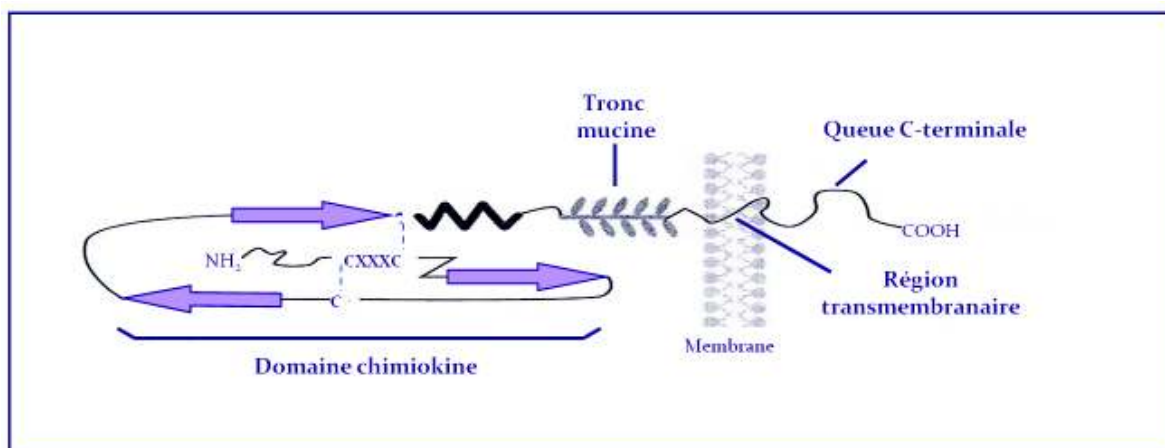


Figure 11 - Représentation schématique de la forme membranaire de CX₃CL1.

Cette chimiokine est, sous forme membranaire, composée de 4 domaines : un domaine chimiokine, un tronc mucine (site de glycosylation), un segment transmembranaire et une partie intracellulaire. Avec CXCL16, ce sont les deux seules chimiokines possédant une forme membranaire. (D'après Frederick et Clayman 2001)

3.2 Structure des récepteurs aux chimiokines

Les récepteurs aux chimiokines sont des protéines de 320 à 380 acides aminés. Ils appartiennent à la classe A des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G, et présentent une forte homologie avec le récepteur de la rhodopsine. Ces protéines sont composées de 7 passages transmembranaires (TM 1-7) organisés en hélices α , de 3 boucles hydrophiles extracellulaires (ECL 1-3), de 3 boucles intracytoplasmiques (ICL 1-3), d'un petit domaine N terminal extracellulaire (environ 40 acides aminés) et d'une queue carboxy-terminale intracellulaire (Figure 12). Des ponts disulfures sont présents entre les boucles EC 1 et EC 2 ainsi qu'au niveau de la queue amino-terminale et de la boucle EC 3. Comme les autres récepteurs de classe A, les récepteurs aux chimiokines possèdent un motif DRY (Asp-Arg-Tyr), au niveau d'ICL 2, impliqué notamment dans la liaison de la protéine G (Murphy et al. 1997). L'extrémité C terminale contient des résidus sérine et thréonine, dont la phosphorylation est impliquée dans la signalisation et dans la désensibilisation du récepteur (Monteclaro et al. 1997; Mueller et al. 1997). Les analyses de séquences de tous les récepteurs aux chimiokines montrent l'existence d'un haut degré d'homologie au niveau des régions transmembranaires mais de grandes variations au niveau des domaines extramembranaires.

Au contraire des chimiokines, aucune structure tridimensionnelle de récepteurs aux chimiokines n'a été réalisée, ce qui est principalement dû aux difficultés rencontrées pour cristalliser des protéines membranaires. Cependant par extrapolation de la structure tridimensionnelle de la rhodopsine (Palczewski et al. 2000), on peut penser que les récepteurs aux chimiokines forment un tonnelet possédant une cavité centrale profonde de 15Å (Paterlini 2002). Les domaines TM 2, 3, 5, 6 et 7 seraient à l'intérieur tandis que les domaines TM 1 et 4 plutôt à l'extérieur de la molécule (Ji et al. 1998). Cette organisation pourrait s'expliquer par le fait que les domaines TM 1 et 4 sont plus hydrophobes que les 2, 3, 5 et 6.

Seuls quelques récepteurs aux chimiokines ont été étudiés pour leur capacité à s'oligomériser. Certains récepteurs, tels que CCR2, CCR5 et CXCR4, sont retrouvés sous forme d'homodimères, et pourraient former des hétérodimères mais cela est plus

controversé (Mellado et al. 1999; Mellado et al. 2001; Issafras et al. 2002). CCR2 serait capable d'homodimérisation seulement en présence de son ligand CCL2 (Rodriguez-Frade et al. 1999), alors que CCR5 et CXCR4 peuvent former des homo-oligomères en absence de leurs ligands (Issafras et al. 2002; Babcock et al. 2003). Le rôle de ces oligomères n'est pas vraiment défini, il existe différentes hypothèses dont une meilleure sensibilité au ligand ou une absence d'internalisation et de désensibilisation (Rodriguez-Frade et al. 2001).

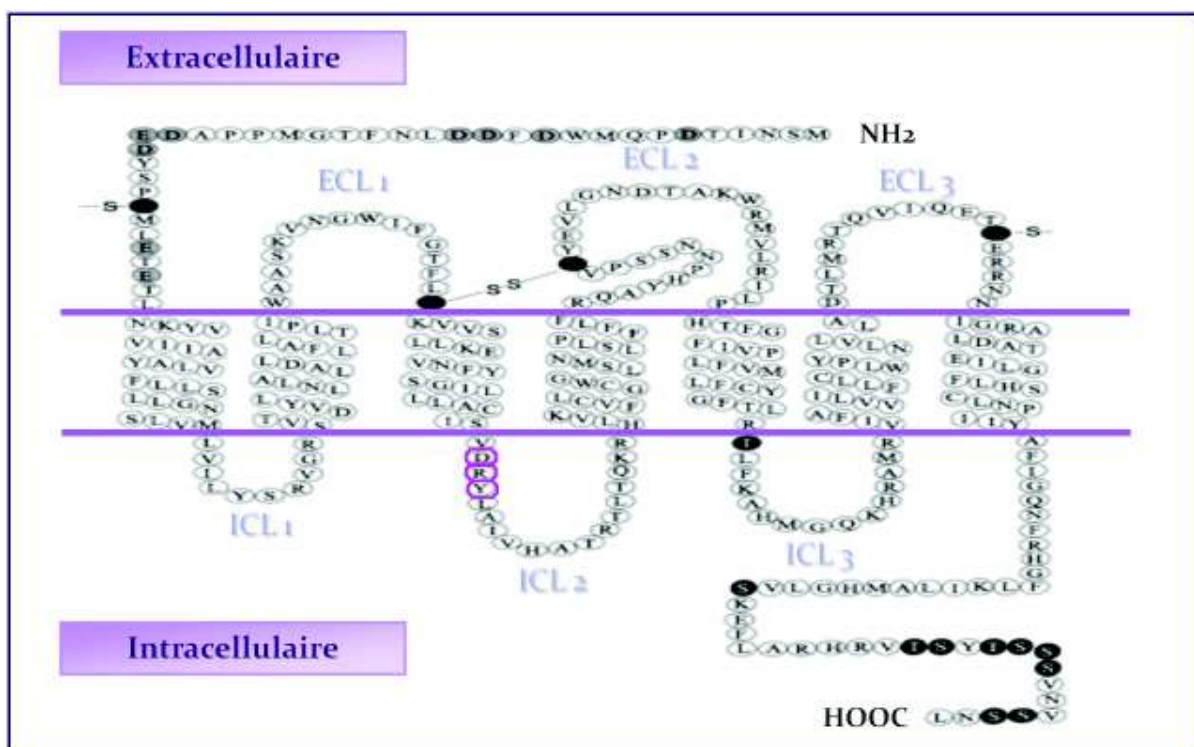


Figure 12 - Représentation schématique d'un récepteur aux chimiokines. Il est composé de 7 segments transmembranaires (TM 1-7), de 3 boucles extracellulaires (ECL 1-3), de 3 boucles cytoplasmiques (ICL 1-3), d'un domaine N terminal extracellulaire et d'une queue carboxy-terminale intracellulaire. Des ponts disulfures sont présents entre les boucles EC 1 et EC 2 ainsi qu'au niveau de la queue amino-terminale et de la boucle EC 3.

4 Fixation des chimiokines sur leurs récepteurs et conséquences

Les chimiokines se lient à leurs récepteurs avec une affinité de l'ordre du nanomolaire mais cela varie selon le couple ligand/récepteur et selon le type cellulaire exprimant le récepteur. Une même chimiokine peut être très affine pour un récepteur et faiblement pour un autre. Historiquement, la caractérisation des spécificités entre les récepteurs aux chimiokines et leurs ligands était basée sur l'activité agoniste des chimiokines. Mais récemment, il a été montré que certaines chimiokines peuvent avoir également une activité antagoniste (Loetscher et al. 2001). Par exemple, CCL11 est agoniste pour les récepteurs CCR3 et CCR5, et antagoniste pour CCR2 (Ogilvie et al. 2001).

4.1 Spécificité d'interaction

Le système des chimiokines et de leurs récepteurs est dit redondant de par la capacité d'une chimiokine donnée à lier plusieurs récepteurs et la faculté des récepteurs à répondre à plusieurs chimiokines (Figure 13). Ainsi, CCR1 peut lier, entre autres, CCL3, CCL5 et CCL8 avec une haute affinité (Neote et al. 1993). De même, CCL3 se fixe aux récepteurs CCR1 et CCR5 (Luster 1998). Ce n'est cependant pas le cas de toutes les chimiokines et de tous les récepteurs. Par exemple, CX₃CL1 ne se fixe qu'au récepteur CX₃CR1 et est son seul ligand. De plus, chaque récepteur aux chimiokines ne peut lier, en principe, qu'une classe de chimiokines. Cependant, on peut noter 2 exceptions. Premièrement, les récepteurs leurres DARC et D6 sont connus comme étant capables de lier à la fois des CC et des CXC chimiokines avec des affinités identiques (Horuk et al. 1993; Comerford et al. 2005). Deuxièmement, les 3 ligands de CXCR3, qui sont CXCL9, CXCL10 et CXCL11, ont également des propriétés d'antagonistes vis-à-vis du récepteur CCR3 (Figure 13) (Loetscher et al. 2001).

Cette redondance permettrait d'augmenter l'efficacité du recrutement cellulaire lors des processus inflammatoires. Elle explique pourquoi l'absence ou la non-fonctionnalité d'une chimiokine ou d'un récepteur n'entraîne pas nécessairement des anomalies majeures. Seule l'absence de CXCR4 et de CXCR7 ou de son ligand CXCL12 est létale (Nagasawa et al. 1996; Tachibana et al. 1998; Sierro et al. 2007).

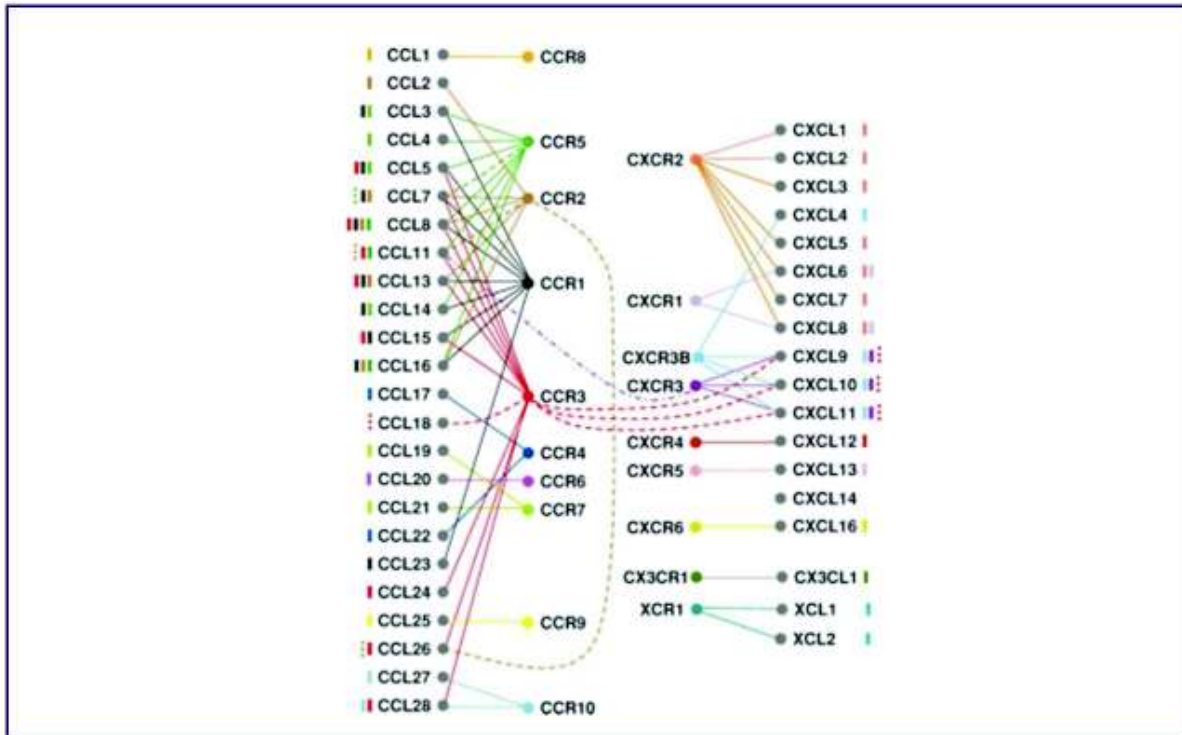


Figure 13 - Les chimiokines humaines et leurs récepteurs. Les lignes continues et pointillées connectent les récepteurs avec, respectivement, leurs agonistes et leurs antagonistes. Chaque couleur correspond à un récepteur et les barres situées à côté de chaque chimiokine sont de la couleur attribuée aux récepteurs qu'elles lient. (D'après Rot et von Andrian 2004)

4.2 Le modèle d'interaction à 2 étapes

Ce modèle d'interaction ligand/récepteur à 2 étapes vient de l'étude du peptide chimioattractant C5a (de même taille qu'une chimiokine) et de son récepteur (Siciliano et al. 1994). Dans ce modèle, le ligand reconnaît d'abord la partie amino-terminale du récepteur, celui-ci change alors de conformation (Figure 14) (Monteclaro et al. 1997). Puis la chimiokine interagit de façon plus spécifique avec les boucles extracellulaires alors accessibles. Les résidus chargés de ces boucles participent à l'activation du récepteur et à l'initiation de la transduction du signal (Zoffmann et al. 2002). Les 2 sites d'interaction des chimiokines sont courts (quelques acides aminés) et proches grâce à la présence des 2 ponts disulfures hautement conservés.

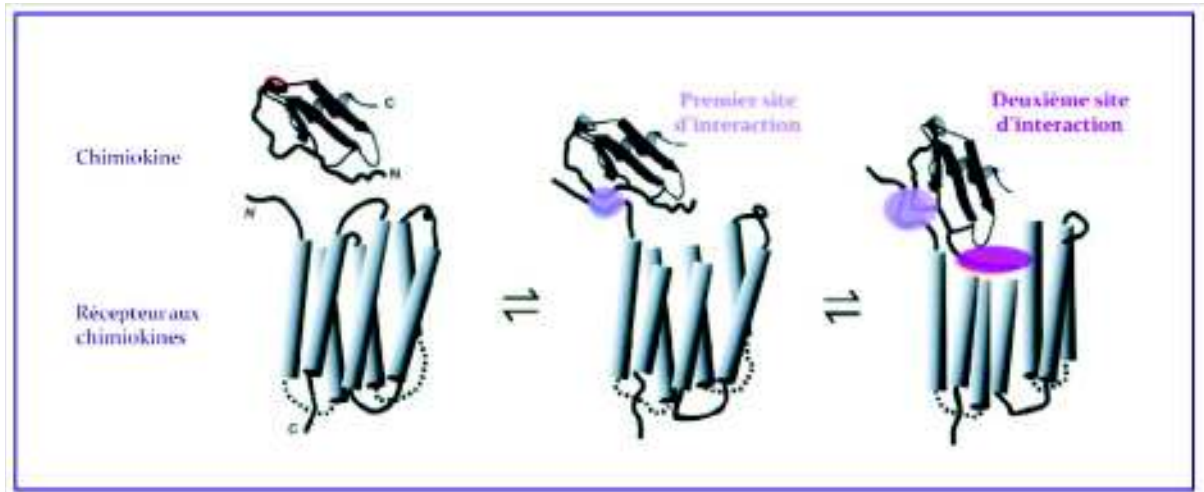


Figure 14 - Modèle d'interaction « chimiokine et récepteur aux chimiokines » en 2 étapes. Le ligand reconnaît d'abord la partie amino-terminale du récepteur, puis interagit de façon plus spécifique avec les boucles extracellulaires. (D'après Crump 1997)

5 Transduction du signal

La fixation d'une chimiokine sur son récepteur déclenche une cascade d'évènements intracellulaires aboutissant à différents effets biologiques. Cette première étape d'interaction du ligand avec son récepteur induit un changement conformationnel permettant la dissociation, et ainsi l'activation, de la protéine G hétérotrimérique associée au récepteur. La cascade de signalisation alors induite dépend de la nature de la protéine G et des effecteurs activés. Les récepteurs aux chimiokines sont principalement associés à des protéines G de type i, qui sont sensibles à la toxine de *Bordetella pertussis* (Baggiolini et al. 1997). La voie de signalisation passe par l'activation de la protéine kinase C (PKC) et d'autres protéines sensibles au calcium, qui catalysent la phosphorylation de protéines comme les MAPKs (Mitogen-Activated Protein Kinases). Les 3 principales MAPKs sont les « extracellular signal-regulated kinases 1/2 » (ERK1/2), la « c-jun N-terminal kinase » (JNK) et la protéine p38 ; ces molécules sont d'importants régulateurs du chimiotactisme (Klemke et al. 1997). On sait que la fixation des chimiokines sur leurs récepteurs peut également stimuler la phospholipase D (PLD) et des complexes d'adhésion tels que les « proline-

rich tyrosine kinase 2 » (PYK₂). PYK₂ appartient à la famille des « related adhesion focal tyrosine kinase » (RAFTK), il lie une variété de molécules de signalisation, comme la tyrosine kinase Src. Les sous-unités $\beta\gamma$ associées aux récepteurs de chimiokines activent également la phosphatidylinositol 3-kinase (PI₃K) et son effecteur en aval, la protéine kinase B (PKB) (Ganju et al. 1998).

Les signaux induits par les protéines G conduisent à la polymérisation de l'actine, à la régulation positive de molécules d'adhésion et à l'activation d'autres composants cellulaires permettant la migration cellulaire. Cependant d'autres fonctions leucocytaires, comme la dégranulation ou la prolifération, sont activées par les cascades de signalisation induites par les récepteurs aux chimiokines.

Dans certains cas, la signalisation des récepteurs aux chimiokines pourrait être indépendante des protéines G et conduire au recrutement et à l'activation de la voie « janus kinase-signal transducer and activator of transcription » (JAK-STAT) (Rodriguez-Frade et al. 2001).

6 Internalisation des récepteurs

Après leur activation par les chimiokines, les récepteurs deviennent partiellement ou totalement insensibles à une nouvelle stimulation par un ligand. Ce processus est important notamment dans le maintien de la capacité des cellules à réagir à un gradient de chimiokines. Cette perte de réponse des récepteurs consiste soit en une désensibilisation du récepteur, soit en une internalisation. La désensibilisation est due à des phosphorylations des récepteurs par des GRKs (G-protein-coupled receptor kinases) (Aragay et al. 1998). L'internalisation des récepteurs se fait suite à la liaison du ligand et correspond à un rétrocontrôle négatif exercé par des protéines régulatrices, comme les arrestines ou les cavéoles (Barlic et al. 1999). De la même façon, les récepteurs redeviennent fonctionnels par resensibilisation ou par recyclage à la membrane.

7 Expression des chimiokines et de leurs récepteurs

Les chimiokines peuvent être classées selon leur profil d'expression (Figure 15) (Rossi et al. 2000). Certaines chimiokines sont constitutivement produites et sécrétées au niveau de tissus ou organes et sont donc considérées comme homéostatiques. Elles ont un rôle de régulation de la production et de la distribution normales des leucocytes. Ces chimiokines participent notamment à l'orchestration de la migration des lymphocytes vers les organes lymphoïdes lors de la surveillance immunitaire.

La plupart des chimiokines sont considérées comme inflammatoires et ne sont produites qu'en cas d'inflammation ou d'infection par le tissu lui-même (endothélium vasculaire, épithélium...) ou par les leucocytes infiltrants (macrophages, lymphocytes T...). Leur rôle est ainsi d'induire la migration des leucocytes au niveau du site d'inflammation ou de lésion, et d'activer les cellules immunitaires pour la mise en place d'une réponse immunitaire.

Certaines chimiokines peuvent être à la fois constitutive et inflammatoire. CXCL12, par exemple, est exprimée de façon constitutive dans divers tissus comme la moelle osseuse, mais est également surexprimée dans le poumon après stimulation par des cytokines inflammatoires ou l'hypoxie ou elle peut médier la réaction inflammatoire.

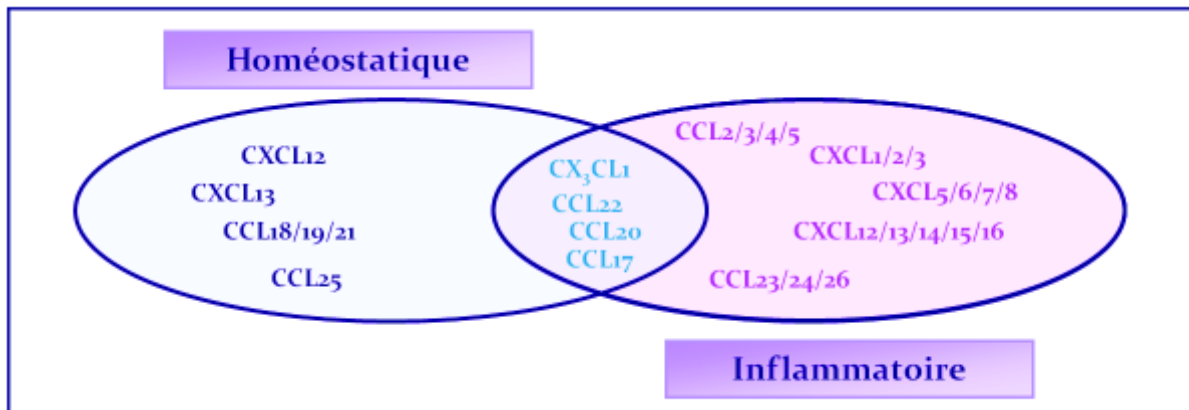


Figure 15 - Classification des chimiokines en fonction de leur profil d'expression. Selon cette classification, il existe 3 types de chimiokines : certaines sont constitutivement produites et sécrétées au niveau de certains tissus ou organes et sont donc homéostatiques, d'autres sont considérées comme inflammatoires et ne sont produites qu'en cas d'inflammation ou d'infection, et enfin certaines chimiokines peuvent être à la fois constitutive et homéostatique. Toutes les chimiokines ne sont pas représentées sur ce schéma.

Les récepteurs aux chimiokines sont principalement exprimés par les leucocytes. Ainsi les CXC chimiokines exercent leur effet chimiotactique surtout sur les neutrophiles et les lymphocytes alors que les CC chimiokines ont un spectre plus large et agissent aussi sur les monocytes, les basophiles et les éosinophiles. La C chimiokine agit principalement sur les lymphocytes T et CX₃CL1 sur les monocytes/macrophages, les lymphocytes T et les cellules NK. Cependant, les récepteurs aux chimiokines sont aussi présents sur d'autres types cellulaires que les leucocytes comme les cellules épithéliales et endothéliales, les cellules musculaires lisses, les neurones et les cellules de la microglie (Rollins 1997; Hesselgesser et al. 1999).

L'expression des récepteurs aux chimiokines au niveau des cellules phagocytaires est assez bien définie. Ainsi, CXCR₁ et CXCR₂ sont exprimés exclusivement par les neutrophiles, qui sont principalement impliqués dans la défense anti-microbienne. Les monocytes, les éosinophiles et les basophiles expriment des récepteurs communs et d'autres qui leur sont propres comme CCR₅ sur les monocytes ou CCR₃ sur les éosinophiles et basophiles. Les lymphocytes expriment eux la quasi-totalité du

répertoire des récepteurs aux chimiokines (Loetscher et al. 2001). Le profil d'expression des récepteurs aux chimiokines d'un lymphocyte peut permettre de définir l'état de maturation et d'activation de celui-ci. Par exemple, les lymphocytes T CD8⁺ mémoires (CD45RA⁻) exprimant CCR7 présentent des caractéristiques de cellules mémoires recirculant vers les organes lymphoïdes secondaires et peuvent stimuler efficacement les cellules dendritiques, elles sont appelées cellules T à mémoire centrale. Par contre, les lymphocytes T CD8⁺ CD45RA⁻ CCR7⁻ ont des propriétés effectrices et un tropisme pour les sites inflammatoires, ce sont des cellules T effectrices mémoires (Sallusto et al. 1999). De même, les cellules dendritiques immatures expriment plutôt CCR1, CCR2 et CCR5 alors que les matures expriment CCR4 et CCR7 ; ces derniers permettant la migration aux organes lymphoïdes secondaires (Sallusto et al. 1999).

8 Implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans la physiologie et la physiopathologie humaine

Les chimiokines, par leur capacité à orchestrer la migration et l'activation des leucocytes et des cellules souches, jouent un rôle majeur dans la physiologie de l'organisme. Cependant, dans certains cas, la production de chimiokines inflammatoires peut être mal contrôlée et ainsi la réponse immunitaire être activée de façon inappropriée et ciblée contre un tissu sain. C'est le cas de toutes les pathologies inflammatoires, telles que les rhumatismes, les lésions athéromateuses, les rejets de greffe, les réactions allergiques ou encore les pathologies auto-immunes. Il a ainsi été montré que les chimiokines et leurs récepteurs peuvent être associées à la sclérose en plaques, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, l'asthme (Figure 16).

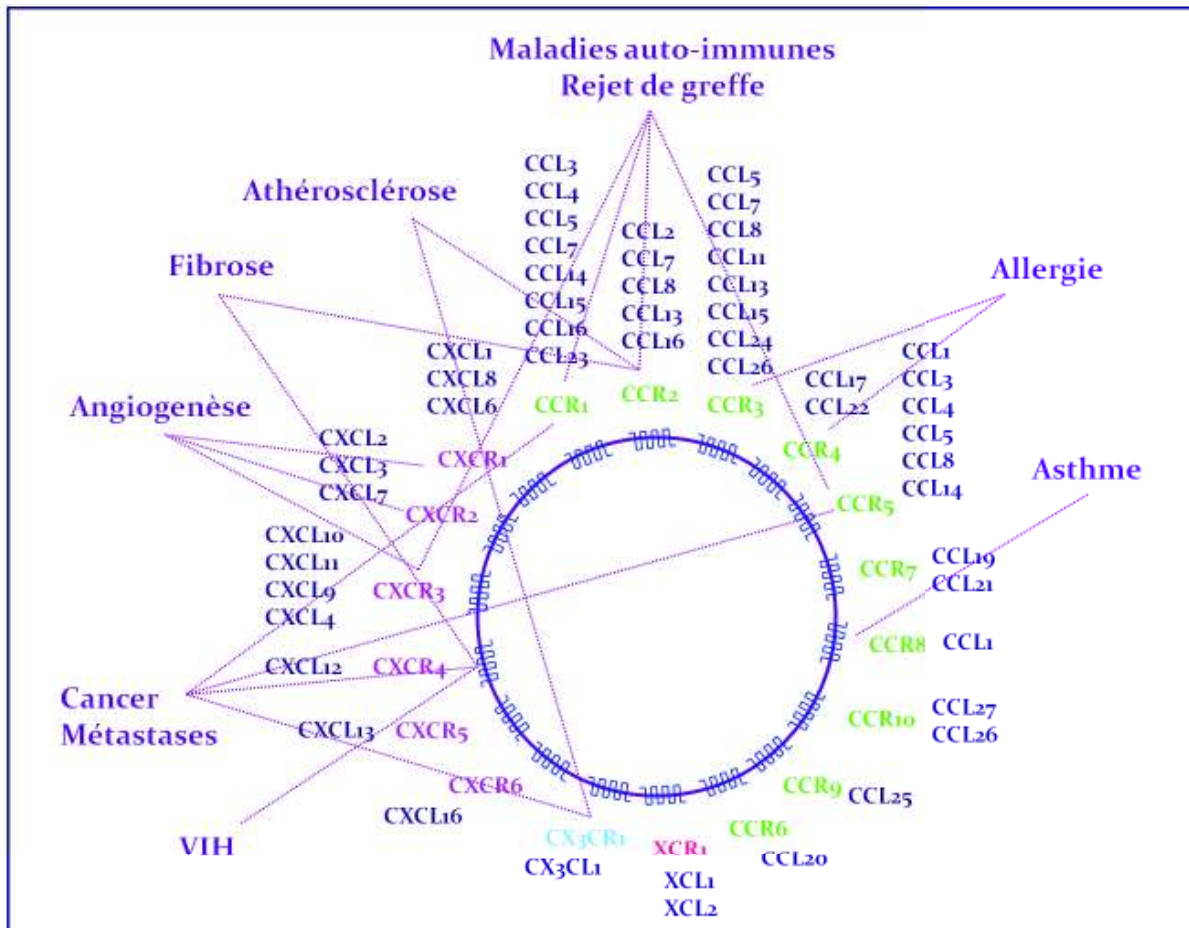


Figure 16 - Relation entre certaines pathologies et les chimiokines et leurs récepteurs. Les associations entre les récepteurs aux chimiokines et leurs ligands et les pathologies représentées sur cette figure ne sont pas exhaustives mais montrent déjà la complexité de ces relations. Ces rapprochements ont pu être faits principalement grâce à des analyses d'expression de chimiokines au niveau de biopsies, à l'utilisation de modèles murins et à des études de polymorphismes chez l'homme. (D'après Johnson 2004)

Dans ce paragraphe nous aborderons l'implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans des processus physiologiques de l'organisme humain, ainsi que dans diverses pathologies.

8.1 Migration cellulaire

Le rôle principal des chimiokines et de leurs récepteurs est la migration cellulaire. Ils orchestrent ainsi le mouvement des leucocytes lors du développement, de l'homéostasie et de l'inflammation. Les chimiokines et leurs récepteurs interviennent dès la maturation des leucocytes à partir de précurseurs de la moelle osseuse ou du thymus. On observe alors des changements de profils d'expression de récepteurs aux chimiokines sur ces précurseurs accompagnés par une production spécifique de chimiokines au niveau des différents microenvironnements. Ce système sophistiqué permet la relocalisation des précurseurs au niveau de différents compartiments tissulaires pendant leurs phases de maturation successives. Les chimiokines homéostatiques permettent ensuite la migration des lymphocytes dans les organes lymphoïdes pour la surveillance immunitaire. D'autres chimiokines sont nécessaires pour attirer les monocytes et les cellules dendritiques immatures au niveau du site d'inflammation, diriger les CPA matures vers les vaisseaux lymphatiques, recruter à la fois les cellules T et les CPA dans l'organe lymphoïde drainant, et enfin permettre la migration des cellules effectrices vers le site inflammatoire. Les chimiokines et leurs récepteurs ont donc un rôle capital d'orchestration des mouvements cellulaires nécessaires à l'initiation des réponses immunitaires.

Certaines chimiokines, comme MCP-1, induisent l'augmentation de la synthèse d'intégrines par les cellules endothéliales des capillaires sanguins, favorisant ainsi l'attachement des leucocytes circulants aux cellules des parois des vaisseaux sanguins. L'IL-8 augmente la perméabilité vasculaire, et stimule la diapédèse des leucocytes activés (Luster 1998). Ces deux processus aboutissent à l'infiltration des leucocytes sur le site inflammatoire (Figure 17).

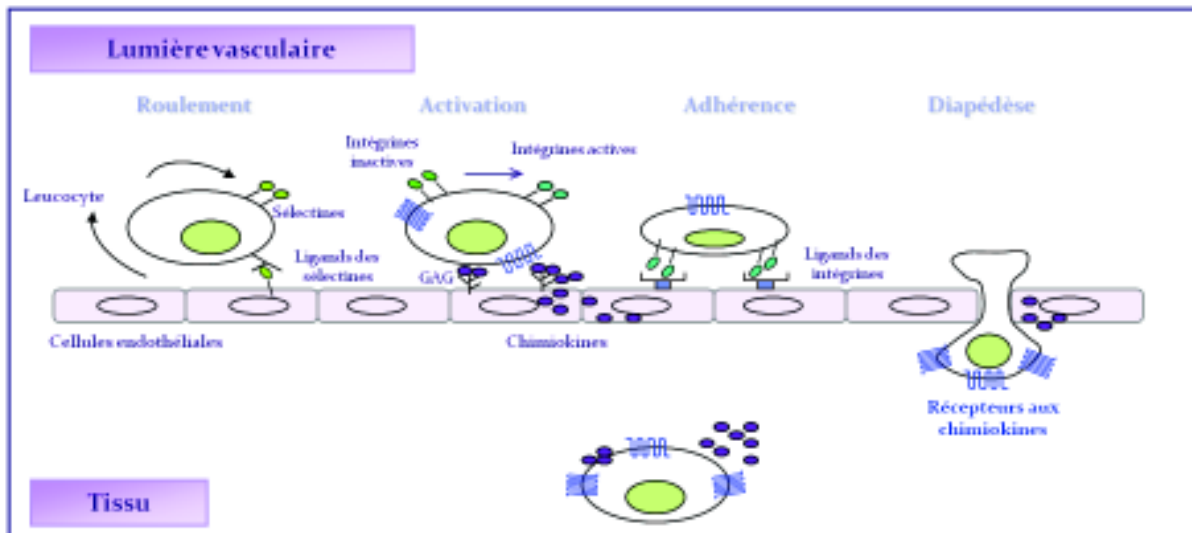


Figure 17 - Modèle en plusieurs étapes du recrutement leucocytaire. La première étape est le roulement des leucocytes circulants grâce à l'interaction des séllectines et de leurs ligands. Ensuite les chimiokines présentées par les GAGs sur les cellules endothéliales permettent l'activation des intégrines aboutissant à l'arrêt ferme des leucocytes sur la paroi. Les cellules subissent alors un réarrangement de leur cytosquelette leur permettant de franchir la barrière endothéliale, c'est la diapédèse. Ensuite elles peuvent migrer dans le tissu en direction du gradient de chimiokines.

La spécificité de certaines chimiokines vis-à-vis de leurs cibles permet d'organiser l'infiltration de façon ordonnée. Ainsi, les lymphocytes T mémoires CD45R0+ ont comme inducteur uniquement RANTES et MCP-1, suggérant un rôle privilégié de ces deux chimiokines dans le trafic des cellules mémoires (Rollins 1997). Il a été également montré que CXCL12 était important dans la migration des cellules souches myéloïdes depuis le foie fœtal jusqu'à la moelle osseuse. Enfin, l'éotaxine est à l'origine du recrutement sélectif des éosinophiles dans les tissus où elle est sécrétée (Rollins 1997).

8.2 Inflammation

La sécrétion des chimiokines a été détectée dans une grande variété de maladies inflammatoires (Schluger et al. 1997). Il est vraisemblable que, dans ces affections, les

chimiokines sont responsables de l'accumulation et de l'activation des leucocytes au sein des tissus. Toutefois, le rôle des chimiokines dans le développement des maladies inflammatoires est rarement démontré de manière directe. Néanmoins, le type d'infiltrat inflammatoire caractéristique d'une maladie semble être le reflet de la production de chimiokines spécifiques par le tissu affecté. Ainsi, la pneumonie aiguë d'origine bactérienne est accompagnée d'un afflux massif de neutrophiles dans les poumons et, parallèlement, la concentration de produits à puissante activité chimiotactique comme l'IL-8 est augmentée dans les liquides bronchoalvéolaires. Dans les méningites virales, les monocytes et les lymphocytes sont recrutés au sein du tissu et des concentrations élevées de CCL₂ ou de CXCL₁₀ sont retrouvées dans le liquide céphalo-rachidien. De même, la présence de cellules inflammatoires dans les articulations de patients souffrant d'arthrite rhumatoïde a été corrélée à la présence d'IL-8 et de CCL₂ dans le liquide synovial. Des infiltrats lymphocytaires et monocytaires sont observés également dans d'autres maladies chroniques. Des lymphocytes activés s'accumulent dans les lésions granulomateuses qui sont caractéristiques de la lèpre tuberculoïde et de la sarcoïdose et des concentrations élevées de CXCL₁₀ peuvent y être mesurées. De plus, la concentration de CXCL₁₀ dans le fluide bronchoalvéolaire de patients atteints de sarcoïdose a pu être corrélée au nombre de lymphocytes T activés présents dans ce liquide (Luster 1998). Dans l'athérosclérose, les macrophages et les lymphocytes sont les cellules immunitaires les plus abondamment retrouvées dans la paroi des vaisseaux sanguins altérés. Lors de la formation d'une plaque d'athérome, on observe une accumulation de « low density lipoproteins » (LDL), qui sont des transporteurs plasmatiques du cholestérol, sous la couche de cellules endothéliales de l'artère. Ces LDL stimulent notamment la production de CCL₂ par les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales permettant l'influx initial de monocytes dans la paroi de l'artère (Figure 18).

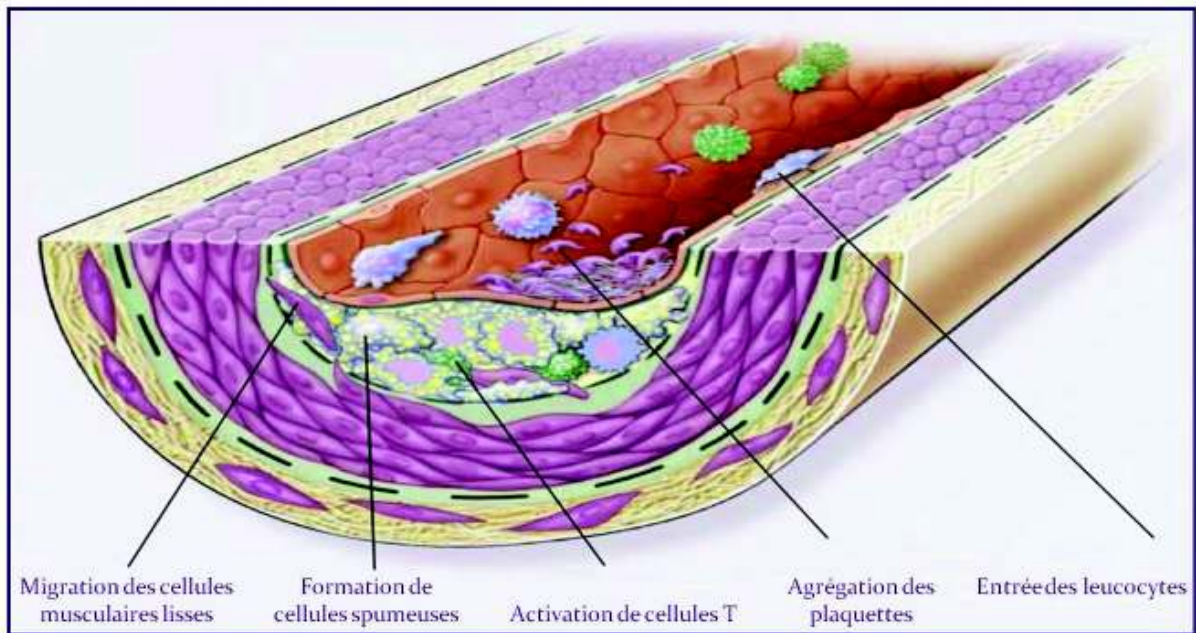


Figure 18 - Représentation schématique d'une coupe d'une artère présentant une plaque d'athérome. Dans une plaque d'athérosclérose, on observe un recrutement de monocytes et de lymphocytes T circulants ainsi qu'une migration des cellules musculaires lisses provenant de la média. Après endocytose des LDL oxydés présents dans la plaque, les monocytes/macrophages deviennent des cellules spumeuses. (D'après Ross 1999)

Bien que le mécanisme de recrutement des monocytes ne soit pas bien connu dans les plaques d'athérome, une forte suspicion pèse sur CCL2. En effet, CCL2 a été détecté dans les artères malades alors qu'il est absent dans des artères saines. De plus, une étude menée sur des souris, dont les gènes codant pour CCL2 et pour le récepteur des LDL ont été invalidés, a montré un plus faible dépôt de lipides lors d'un régime riche en lipides, par rapport aux souris témoins (Gu et al. 1998). Des souris, dont le gène codant pour le récepteur de CCL2, CCR2, a été invalidé (souris *CCR2*^{-/-}) ont été croisées avec d'autres chez lesquelles le gène codant pour la lipoprotéine apoE (*apoE*^{-/-}) a été invalidé, ces dernières développant naturellement une athérosclérose sévère. Il existe, chez les souris doublement mutées (*CCR2*^{-/-}, *apoE*^{-/-}), une diminution de la taille des plaques d'athérome associée à une diminution du nombre de macrophages présents dans ces lésions (Boring et al. 1998). CCL2 pourrait donc

jouer un rôle dans le développement de l'athérosclérose en recrutant les macrophages au sein des plaques d'athérome. D'autres chimiokines que CCL2 sont exprimées dans les lésions athérosclérotiques, c'est le cas de CCL3, CCL4, CCL5, CCL13, CCL18, CCL19, CXCL8 et CX3CL1 (Wilcox et al. 1994; Apostolopoulos et al. 1996; Pattison et al. 1996; Reape et al. 1999; Greaves et al. 2001).

Les chimiokines sont suspectées d'intervenir dans d'autres maladies. C'est le cas de la maladie de Crohn qui est une maladie inflammatoire de l'intestin d'étiologie inconnue. Durant la phase chronique de la maladie, les lymphocytes et les macrophages infiltrent la paroi intestinale alors que, pendant la phase aiguë, ce sont surtout des neutrophiles et, dans une moindre mesure, les éosinophiles qui infiltrent la muqueuse. Au cours des deux phases, plusieurs chimiokines sont produites dans le tissu intestinal des patients (Luster 1998). Dans le psoriasis, les lésions cutanées contiennent des neutrophiles et des lymphocytes T activés. Des molécules chimiotactiques telles que l'IL-8 et GRO- α y sont également rencontrées en grande quantité (Luster 1998). Pour comprendre la relation entre la maladie inflammatoire et la production de chimiokines, des expériences ont été menées, *in vitro* sur des cellules en culture, afin d'étudier l'expression de chimiokines induites par des molécules connues pour leur activité pro-inflammatoire. *In vitro*, la plupart des chimiokines ne sont pas produites de façon constitutive mais sont sécrétées en réponse à des agents pro-inflammatoires. Ainsi, l'IL-1 α et β , le TNF- α ou les IFN- α et γ sont les molécules responsables de l'induction de la plupart des chimiokines. La chimiokine CCL2 est produite dans la plupart des types cellulaires sous l'action de l'IL-1 α et du TNF- α . De même, le LPS bactérien est un puissant agent activant la production de CC-chimiokines. CXCL-9 et CXCL-10 ont par exemple été clonées sur la base de leur expression en réponse à l'IFN (Baggiolini et al. 1997; Schluger et al. 1997).

8.3 Infection par le VIH

Le rétrovirus VIH est l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Les 2 souches principales de ce virus sont le VIH-1 qui regroupe les

isolats décrits aux Etats-Unis, en Europe et en Afrique centrale, et le VIH-2, qui est identifié en Afrique de l'ouest.

Le VIH-1 entre dans les cellules cibles en fusionnant sa membrane virale avec celle de la cellule à infecter. Cette réaction de fusion fait intervenir la glycoprotéine d'enveloppe virale, Env, qui se lie avec une haute affinité au CD4. Cependant, l'expression du CD4 n'est pas suffisante pour expliquer la préférence des différentes souches du VIH pour telles ou telles cellules cibles *in vitro*, et d'autres arguments soutiennent l'hypothèse de l'existence d'un cofacteur nécessaire à l'entrée du virus dans une cellule cible. Ainsi, en 1996, grâce au criblage de clones de cellules murines CD4+ transfectées avec une banque d'ADNc sur la capacité à reconnaître le VIH, le premier corécepteur, CXCR4, a été mis en évidence (Feng et al. 1996). Puis, par comparaison de séquences, plusieurs groupes ont pu mettre en évidence le deuxième co-récepteur majeur des souches VIH-1, CCR5 (Alkhatib et al. 1996; Deng et al. 1996; Dragic et al. 1996). On peut alors classer ces souches en fonction de leur tropisme cellulaire, c'est à dire de leur capacité à infecter un type cellulaire particulier. Ainsi on distingue les souches R5 qui utilisent CCR5 et sont à tropisme macrophagique, des souches X4 qui sont lymphotropes et utilisent CXCR4 (Berger 1997). Ils existent également des souches à double tropisme capables d'utiliser l'un ou l'autre des récepteurs pour infecter les cellules.

In vitro, une quinzaine de récepteurs aux chimiokines, dont une partie correspond à des récepteurs orphelins, a été décrite comme ayant des propriétés de co-récepteurs des virus VIH-1. Par exemple, CCR3 permet l'entrée de souches tropiques pour les lymphocytes ou pour les macrophages (L ou M tropiques) (Choe et al. 1996) ainsi que l'infection des cellules microgliales du cerveau (He et al. 1997). CX3CR1 peut être utilisé par des souches M ou T tropiques mais surtout par des souches à double tropisme (Rucker et al. 1997; Combadiere et al. 1998). Cependant, l'importance physiopathologique de ces différents récepteurs dans l'infection VIH reste à déterminer. Une preuve très claire du rôle de CCR5 dans la pathologie du VIH repose sur la découverte d'un variant polymorphique de CCR5 pouvant expliquer le fait que certaines personnes fortement exposées à l'infection par le VIH restent non infectées. Ces individus sont déficients en expression cellulaire de CCR5 car ils portent une

mutation, à l'état homozygote, dans le gène de ce récepteur entraînant une délétion de 32 pb (Samson et al. 1996). De plus, les individus ayant cette mutation à l'état hétérozygote peuvent être infectés par le VIH mais progressent plus lentement dans la maladie que les individus sauvages pour ce récepteur. Ces observations ont conduit au développement d'antagonistes de CCR5 et CXCR4 testés en études cliniques, qui montrent quelques résultats prometteurs (Onuffer et al. 2002).

8.4 Prolifération cellulaire et angiogénèse

Outre les activités pro-inflammatoires décrites ci-dessus, les chimiokines règlent la prolifération de différents types cellulaires et sont impliquées, à ce titre, dans le développement de tumeurs malignes. CXCL₁ est sécrété par les cellules de mélanome et exerce sur ces mêmes cellules un effet prolifératif autocrine (Richmond et al. 1988). Un tel processus autocrine est observé dans le cancer pulmonaire à petites cellules, ainsi que dans des cancers de la vessie et du sein. Le pouvoir transformant de CXCL₁ a été confirmé *in vitro* et une stratégie antitumorale visant à interrompre cette boucle autocrine est à présent envisagée. Un rôle majeur des chimiokines dans la régulation de l'angiogénèse a également été démontré, en coopération avec d'autres facteurs tels que le FGF β et le VEGF. Ainsi, l'IL-8, et d'autres CXC-chimiokines, comme CXCL₁ et CXCL₅, possèdent de puissantes propriétés angiogéniques, c'est à dire chimiotactisme et prolifération des cellules endothéliales, tandis que le CXCL₄ et d'autres CXC-chimiokines comme CXCL₁₀ inhibent la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogénèse (Maione et al. 1990; Koch et al. 1992; Strieter et al. 1995). La capacité des cellules tumorales à stimuler l'angiogénèse constitue un des facteurs essentiels dans la progression vers la malignité, et les chimiokines sont effectivement impliquées dans ce phénomène. Smith et al (Smith et al. 1994) ont montré que l'IL-8 était produite par certains types de cancers et était directement impliquée dans la stimulation de l'angiogénèse par les cellules tumorales. En revanche, CXCL₄ inhibe la croissance de certaines tumeurs *in vivo* comme le cancer du côlon, l'hépatome, et les mélanomes, par le biais de son activité angiostatique (Maione et al. 1990). Enfin, l'inactivation du gène

codant pour CXCL-12, chez la souris, a permis de montrer le rôle majeur joué par cette chimiokine dans l'angiogenèse (Tachibana et al. 1998).

8.5 Hématopoïèse

Les chimiokines sont de plus en plus reconnues comme réglant la différenciation, la mobilisation et la prolifération des cellules souches de la moelle osseuse. C'est tout d'abord la CCL₃, caractérisée initialement comme un médiateur de l'inflammation, dont on a montré qu'elle inhibe la prolifération des cellules hématopoïétiques souches *in vitro* et *in vivo* (Broxmeyer et al. 1991). L'effet protecteur de CCL₃ sur la moelle au cours de chimiothérapies a été démontré chez l'animal (Lord et al. 1992). En revanche, les cellules souches de patients présentant une leucémie myéloïde chronique sont résistantes à l'effet de CCL₃ (Eaves et al. 1993).

L'intervention des chimiokines dans de nombreuses maladies incite à penser que, dans un avenir proche, une meilleure connaissance des propriétés biologiques des chimiokines sera à l'origine de nouvelles thérapeutiques.

9 Implication des chimiokines et de leurs récepteurs dans l'HTAP

Au cours de ces 10 dernières années de nombreuses études montrent l'implication des chimiokines dans la physiopathologie de l'HTAP. Les travaux réalisés au sein de notre équipe par Balabanian *et al* (Balabanian et al. 2002) ont démontré l'implication de CX₃C-chimiokine fractalkine (CX₃CL₁) dans la pathogenèse de l'HTAP. Chez les patients hypertendus pulmonaires, l'expression de CX₃CR₁ est accrue dans les lymphocytes T circulants ainsi que les concentrations plasmatiques de CX₃CL₁ soluble (sCX₃CL₁) sont significativement augmentées, par rapport aux contrôles. Le gène codant pour CX₃CL₁ est également surexprimé (ARNm) dans les échantillons pulmonaires d'HTAP et les cellules endothéliales artérielles pulmonaires de ces échantillons expriment CX₃CL₁.

Une autre chimiokine CCL5 (RANTES, *Regulated upon Activation, Normal T cell expressed and secreted*), un chimioattractant pour les monocytes et lymphocytes T, a été impliquée dans l'HTAP. Elle intervient indirectement dans l'HTAP par l'induction de l'enzyme de conversion de l'ET-1, un vasoconstricteur puissant exprimé par les cellules endothéliales. L'expression de l'ARNm de CCL5 est augmentée dans les poumons explantés des patients HTAP, comparée aux témoins. L'expression de CX3CL1 par les cellules endothéliales a été mise en évidence par hybridation *in situ* et immunohistochimie (Dorfmueller et al. 2002).

Des données récentes obtenues par différents groupes semblent indiquer que l'expression de certaines chimiokines par les petites artères pulmonaires des patients souffrant d'HTAP contribue au recrutement des cellules inflammatoires et à la prolifération des cellules musculaires lisses. Notre équipe a pu montrer l'expression de CX3CL1 par les cellules inflammatoires autour des lésions vasculaires pulmonaires d'HTAP, ainsi qu'une expression élevée de CX3CR1 par les cellules musculaires lisses de ces lésions. *In vitro*, CX3CL1 induit la prolifération des cellules musculaires lisses isolées à partir d'artère pulmonaire et donc agit en tant que facteur de croissance (Perros et al. 2007). La participation des chimiokines dans le remodelage des artères pulmonaire a été confirmée plus récemment par Sanchez *et al* (Sanchez et al. 2007). Ils ont montré que par rapport aux témoins, les patients souffrant d'HTAP ont des concentrations plasmatiques et tissulaires de la chimiokine CCL2 (MCP-1/*monocyte chemoattractant protein-1*) plus élevées. Une expression importante est également démontrée au niveau des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses pulmonaires. *In vitro*, les cellules endothéliales dérivées de patients atteints d'HTAP induisent une forte migration de monocyte qui est significativement réduite après le blocage de CCL2 avec un anticorps neutralisant. Enfin, la migration et la prolifération des CML d'artère pulmonaire des patients HTAP sous l'effet de CCL2 sont plus importantes, comparées aux témoins. Ces données sont en accord avec la surexpression de CCR2 par les CML (Sanchez et al. 2007).

Une autre chimiokine CXCL10 qui inhibe l'angiogenèse et attire les lymphocytes T activés semble être impliquée dans l'HTAP. Heresi *et al* ont montré une augmentation de la concentration de CXCL10 dans le sérum des patients HTAP. Dans

cette étude, les taux plasmatiques de CXCL10 corrélaient avec la survie des patients (Heresi et al. 2010). Enfin l'ARNm de gène codant pour la chimiokine CCL3 (*MIP-1 α* , *Macrophage inflammatory protein-1 α*) est également surexprimé dans les poumons explantés des patients atteints d'HTAPI (Fartoukh et al. 1998).

Nous avons vu que grâce à leur propriété chimiotactique, les chimiokines sont des molécules importantes dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Les leucocytes et les progéniteurs dérivés de la moelle osseuse recrutés peuvent contribuer au remodelage de la paroi des vaisseaux, soit en apportant des facteurs de croissance et en favorisant l'angiogenèse et la prolifération de tous les types cellulaires constituant la paroi du vaisseau, soit en se différenciant dans différents types cellulaires grâce à leur plasticité phénotypique. Dans cette thèse nous feront le point sur l'implication de la chimiokine CXCL12 et ces 2 récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans le recrutement des cellules souches dérivées de la moelle osseuse dans le modèle expérimental de l'hypertension pulmonaire induit par l'hypoxie et dans l'HTAP humaine.

HYPOTHESES ET OBJECTIFS DE THESE

Hypothèses

L'HTAP est un phénomène complexe et il est actuellement bien établi que plusieurs mécanismes y sont impliqués. Les hypothèses que nous proposons dans cette thèse sont basées sur l'implication des cellules souches dérivées de la moelle osseuse dans l'HTAP humaine et expérimentale. **Premièrement**, nous nous sommes intéressés à la présence de progéniteurs c-kit⁺ autour des lésions vasculaires pulmonaires d'HTAP. Nous avons émis les hypothèses suivantes : 1) Le recrutement pulmonaire de cellules c-kit⁺ est associé à la mobilisation de cellules c-kit⁺ à partir de la moelle osseuse dans la circulation ; 2) Les taux plasmatiques de facteurs solubles mobilisant les cellules c-kit⁺ sont augmentés dans la circulation des patients atteints d'HTAP ; 3) Les progéniteurs c-kit⁺ sont recrutés dans les poumons *via* l'axe CXCL12/CXCR4 ; 4) Les lésions vasculaires pulmonaires sont associées avec l'expansion de *vasa vasorum* permettant le recrutement des cellules c-kit⁺ dans le poumon remodelé ; 5) Les cellules c-kit⁺ recrutées dans les poumons ont le potentiel de se différencier *in vivo* en cellules musculaires lisses. **Deuxièmement**, nous avons proposé l'hypothèse selon laquelle la chimiokine CXCL12 et ses deux récepteurs CXCR4 et CXCR7 jouent un rôle majeur dans la mobilisation et le recrutement dans le poumon des cellules c-kit⁺ issues de la moelle osseuse. Afin d'étudier l'impact de cette voie dans l'HTAP, nous avons utilisé des antagonistes des récepteurs CXCR4 et CXCR7 (AMD3100 et CCX771, respectivement) dans le modèle de l'HTAP induite chez la souris par l'hypoxie chronique. **Troisièmement**, selon notre hypothèse, le blocage direct du récepteur c-kit par l'imatinib, un inhibiteur de récepteur à tyrosine kinase, est capable de freiner la mobilisation et le recrutement des cellules c-kit⁺ autour des petites artères pulmonaires, et de prévenir le remodelage vasculaire pulmonaire, afin de bloquer l'initiation et la progression de l'HTAP. **Quatrièmement**, l'implication d'une autre population des progéniteurs mésenchymateux, les fibrocytes, a été vérifiée dans l'HTAP humaine. En effet, la capacité des fibrocytes à se différencier en myofibroblastes et leur implication dans les processus de fibrogénèse ont été

démontrées *in vivo* dans différents modèles expérimentaux de fibrose pulmonaire, cutanée et rénale. De plus, une contribution indirecte de ces cellules au remodelage vasculaire est possible *via* la production de cytokines, de chimiokines et de facteurs de croissance. Ces facteurs pouvant à leur tour favoriser le recrutement d'autres progéniteurs. Chez l'homme le taux des fibrocytes circulants a été associé avec la survie des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique.

Afin de pouvoir tester l'ensemble de ces hypothèses nous avons déterminé les objectifs suivants :

Objectifs

1. Etablir l'implication des cellules c-kit+ dans l'HTAP humaine et proposer un mécanisme possible impliqué dans leur recrutement au niveau des petits artères pulmonaires.

2. Etudier le mécanisme de recrutement vasculaire pulmonaire des cellules c-kit+ dans le modèle d'HTAP induite chez la souris par l'hypoxie chronique en utilisant des antagonistes des récepteurs CXCR4 et CXCR7 (AMD3100 et CCX771 respectivement).

3. Etablir le lien entre la présence des cellules c-kit+ et le remodelage artériel pulmonaires en ciblant directement le récepteur c-kit avec l'imatinib dans ce même modèle.

4. Quantifier le niveau de fibrocytes circulants dans le sang périphérique de patients atteints d'HTAP et de témoins et étudier leur capacité de différenciation *in vitro*.

MATERIELS ET METHODES

1 Modèle expérimental d'hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique chez la souris

1.1 Principe

L'exposition à l'hypoxie induit une vasoconstriction pulmonaire, suivie d'un remodelage artériolaire. La réponse vasculaire pulmonaire à l'hypoxie varie d'un sujet et d'une espèce à l'autre. Elle est intense chez le porc, le cheval et le bovin, modérée chez le rongeur et chez l'homme, et minime chez le chien, le cobaye, le yak et chez lama (Grover 1983).

Le modèle expérimental d'HTAP hypoxique le plus souvent utilisé recourt aux petits rongeurs, rats ou souris, soumis à une hypoxie normobare ou hypobare pendant deux à trois semaines, parfois davantage. A ce moment, le remodelage artériolaire se limite à une hypertrophie médiale, avec quelque prolifération adventitielle mais peu ou pas d'épaississement intimal, et peu d'infiltrat inflammatoire. Sur le plan hémodynamique, la pression systolique s'élève modérément, à des valeurs de l'ordre de 30-40 mmHg chez la souris, variant en fonction de la race. Les animaux en croissance sont plus sensibles, tandis que les animaux âgés sont relativement préservés de l'HTAP hypoxique. Sur le plan biologique, l'HTAP hypoxique se caractérise par une surexpression intimale d'endotheline-1 et de son récepteur ETB (Li et al. 1994; Soma et al. 1999) de la eNOS (Tyler et al. 1999) et de la synthétase de la prostacycline (Blumberg et al. 2002). Au niveau de la tunique médiale, il y a surexpression du 5-HTT (Eddahibi et al. 1999) et de la phosphodiesterase type 5 (Sebkhi et al. 2003) et sous-expression des canaux potassiques voltage-dépendants (Weir et al. 2006). L'adventice montre une surexpression des MMP et de la ténascine (Frid et al. 2006). L'expression de *BMPR-2* est diminuée (Takahashi et al. 2006). Donc, à l'exception de la surexpression intimale des synthétases de la prostacycline et du NO, la biologie de l'HTAP hypoxique murine ressemble à celle de l'HTAP humaine.

1.2 Application de l'hypoxie

Le modèle expérimental utilisé dans ce travail est le modèle d'HTAP induite chez la souris par l'exposition à l'hypoxie normobare (FiO_2 10%, $FiCO_2$ 0%). Les groupes randomisés des animaux sont placés en hypoxie pendant 21 jours, les groupes témoins sont placés en normoxie (FiO_2 21%, $FiCO_2$ 0%) durant la même période. Des souris C56Bl/6j mâles âgées de 6 semaines ont été utilisées dans cette étude.

1.3 Hématocrite

L'hématocrite est mesuré sur les échantillons sanguins prélevés à partir du sinus rétro-orbital sous anesthésie générale.

1.4 Etude hémodynamique

Le paramètre d'hémodynamique mesuré est la pression systolique du ventricule droit. Les souris sont anesthésiées par injection intrapéritonéale de kétamine (60 mg/kg), de xylazine (8 mg/kg) et d'acépromazine (0.5mg/kg). La veine jugulaire droite est disséquée et un cathéter de 24 gauges est introduit dedans sur environ 2-3 cm, ce qui le place dans le ventricule droit. Le cathéter est relié à un bloc d'enregistrement constitué d'une tête de pression, d'un amplificateur et d'un enregistreur pour mesurer la pression systolique du ventricule droit.

1.5 Protocole de conservation des poumons de souris

A la fin de la procédure de mesure hémodynamique, les animaux encore anesthésiés sont sacrifiés par ponction sanguine au niveau de l'aorte abdominale. Cette procédure permet d'obtenir des poumons présentant des vaisseaux exsangues lors des analyses histologiques ou immunohistochimiques. Puis, la cage thoracique de l'animal est ouverte par sternotomie. La trachée, l'aorte ascendante, ainsi que les veines caves sont coupées et le bloc cœur-poumon prélevé. Un composé « O.C.T. » (Optimal

cutting temperature, OCT) dilué dans du PBS (phosphate buffered saline) (rapport 1:1) est instillé dans les poumons *via* la trachée, pour obtenir une morphologie pulmonaire distendue, proche de l'état d'inspiration physiologique. Le cœur est excisé pour évaluation macroscopique. Les poumons insufflés sont congelés dans un bain d'isopentane refroidi par de la carboglace et stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

1.6 Etude de l'hypertrophie du ventricule droit

En réponse à l'augmentation de la post-charge, le ventricule droit s'hypertrophie. L'hypertrophie du ventricule droit est donc un marqueur de sévérité de l'hypertension pulmonaire qui se développe dans ce modèle. Un indice a été créé pour rendre compte de cette hypertrophie. Il s'établit en calculant le rapport poids du ventricule droit/(poids du ventricule gauche+septum).

2 Prélèvements humains

2.1 Echantillons pulmonaires

2.1.1 Patients

Le tissu pulmonaire de patients présentant une HTAP est obtenu à l'occasion d'une transplantation pulmonaire. Le tissu contrôle provient de biopsies pulmonaires effectuées lors de la cure chirurgicale de pneumothorax, ou à distance des lésions lors de l'ablation de tumeurs pulmonaires localisées. Un consentement libre et éclairé est obtenu des patients ou de leur famille, avant chaque prélèvement opéré à des fins de recherche médicale.

2.1.2 Protocole de conservation des échantillons pulmonaires humains

Afin de garantir l'intégrité nucléique, protéique et morphologique des tissus utilisés à des fins de recherche, les poumons explantés par le chirurgien sont traités rapidement et stérilement au moment même de l'intervention chirurgicale, dans le

bloc opératoire de l'hôpital Marie Lannelongue (Centre chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, France).

Sur les deux poumons explantés, le gauche est laissé intact ; il est utilisé à des fins cliniques par les anatomopathologistes de l'hôpital Marie Lannelongue. Le droit est gonflé à l'aide d'un mélange OCT/sérum physiologique (rapport 1:5), par application intrabronchique ; chaque lobe étant gonflé *via* sa bronche principale. Quand le lobe est suffisamment distendu, la bronche est clampée. Lorsqu'un lobe entier ne peut être obtenu (prélèvements chez les sujets contrôles) le mélange OCT/sérum physiologique est directement injecté dans le parenchyme à l'aide d'une aiguille 18G. De multiples prélèvements tissulaires sont obtenus en sectionnant différentes zones du parenchyme pulmonaire : des échantillons périphériques et centraux des 3 lobes sont récupérés et numérotés de façon systématique. Les échantillons sont inclus dans de l'OCT pur dans des cupules de congélation puis rapidement congelés dans un bain d'isopentane refroidi par de la carboglace. Les blocs de tissu pulmonaire ainsi obtenus sont stockés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

2.2 Prélèvements sanguins

2.2.1 Patients

Le groupe des sujets atteints d'HTAP est composé de patients porteurs d'une HTAPI, HTAPH, HTAP associée à la sclérodermie ou maladie veino-occlusive. Les prélèvements sont réalisés à l'occasion d'une prise de sang effectuée dans le cadre du suivi habituel.

Le groupe contrôle est composé des donneurs venant donner leur sang à l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les contrôles sont des sujets sains, et en particulier sans allergie connue ni maladie auto-immune.

Un consentement est obtenu des patients et des sujets contrôles.

2.2.2 Prélèvements

Les prélèvements sanguins (10ml) des sujets contrôles et des sujets atteints d'HTAP sont obtenus après information et signature d'un consentement éclairé :

- Sang sur tube EDTA (bouchon violet) pour l'étude des populations leucocytaires et des progéniteurs par cytométrie en flux.
- Sang sur tube sec (bouchon rouge) pour l'obtention de sérum. Le sang est laissé à température ambiante pendant 60 min pour permettre sa coagulation. Puis le sérum est séparé du caillot par centrifugation 30 min à 3000 g. Le sérum est prélevé puis stocké à -80°C jusqu'à utilisation.

3 Morphométrie microscopique et analyse d'image

Les poumons des souris hypoxiques et souris témoins sont colorés avec Hématoxyline & Erythrosine et l'actine- α des cellules musculaires lisses. Le degré de muscularisation de petites artères pulmonaires avec un diamètre inférieur à 25 μm , et compris entre 25 et 50 μm , 50 et 75 μm , et 75 et 100 μm est évalué en comptant 30 artères au hasard. Le rapport utilisé afin de mesurer la muscularisation de la media est l'épaisseur de la média/diamètre d'artère. Les résultats sont représentés en pourcentage. L'analyse morphométrique est effectuée à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 80i et de logiciel d'analyse d'image NIS-Elements BR.

4 Etude de l'expression génique au sein des échantillons pulmonaires

4.1 Extraction d'ARN messenger de poumon totale

Les ARNm sont extraits des tissus à l'aide du kit « total RNA isolation kit » (Agilent technologies, France). Ce kit d'extraction comporte deux étapes principales. Une première colonne d'exclusion permet de retenir les débris cellulaires et l'ADN génomique, et d'éluer les ARNs totaux. Une deuxième colonne en silice permet de retenir les ARNs totaux par affinité électrostatique. Ce kit permet l'obtention d'ARN

total pur et de grande qualité. Nous avons vérifié ces deux paramètres après chaque extraction par spectrophotométrie et visualisation après migration sur gel d'agarose contenant du bromure d'éthidium. En effet, un ARN pur possède un rapport absorption à 260 nm/absorption à 280 nm entre 1,8 et 2. Un ARN de bonne qualité, c'est à dire non dégradé présente deux bandes intenses et uniques correspondant aux ARNs 18s et 28s. Les ARNs totaux sont alors stockés à -80°C jusqu'à utilisation.

4.2 Microdissection laser

Des coupes de poumon réalisées au cryostat sont déposées sur des lames recouvertes d'un film plastique qui permettra l'expulsion des artères microdisséquées (lames de verre avec film PEN 2 microns pour AS LMD, Leica, Rueil-Malmaison, France). Les coupes sont ensuite fixées 4 min à l'acétone à température ambiante. Les coupes sont colorées 1 min à l'hématoxyline de Mayer et déshydratées dans une cloche contenant du silicagel pendant 1 à 2 heures. Les artères pulmonaires sont alors microdisséquées avec le système « AS LMD laser microdissection microscope » de Leica. Les artères microdisséquées tombent par gravité dans un tube collecteur contenant le tampon de lyse du kit d'extraction d'ARN dédié à la microdissection picopure (Alphelys, Plaisir, France). Comme dans le kit de chez Agilent (extraction sur poumon total), le reste de l'extraction fait intervenir la purification des ARN sur colonne d'affinité.

4.3 Rétrotranscription

La transformation des ARNs en ADNc complémentaires (ADNc), c'est à dire la rétrotranscription, a été réalisée grâce au kit Quantitect (Qiagen). Ce kit est dédié à la PCR quantitative. Il permet la rétrotranscription de tous les ARNm, même les moins abondants. Ce kit comporte deux étapes : l'élimination de l'ADN génomique et la rétrotranscription grâce à une transcriptase inverse de haute sensibilité et un mélange d'amorces dégénérées et de polydT.

4.4 PCR quantitative ou « en temps réel »

Les PCRs quantitatives en temps réel ont été réalisées sur un « ABI Prism7000 Sequence Detection System » grâce à des « gene expression assays » (Applied Biosystems). Ces kits fonctionnent selon la technologie « Taqman ». Le principe de cette chimie repose sur la fonction exonucléase 5' → 3' de la Taq-polymérase. La sonde est un oligonucléotide spécifique de la séquence amplifiée. 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 » (éteinte) 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.

Dans une PCR, seule la phase exponentielle est représentative du nombre de copies initial. Le moment où le signal sort du bruit de fond correspond à un certain nombre de cycles appelé Ct (threshold cycle). Pour deux quantités initiales différentes on obtiendra deux Ct différents, et la différence des Ct sera proportionnelle à la différence relative qui les sépare, selon la formule $2^{\Delta Ct}$ (Ct₁ – Ct₂), puisque la quantité d'ADN double à chaque cycle.

L'expression des gènes d'intérêt a été quantifiée selon la méthode relative du $\Delta\Delta Ct$. Un gène constitutivement exprimé (β -actine) a été sélectionné comme contrôle interne (gène de ménage) de la quantité réelle totale d'ADNc déposée dans chaque réaction de PCR. Le gène cible normalisé par rapport à la β -actine correspond à ΔCt (Ct du gène d'intérêt – Ct de la β -actine). La différence d'expression de chaque échantillon est donnée par la différence $\Delta\Delta Ct$ (ΔCt de l'échantillon – ΔCt d'un échantillon qui sert de référence). Enfin, la quantité relative de chaque échantillon est donnée par l'équation $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

5 Etude de l'expression protéique au sein des échantillons pulmonaires

5.1 Western-blot

Les poumons sont homogénéisés dans un tampon de lyse pH 7.4 contenant 50mM de Tris, 150mM de NaCl, 3% de glycérol, 1.5 mM d'EDTA et 1% de Triton X-100, et supplémenté en inhibiteurs de protéases (1mM péfabloc, 5µg/ml leupeptine, 5µg/ml aprotinine). Après incubation dans la glace (20-30 min), les protéines dissoutes sont récupérées dans le surnageant du lysat cellulaire centrifugé 15 min à 13000 rpm à 4°C. Les protéines sont dosées selon la méthode de Bradford à l'aide du réactif Bio-Rad Assay Protein (Biorad, Marnes-la-Coquette, France). Avant le dépôt sur gel, les protéines sont bouillies 5 min à 95°C dans un tampon d'échantillon contenant un agent réducteur, le β -mercaptoéthanol qui réduit les ponts disulfures, et un détergent anionique fort : le sodium dodecyl sulfate (SDS) qui enveloppe les chaînes polypeptidiques des protéines de charges négatives. Ces charges se repoussent et déplient les chaînes polypeptidiques. En conséquence, les protéines sont dénaturées (elles ont perdu leur structure tridimensionnelle native) et n'ont plus de pont disulfure: elles sont sous une forme monomérique (Tampon d'échantillon : Glycérol 10%, SDS 2%, β -mercaptoéthanol 10%, bleu de bromophénol 0.05%, 100mM Tris-HCl pH 6.8). 30 à 50 µg de protéines sont déposées sur un gel contenant 10% ou 12% de polyacrylamide (selon la masse des protéines à séparer) et du SDS pour conserver la forme dénaturée des protéines. Après migration à courant constant (60mA), les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF, activée préalablement par le méthanol, à voltage constant (100v). Les membranes sont lavées dans de l'eau et du TBS (Tris Buffered Saline), puis saturées en protéines 60 min à température ambiante (TA) dans une solution de BSA 10% en TBS. Puis la membrane est exposée à un anticorps primaire, puis à un anticorps anti-anticorps primaire couplé à une peroxydase (HRP). Les protéines sont maintenant marquées spécifiquement et peuvent être révélées par le kit ECL (Enhanced Chemiluminescence, Amersham, Les Ulis, France). La peroxydase marquant l'anticorps secondaire oxyde le luminol en présence

de peroxyde d'hydrogène. Le luminol excité revient à son état initial en émettant une lumière à 428 nm détectée par un film photographique (Hyperfilm ECL, Amersham).

5.2 Immunohistochimie/Immunofluorescence

Lors des marquages réalisés en immunohistochimie conventionnelle (IHC), nous avons utilisé un marquage indirect en 3 étapes. Un anticorps primaire monoclonal ou polyclonal reconnaît l'épitope visé. Puis un anticorps secondaire polyclonal anti-anticorps primaire couplé à la biotine réagit avec l'anticorps primaire lié à l'antigène. L'anticorps secondaire biotinylé fixe ensuite plusieurs molécules de streptavidine couplées à une HRP. Le marquage est réalisé par incubation du complexe avec un chromogène substrat des peroxydases. En IHC, il est nécessaire d'inhiber les peroxydases en début de marquage pour éviter le bruit de fond créé par la réaction du substrat chromogène avec les peroxydases endogènes.

Lors des marquages en immunofluorescence (IF), nous avons utilisé un marquage direct ou un marquage en 3 étapes, selon la sensibilité de l'anticorps primaire. Dans le cas du marquage direct, l'anticorps primaire est directement couplé à un fluorochrome, alors que dans le marquage indirect en 3 étapes, l'anticorps primaire est révélé par un anticorps secondaire couplé à la biotine ; reconnu dans la 3^{ème} étape par un complexe streptavidine-fluorochrome.

Selon l'anticorps, différents protocoles sont utilisés. Premièrement, la coupe peut être fixée avec différents fixateurs (acétone, paraformaldéhyde, méthanol etc.). Ensuite, la fixation peut avoir diminué la disponibilité de l'antigène reconnu par l'anticorps primaire. Dans ce cas, nous avons réalisé un démasquage au micro-onde en tampon EDTA qui casse les liens inter- ou intraprotéiques créés par le fixateur. Avant l'ajout de l'anticorps primaire, la coupe est saturée avec du sérum de l'espèce dans laquelle a été fait l'anticorps secondaire pour éviter sa fixation non spécifique. Enfin, la liaison de l'anticorps primaire avec son antigène peut être favorisée par l'ajout de détergents (0,3% Triton et 0,2% Tween).

5-3 Etude des protéines plasmatiques par ELISA

Nous avons dosé certaines protéines plasmatiques avec la méthode sandwich ELISA (*sandwich enzyme-linked immunosorbent assay*). Dans un système en sandwich, on adsorbe tout d'abord une large quantité d'anticorps primaire sur la phase solide (plaques 96 puits) de façon à la saturer. Cet anticorps est appelé anticorps de capture. Ensuite on ajoute l'échantillon contenant l'antigène qui se complexe et se fixe sur l'anticorps de capture. On réexpose ensuite à un anticorps primaire reconnaissant un ou des épitopes de l'antigène couplé à une HRP. Ce second anticorps primaire est appelé anticorps de détection. On ajoute alors un substrat de l'HRP. On peut ensuite détecter le signal qui est proportionnel à l'anticorps secondaire, donc, ultimement, à l'antigène fixé sur l'anticorps de capture. Le terme "sandwich" vient du fait que l'antigène qu'on veut mesurer est "pris en sandwich" entre deux anticorps primaires: l'anticorps de capture et l'anticorps de détection. Cette méthode est très sensible car elle permet la capture de l'antigène dilué dans une grande masse d'autres protéines.

Nous avons en particulier, étudié les concentrations sériques humaines de c-kit soluble et CXCL12 en suivant les instructions du kit "human soluble c-kit quantikine immunoassays" and "human CXCL12/SDF-1 DuoSet" (R&D systems) fonctionnant sur ce principe.

6 Etude de la migration des progéniteurs hématopoïétiques

6.1 Test de polymérisation de l'actine

La polymérisation de l'actine est un processus précoce dans la réponse cellulaire à un stimulus chimiotactique. Cette polymérisation peut être quantifiée grâce au marquage à la phalloïdine. En effet, la phalloïdine a la capacité de se lier avec une haute affinité à l'actine polymérisée mais pas à l'actine monomérique. Des cellules répondant à un stimulus chimiotactique ont donc un marquage à la phalloïdine plus intense que des cellules statiques.

Dans ce test, on marque les cellules avec de la phalloïdine couplée à l'AlexaFluor 647 toutes les 15 secondes et pendant 1 min après stimulation. Puis l'intensité de ce

marquage est quantifiée par cytométrie en flux. Le pourcentage de modulation de la polymérisation de l'actine (mesuré par la variation de l'intensité de fluorescence du marquage phalloïdine-AlexaFluor 647) après stimulation est calculée ainsi :

$$\% \text{ polymérisation} = (\text{intensité moyenne de fluorescence après stimulation}) / (\text{intensité moyenne de fluorescence avant stimulation}) * 100$$

100% correspond au niveau de base avant stimulation. La valeur de l'aire sous la courbe (AUC/Area Under the Curve) donne une valeur de l'amplitude de la réponse pendant une min. L'AUC est calculée à l'aide de logiciel GraphPad Prism 5 et exprimée en valeurs arbitraires.

7 Etude des fibrocytes circulants et de progéniteurs hématopoïétiques par cytométrie en flux

7.1 Principe

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 et la seconde avec la réfringence et la granulosité de la cellule).

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 % qu'il représente par rapport à la population totale, la moyenne de chacun des paramètres, les écarts standards, etc. On peut également voir si deux paramètres sont liés entre eux (coefficient de corrélation...).

Selon la spécificité des réactifs fluorescents utilisés pour colorer les cellules, on a accès à l'étude quantitative de nombreuses caractéristiques : présence d'un antigène,

quantité d'ADN ou d'ARN, activité enzymatique, viabilité, etc. L'avantage de cette technique est de réaliser des analyses précises sur des critères très différents et très nombreux.

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).

7.2 Méthodologie

Les cellules sont analysées sur le cymomètre MACSCCount (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 (FSC, Forward scatter) et de la granulosité (SSC, Side scatter). 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.

7.3 Analyse des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique

Il existe des nombreuses populations des progéniteurs circulant dans le sang périphérique. Nous avons détaillé le phénotype et la fonction des ces populations dans le chapitre II de l'introduction.

Cette étude est réalisée sur les leucocytes sanguins (PBMC) séparés dans le gradient de densité Ficoll. Notre stratégie d'analyse des progéniteurs hématopoïétiques est basée sur l'utilisation des anticorps dirigés contre les antigènes spécifiques bien caractérisés parmi l'ensemble des progéniteurs circulants : CD34, CD133, c-kit et CXCR4. Un cocktail d'anticorps anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, CD123,

BDCA-1, 2 et 3 a été utilisé afin d'éliminer toute les cellules différenciées de l'analyse. Le protocole détaillé est décrit dans l'article 1 ci-joint.

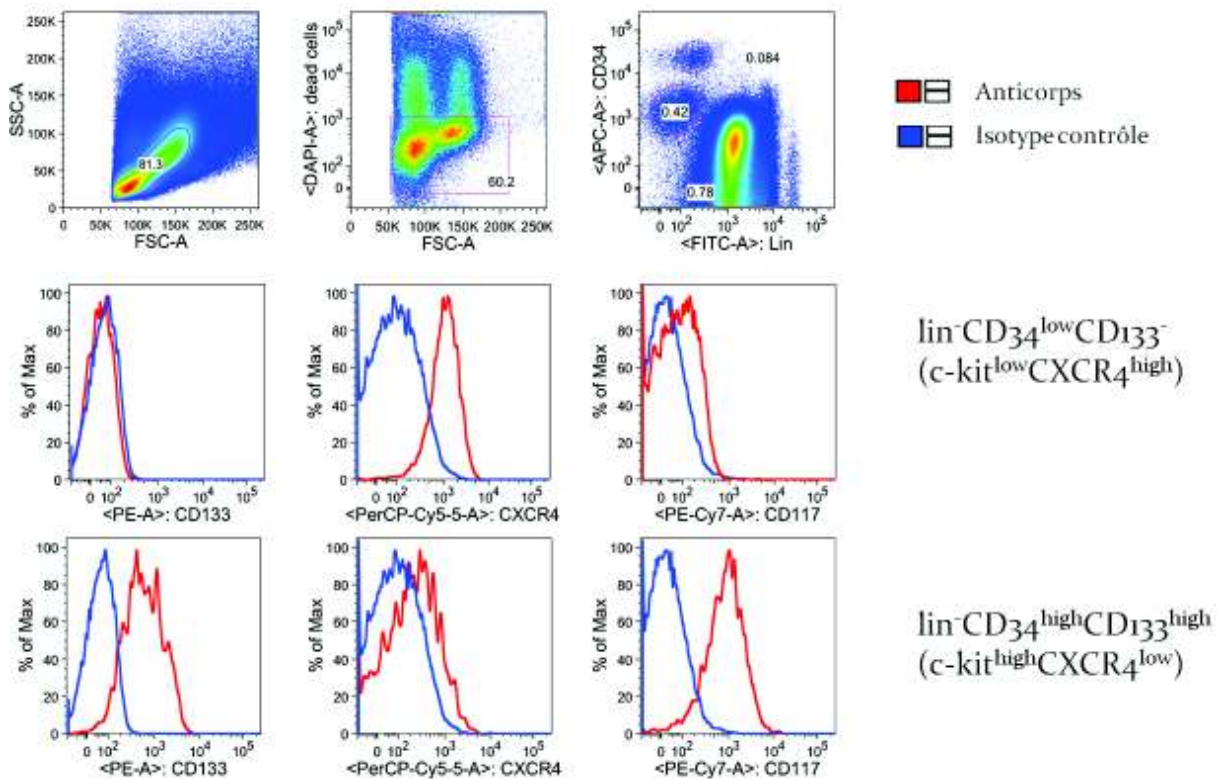


Figure 19 – Stratégie d’analyse des progéniteurs hématopoïétiques dans le sang périphérique. Les cellules mortes sont éliminées en fonction du DAPI. Le linéage est utilisé afin d’éliminer toutes les populations cellulaires différenciées. En fonction de CD34 deux populations des progéniteurs sont identifiées: $lin^-CD34^{high}CD133^{high}(c-kit^{high}CXCR4^{low})$ et $lin^-CD34^{low}CD133^-(c-kit^{low}CXCR4^{high})$.

7.4 Analyse des fibrocytes circulants

Les marqueurs que nous avons choisis pour cette étude sont les marqueurs hématopoïétiques CD11b et CD34, récepteur de CXCL12 - CXCR4, et le marqueur des cellules stromales - vimentine. Afin d’avoir le nombre des fibrocytes par ml de sang, nous avons travaillé sur le sang frais. Le protocole utilisé est un protocole à plusieurs étapes, détaillé plus précisément dans l’article 4. Après être marqué avec des anticorps dirigés contre les antigènes membranaires les cellules sont fixées, lavées et

perméabilisées avec le kit commercialisé (Becman Coulter, France), suivi par le marquage intra-cellulaire avec un anticorps dirigé contre vimentine. Le marqueur d'acides nucléiques Hoechst est rajouté afin d'éliminer les débris cellulaires anucléés juste avant le passage au cytomètre.

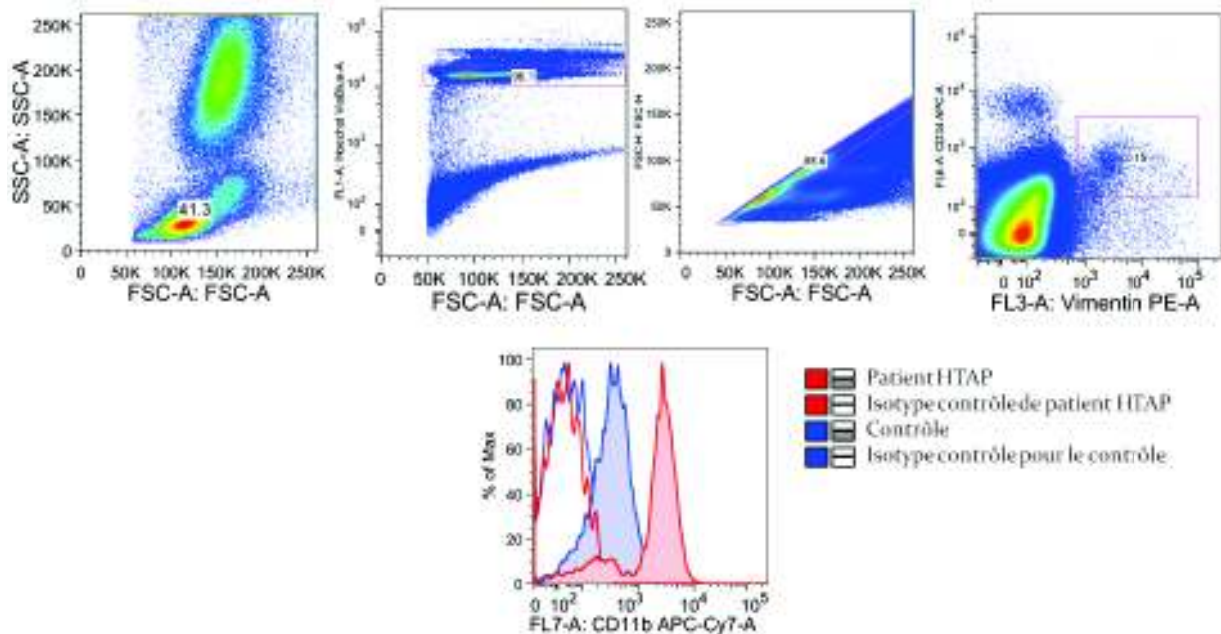


Figure 20 - Stratégie d'analyse des fibrocytes circulants dans le sang périphérique. En fonction de la taille (Forward scatter – FSC) et de la granulosité (Side Scatter – SSC), les populations de lymphocytes et de monocytes sont séparées des autres leucocytes. Les doublets cellulaires, les débris et les cellules mortes sont ensuite éliminés. Les marqueurs CD11b, CD34 et vimentine permettent d'identifier les fibrocytes circulantes (CD34+CD11b+vimentin+).

RESULTATS

I - RECRUTEMENT DES CELLULES C-KIT+ AUTOURS DES VAISSEAUX REMODELES DANS L'HTAP HUMAINE

1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules souches sont des cellules multipotentes qui possèdent de nombreuses fonctions et participent dans différents processus physiopathologiques. Grace à leur plasticité et leur capacité d'autorenouvellement les cellules souches ont été impliquées dans le remodelage vasculaire au cours de l'HTAP.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés aux cellules souches dérivées de la moelle osseuse c-kit+. Le récepteur transmembranaire à tyrosine kinase c-kit est considéré en tant que marqueur des cellules souches hématopoïétiques et des mastocytes. Le recrutement des c-kit+ a bien été démontré dans la pathogenèse de l'athérosclérose et dans la réparation du myocarde suivant l'infarctus (Orlic et al. 2001; Sata et al. 2002). Ainsi l'hypoxie chronique induit le recrutement des cellules c-kit+ dans l'espace périvasculaire des artères remodelées (Davie et al. 2004). Les expériences menées *in vitro* montrent que l'hypoxie favorise l'expression de l' α -SMA par les cellules progénitrices c-kit+/VEGFR2+ (Sato et al. 2009). Cependant, c-kit est exprimé également par une autre population de cellules hautement différenciées, les mastocytes. La présence des mastocytes dans des poumons des patients atteints HTAP à été décrite pour la première fois il y a une décade (Mitani et al. 1999). Les mastocytes sont impliqués dans un large spectre de réponses adaptatives et pathologiques associées à l'inflammation (Metz et al. 2007) et participent au remodelage bronchiale et cardiaque (Janicki et al. 2006; Okayama et al. 2007). c-kit est également devenu très récemment une cible thérapeutique, nous aborderons ici une nouvelle approche par rapport au blocage du recrutement des cellules c-kit+ et l'effet sur les fonctions qu'elles exercent. Les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) comme l'imatinib ou le sorafenib ont un effet bénéfique sur l'HTAP expérimentale (Schermuly et al. 2005; Klein et al. 2008).

Leur mécanisme d'action principal est lié à l'inhibition de PDGF (platelet-derived growth factor) récepteur dont le rôle important a été démontré dans la physiopathologie de l'HTAP (Perros et al. 2008). Toutefois, les débats sur l'utilisation des ITK dans l'HTAP humaines sont toujours ouverts, étant donné leur cardiotoxicité et leur toxicité hématologique (Kerkela et al. 2006; Chen et al. 2008). Pour avancer dans l'identification de TKI pertinents par rapport à la physiopathologie de l'HTAP et apportant un rapport bénéfice/risque acceptable il est nécessaire d'identifier les ITK dirigés contre des cibles limitantes dans le développement de la maladie.

L'objectif principal de cette étude a été d'examiner l'impact des cellules c-kit+ dans l'HTAPI humaine. Pour pouvoir atteindre cet objectif nous avons exploré les hypothèses suivantes : tout d'abord nous avons proposé que les cellules c-kit+ sont impliquées dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Le recrutement vasculaire de cellules c-kit+ passe par la mobilisation de ces cellules dans le sang périphérique. La mobilisation en périphérie est due à l'augmentation dans le plasma de certains facteurs chimioattractants permettant d'attirer les progéniteurs de la moelle osseuse vers la circulation sanguine. Dans la deuxième partie de cette étude nous avons étudié le mécanisme de recrutement et le destin des cellules c-kit+ dans le poumon.

2 Résultats

Article 1

c-kit positive cells accumulate in remodeled vessels of idiopathic pulmonary arterial hypertension

David Montani, Frédéric Perros, Natalia Gambaryan, Barbara Girerd, Peter Dorfmüller, Laura C. Price, Alice Huertas, Hamida Hammad, Bart Lambrecht, Gérald Simonneau, Jean-Marie Launay, Sylvia Cohen-Kaminsky and Marc Humbert.

American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2011. Accepté pour la publication.

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 National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécclère, 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 ⁵Hôpital Lariboisière, AP-HP, Service de Biochimie, 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.A. 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-Bécclère, 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 183, pp 1–8, 2011
DOI: 10.1164/rccm.201006-0905OC
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, such as mast cells. In animal models, hypoxia induces mobilization of c-kit⁺ cells from the bone marrow into the circulation, and an increased expression of c-kit⁺ cells in remodeled pulmonary artery vessel walls.

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 a significant contribution to the current knowledge regarding the localization of bone marrow-derived progenitor cells and mast cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension and lends support for future targeting of c-kit in this severe condition.

Conclusion: 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 pro-

mote 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 hypertension and human IPAH (12–15). Mast cells may be involved in a variety of adaptive or pathologic responses associated with chronic inflammation (16) and may contribute to bronchial or cardiac remodeling (17, 18).

In the present study, we assessed the involvement of c-kit⁺ cells in human IPAH and tested the following hypotheses: (1) c-kit⁺ cells (both c-kit⁺/tryptase⁻ progenitor cells and c-kit⁺/tryptase⁺ mast cells) accumulate in remodeled pulmonary arteries of human IPAH; (2) plasma levels of mobilizing factors for BM-derived progenitors are increased in IPAH; (3) both c-kit⁺/CXCR4⁺ cells and recruiting factors, such as CXCL12/SDF-1, are increased in vascular lesions; and (4) pulmonary arterial lesions are associated with vasa vasorum expansion allowing perivascular circulating progenitor recruitment. Some of the results of these studies have been previously reported as abstract (19).

METHODS

Collections of Lung Specimens and Blood Samples

Human lung specimens of IPAH were collected at the time of lung transplantation and control specimens were obtained during lobectomy or pneumonectomy for localized lung cancer. Tissues were snap frozen or paraffin embedded, as previously described (20). All patients were older than 18 years and patients with IPAH had a diagnosis confirmed by right-heart catheterization. Blood samples were collected in patients with IPAH during usual follow-up and in control subjects. 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 informed consent (21).

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded 3- μ m thick sections were stained with anti-human CXCL12/SDF-1 (monoclonal mouse IgG1, clone 79,018); anti-human CXCR4 antibody (monoclonal mouse IgG2B Clone 44716; R&D Systems); anti-human CD34 (monoclonal mouse, IgG1 kappa, clone QBEnd 10; Dako); and anti-human c-kit/CD117 (polyclonal rabbit; Dako).

Immunofluorescence and C-Kit⁺ Cell Quantification

Immunofluorescence was performed on 6- μ m thick sections of frozen tissue. Mouse anti-human c-kit (clone 104D; Dako) was combined with rabbit anti-human mast cell tryptase fluorescein isothiocyanate (FITC) (sc-32889; Santa Cruz) or mouse anti- α -smooth muscle actin (SMA) FITC (anti- α -SMA FITC; Sigma) by isotype control subjects.

Cells quantification was performed in small pulmonary arteries (diameter <200 μ m) from two blocks of nine patients with IPAH and five control subjects, by semiquantitative methods using a Nikon eclipse 80i camera and NIH image software. Results were expressed as number of cells by square millimeter of surface (including wall and adventitia).

Quantification of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 Immunostaining in Pulmonary Arteries

A total of 100 pulmonary arteries from five control subjects and 100 pulmonary arteries from six patients with IPAH (with a diameter <400 μ m) for each immunostaining (CXCL12/SDF-1 and CXCR4) was randomly selected and analyzed. Quantitative analysis was performed and immunostaining was evaluated as absent, mild, moderate, or intense for each pulmonary artery. The results were expressed as the proportion of pulmonary arteries expressing moderate or intense immunostaining of CXCL12/SDF-1 or CXCR4 in patients with IPAH and control subjects.

Quantification of Adventitia Pulmonary Arteries and Vasa Vasorum Expressing CD34

A total of 55 pulmonary arteries from seven control subjects and 68 pulmonary arteries from seven patients with IPAH were analyzed. Measurements of volume occupied by adventitia, vasa vasorum CD34⁺, and total volume of pulmonary arteries (including lumen, wall, and adventitia) were performed by point counting using a grid. Points from adventitia, vasa vasorum CD34⁺, and the total pulmonary arteries falling within the grid were counted; each point corresponds to a known volume. Results were expressed as ratio of volume of adventitia to total volume of pulmonary arteries (Vadv, %) and ratio of volume of vasa vasorum CD34⁺ to total volume of pulmonary arteries (Vvv, %). We used the NIH image software (<http://rsbweb.nih.gov/ni-image/>) to determine pulmonary artery diameter (in micrometer). Comparisons for Vadv and Vvv in control subjects and patients with IPAH were performed according to pulmonary artery diameter: less than 200, 200–400, and more than 400 μ m.

Real-time Polymerase Chain Reaction in Total Lungs and Laser-captured Microdissection of Pulmonary Arteries

RNA extraction and real-time polymerase chain reaction (PCR) were performed in total lungs and microdissected small pulmonary arteries (<200 μ m) were captured using the ASLMD laser microdissection microscope (Leica) from patients with IPAH and control subjects. C-kit and β -actin expression were quantified by real-time PCR performed on an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) using TaqMan gene expression assays. Relative gene expression was calculated using the delta-delta Ct method.

Plasma Measurement of Soluble C-Kit and CXCL12/SDF-1 α by ELISA

Soluble c-kit and CXCL12/SDF-1 α were measured by quantitative sandwich enzyme immunoassay technique in plasma from patients with IPAH and control subjects matched for age and sex (human soluble c-kit quantikine immunoassays and human CXCL12/SDF-1 DuoSet; R&D Systems).

Fluorescence-activated Cell Sorter Analysis of Circulating Hematopoietic Progenitors

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from patients with IPAH and control subjects matched for age and sex were stained with DAPI; FITC-conjugated anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56 (Becton Dickinson); anti-blood dendritic cell antigen-1, -2, and -3 (Miltenyi Biotech) and anti-CD123 (Biolegend) monoclonal antibodies; PE-conjugated anti-CD133 (Miltenyi Biotech); PE-Cy5-conjugated anti-CXCR4 and PE-Cy7-conjugated anti-c-kit/c-kit (Biolegend); and APC-conjugated anti-CD34 (Becton Dickinson). According to these markers, two sets of progenitors were identified: the lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) and the lin-CD34^{low}CD133⁻ (c-kit^{low}CXCR4^{high}) populations that we quantified as percentage of DAPI-negative alive PBMCs. Representative histograms for CD133, CXCR4, and c-kit expression measured by flow cytometry, at the cell surface of the lin-CD34^{high} and lin-CD34^{low} populations, are presented in the online supplement (*see* Figure E1).

Statistical Evaluation

Unless otherwise expressed, quantitative variables were presented as mean \pm SD. Between groups, comparisons were made with Student or Mann-Whitney tests according to the normality of the distribution. *P* values less than 0.05 were considered to reflect statistical significance.

RESULTS

Infiltration of Pulmonary Arterial Lesions by C-Kit⁺ Cells

Immunohistochemistry for c-kit showed a marked infiltration of c-kit⁺ cells in the vicinity of remodeled pulmonary arteries of patients with IPAH with a predominant perivascular distribution (Figure 1A). Infiltrations of c-kit⁺ cells were also observed

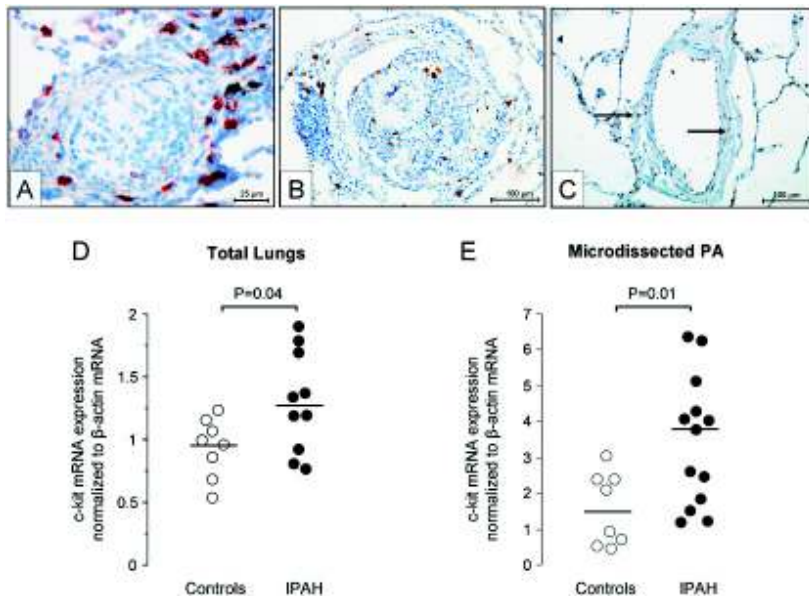


Figure 1. Infiltration of pulmonary arterial lesions by c-kit⁺ cells is associated with an increased expression of c-kit mRNA. (A) Immunohistochemistry for c-kit showed cell infiltration and positive staining for c-kit (red staining) with a perivascular distribution, in a representative pulmonary arterial lesion (intimal thickening) of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH). (B) Immunohistochemistry for c-kit showed infiltration of c-kit⁺ cells in a representative plexiform lesion of patients with IPAH. (C) Immunohistochemistry for c-kit showed rare c-kit⁺ cells (arrows) in the adventitia in a representative control pulmonary artery. (D) Real-time polymerase chain reaction quantification of gene expression showed a significant increase of c-kit mRNA normalized to β-actin mRNA in total lungs from patients with IPAH compared with control subjects (n = 8). (E) Laser capture microdissection and real-time polymerase chain reaction confirmed a significant increase of c-kit mRNA in microdissected small pulmonary arteries from patients with IPAH (n = 13) compared with control subjects (n = 8). PA = pulmonary artery.

in plexiform lesions of patients with IPAH (Figure 1B), whereas only rare c-kit⁺ cells were observed in the adventitia of pulmonary arteries (Figure 1C).

Increase of C-Kit mRNA Expression in Total Lungs and Microdissected Pulmonary Arteries of Patients with IPAH

Real-time PCR quantification of gene expression showed a significant increase of c-kit mRNA normalized to β-actin mRNA in

total lungs from patients with IPAH (n = 10) compared with control subjects (n = 8) (1.3 ± 0.4 and 0.9 ± 0.2, respectively; P = 0.04) (Figure 1D). Real-time PCR of microdissected small pulmonary arteries demonstrated a significant increase of c-kit mRNA in microdissected small pulmonary arteries from patients displaying PAH (n = 13), compared with control subjects (n = 8) (3.5 ± 1.8 and 1.6 ± 1, respectively; P = 0.01) (Figure 1E).

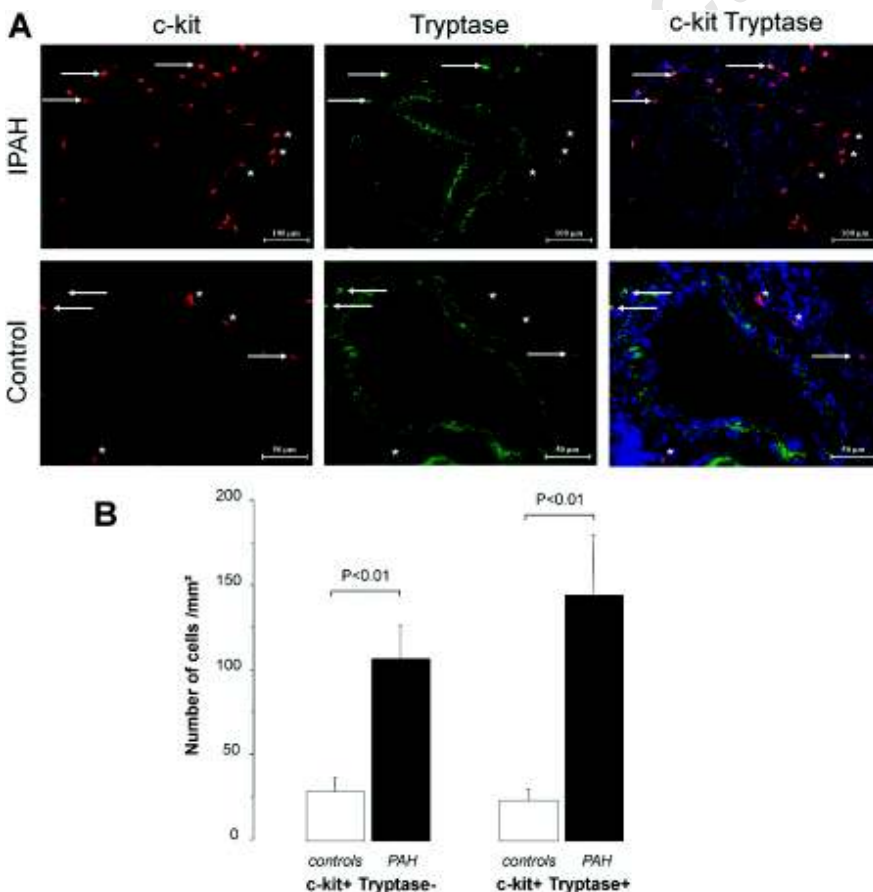


Figure 2. Qualitative and quantitative analyses of c-kit⁺ cells by double-staining c-kit/tryptase. (A) Representative staining for c-kit (red, left panel), tryptase (green, middle panel), and merge (right panel) for c-kit, tryptase, and DAPI (blue) in a representative pulmonary artery from a patient with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) (upper panels) and a control subject (lower panels). Both c-kit⁺ tryptase⁻ (asterisks) progenitor cells and c-kit⁺ tryptase⁺ (arrows) mast cells largely infiltrated the adventitia of patients with IPAH pulmonary arterial lesions and were scarcely present in the adventitia of control pulmonary arteries. (B) Quantification of double positive c-kit/tryptase cells in IPAH lesions showed a significant increase of c-kit⁺ tryptase⁻ progenitor cells and c-kit⁺ tryptase⁺ mast cells compared with control subjects.

Both C-Kit⁺ Tryptase⁻ Progenitor Cells and C-Kit⁺Tryptase⁺ Mast Cells Contribute to C-Kit⁺ Cell Accumulation in the Remodeled Pulmonary Arteries of Patients with IPAH

Measurement of c-kit⁺ cell number in tissue sections showed a significant fivefold increase of c-kit⁺ cells in the adventitia of pulmonary arteries from patients with IPAH compared with control subjects (250.4 ± 147.8 and $51.3 \pm 10.7/\text{mm}^2$, respectively; $P < 0.01$). The double staining for c-kit and tryptase showed a significant increase of c-kit⁺tryptase⁻ progenitor cells (106.6 ± 54.5 vs. $28 \pm 16.8/\text{mm}^2$; $P < 0.01$) and c-kit⁺tryptase⁺ mast cells (143.8 ± 101.1 vs. $23.3 \pm 11.9/\text{mm}^2$; $P < 0.01$) (Figure 2), indicating that mast cells may also contribute to increase in c-kit⁺ cells in IPAH vascular lesions.

Increased Plasma Levels of Mobilizing Factors for BM-derived Progenitor C-Kit⁺ Cells Are Associated to Mobilization of C-Kit⁺ Cells from the BM into the Circulation

Plasma concentration of soluble c-kit was increased in patients with IPAH ($n = 26$) compared with control subjects ($n = 12$) (27.4 ± 12.4 and 19.5 ± 5.8 ng/ml, respectively; $P = 0.03$) (Figure 3A). In contrast, no difference was observed in plasma concentration of CXCL12/SDF1- α in patients with PAH and control subjects (2.9 ± 0.6 and 2.7 ± 0.4 pg/ml, respectively; $P = 0.22$) (Figure 3B).

Flow cytometric analysis (Figure 4) showed a significant increase of the percentage of lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) and lin-CD34^{low}CD133⁻ (c-kit^{low}CXCR4^{high}) cells in PBMCs of patients with PAH compared with control subjects (all $P = 0.01$) (Table 1). Mean fluorescence intensity of CXCR4 was significantly decreased in lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) and increased in lin-CD34^{low}CD133⁻ (c-kit^{low}CXCR4^{high}) cells of patients with PAH compared with control subjects ($P = 0.004$ and $P = 0.03$, respectively). Mean fluorescence intensity of c-kit was significantly decreased in lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) of patients with PAH compared with control subjects ($P = 0.004$) (Table 1).

Immunohistochemical Localization of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 Expression in Pulmonary Arterial Lesions

In small remodeled pulmonary arteries and plexiform lesions from patients with IPAH, CXCL12/SDF-1 expression was mainly localized in luminal endothelial cells (Figure 5A–5C) and endothelial cells of the vasa vasorum (Figure 5B). Only

a mild or absent CXCL12/SDF1 expression was observed in control pulmonary arteries (Figure 5D).

CXCR4 was mainly expressed in luminal endothelial cells (Figure 5E), endothelial cells of the vasa vasorum, and in perivascular cells infiltrating the lesions (Figure 5F) of small remodeled pulmonary arteries and plexiform lesions (Figure 5G). CXCR4 expression was mild or absent in control pulmonary arteries (Figure 5H).

Quantification of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 immunostaining showed an increased proportion of pulmonary arteries expressing CXCL12/SDF-1 and CXCR4 in patients with IPAH (76 of 100 and 72 of 100, respectively) compared with control subjects (12 of 100 and 9 of 100; all $P < 0.001$).

Pulmonary Arterial Lesions Are Associated with Expansion of Surrounding Vasa Vasorum Expressing CD34 in Which Infiltrating C-Kit⁺ Cells Are Localized

In pulmonary arterial lesions of IPAH, we observed a large development of CD34⁺ vessels around the remodeling pulmonary arteries and plexiform lesions, suggesting an expansion of vasa vasorum (Figure 6A–6C). Immunostaining for c-kit and CD34 in consecutive slides showed that c-kit⁺ cells have a perivascular distribution and seem to be localized in these small CD34⁺ vessels surrounding the remodeled pulmonary arteries (Figure 6E–6H).

The quantification of adventitia and vasa vasorum expansion showed a significant increase of Vadv and Vvv ratios in pulmonary arteries of patients with IPAH ($55.9 \pm 10.7\%$ and $25.2 \pm 7.8\%$, respectively) compared with control subjects ($23.8 \pm 8.8\%$ and $8.8 \pm 4.4\%$, respectively; all $P < 0.001$). Quantification according to pulmonary artery diameter confirmed significant expansion of adventitia and vasa vasorum in pulmonary arteries with a diameter less than 200, 200–400, and greater than 400 μm (see Figure E2; all $P < 0.0001$).

Cells Expressing Both C-Kit⁺ and α -SMA⁺ Are Found in Pulmonary Arterial Lesions

Double immunofluorescence for c-kit and α -SMA showed that some rare (<1%) c-kit⁺ cells observed around pulmonary arterial

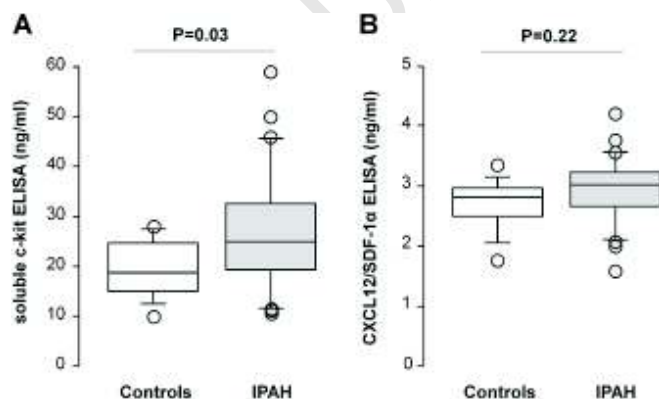


Figure 3. Plasmatic concentration of soluble c-kit and CXCL12/SDF1- α quantified by ELISA. (A) Plasmatic concentration of soluble c-kit was increased in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH) compared with control subjects. (B) No difference was observed in plasmatic concentration of CXCL12/SDF1- α in patients with IPAH and control subjects.

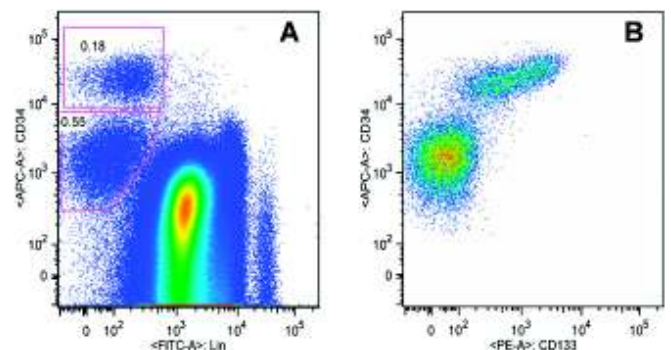


Figure 4. Flow cytometry analysis of circulating progenitors. Based on the expression of CD34, c-kit/CD117, CXCR4, and CD133 and the absence of lineage-specific markers (lineage markers, [lin]: CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56, blood dendritic cell antigen-1, -2, and -3, and CD123), we identified two populations of circulating bone marrow-derived cells in peripheral blood mononuclear cells: lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) and lin-CD34^{low}CD133⁻ (c-kit^{low}CXCR4^{high}). (A) C-kit^{high} cells express high level of CD133 as endothelial progenitors do. (B) The values shown on this dot plot are percentages of alive DAPI⁻ cells. Quantification of these two populations in patients and control subjects is shown in Table 1 and indicates a significant increase of both populations in patients with pulmonary arterial hypertension.

TABLE 1. CIRCULATING BONE MARROW-DERIVED CELLS QUANTIFIED BY FACS ANALYSIS IN PATIENTS WITH PAH AND CONTROL SUBJECTS

	PAH (n = 9)	Controls (n = 7)	P Value
Lin-CD34 ^{high} CD133 ^{high} (c-kit ^{high} CXCR4 ^{low})	0.160 ± 0.080	0.067 ± 0.041	0.01
Mean fluorescence intensity CD133	1,283 ± 268	1,139 ± 84	0.43
c-kit	1,386 ± 175	1,674 ± 174	0.004
CXCR4	179.6 ± 19.6	252.6 ± 51.6	0.004
Lin-CD34 ^{low} CD133 ⁻ (c-kit ^{low} CXCR4 ^{high})	0.424 ± 0.225	0.184 ± 0.119	0.01
Mean fluorescence intensity c-kit	141.1 ± 86.5	109.3 ± 27.6	0.79
CXCR4	1,149 ± 353	806 ± 257	0.03

Definition of abbreviations: FACS = fluorescence-activated cell sorter; PAH = pulmonary arterial hypertension.

Lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}) and lin-CD34^{low}CD133⁻ (c-kit^{low}CXCR4^{high}) populations were expressed as % of total DAPI negative alive peripheral blood mononuclear cells.

Mean fluorescence intensities are expressed in arbitrary units and results are expressed as mean ± SD.

lesions may also express α -SMA (see Figure E3). No c-kit⁺ α -SMA⁺ cells were observed in control subjects.

DISCUSSION

This is the first study to provide a detailed and quantitative topographic analysis of c-kit expression and BM-derived cells and potential mobilizing and recruiting factors in the pulmonary vessels and in the bloodstream of patients with IPAH. This study demonstrates that in IPAH, c-kit⁺ cells (corresponding to both progenitors and mast cells) accumulate in the remodeled pulmonary arteries. This is associated with an increase in the BM-derived progenitor cell mobilizing soluble factor c-kit and the mobilization of circulating progenitors. Indeed, 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. In this study, we report that in patients with IPAH, the increased expression of c-kit mRNA in pulmonary arterial lesions is associated with perivascular recruitment of c-kit⁺ cells, including BM-derived progenitors. These results are in accordance with previous reports in animal models, showing that hypoxia may induce mobilization of c-kit⁺ cells from the BM into the circulation and is associated with infiltration of c-kit⁺ cells in the remodeled pulmonary arteries (12). Even if the presence of c-kit⁺ cells

does not confirm the pathogenic role of these cells in the pathophysiology of PAH, increasing evidence suggests that these cells may be deleterious in this context (12). We recently demonstrated that imatinib, a tyrosine kinase inhibitor that blocks platelet-derived growth factor receptors and c-kit, may decrease the recruitment of c-kit⁺ cells in pulmonary arterial lesions of hypoxic mice and improve pulmonary arterial remodeling (22). It is established that c-kit is also expressed on minor subsets of dendritic cells (23). In accordance with our previous finding (24), we found that a small fraction of perivascular c-kit⁺ cells were also MHC-II, meaning that some c-kit⁺ cells are either dendritic cells or other antigen-presenting cells (see Figure E4). Moreover, Davie and coworkers (12) have shown that hypoxia results in an expansion of the pulmonary artery adventitial vasa vasorum in calves. We observed the same pattern in IPAH lungs with a dramatic expansion of vasa vasorum around remodeled pulmonary arteries and plexiform lesions. As described by Davie and coworkers (12), most of the c-kit⁺ cells were localized within or contiguous to vasa vasorum in the adventitia of remodeled vessels. Furthermore, we showed that vasa vasorum strongly expressed CXCL12/SDF-1 α compared with control subjects, suggesting that their expansion may participate in the recruitment of c-kit⁺ cells in IPAH. Furthermore, it has been previously demonstrated that c-kit⁺ cells mobilized from the BM cells may differentiate into vascular

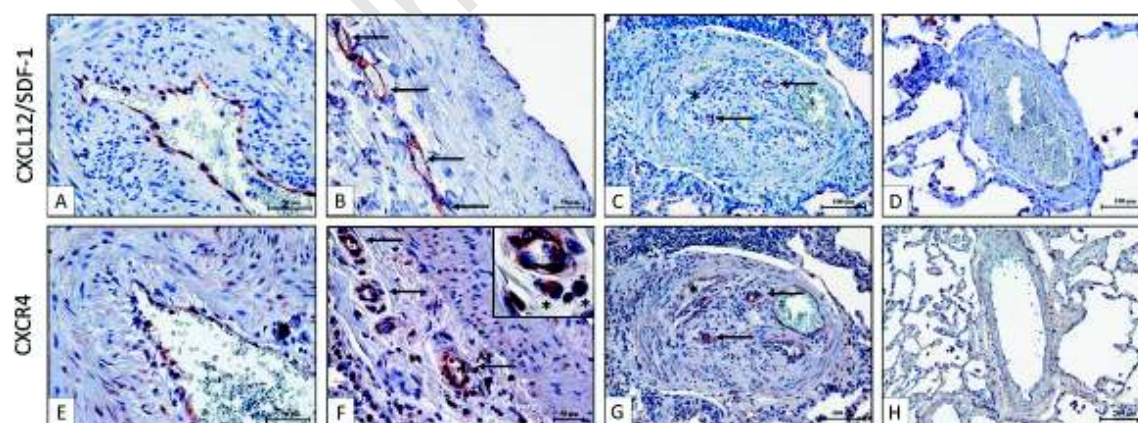


Figure 5. Immunohistochemistry of CXCL12/SDF-1 and CXCR4 in pulmonary arterial lesions. (A) In lungs from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH), CXCL12/SDF-1 expression was observed in luminal endothelial cells of small pulmonary arteries with constrictive remodeling or plexiform lesions. (B) The adventitial layer of remodeled arteries from

patients with IPAH mainly displayed CXCL12/SDF-1 expression within the vasa vasorum (arrows). (C) In addition, endothelial cell expression of CXCL12/SDF-1 was demonstrated within plexiform lesions of patients with IPAH. (D) CXCL12/SDF-1 expression was mild or absent in pulmonary arteries of control subjects. (E) CXCL12-receptor CXCR4 was expressed in endothelial cells of remodeled pulmonary arteries from patients with IPAH. (F) CXCR4 expression within the adventitial layer of remodeled arteries from patients with IPAH was mainly confined to the vasa vasorum (arrows) and to perivascular cells infiltrating the lesions (asterisks). (G) Endothelial cell expression of CXCR4 was demonstrated within plexiform lesions of patients with IPAH. (H) In contrast, CXCR4 expression in pulmonary arteries from control subjects was mild and frequently absent.

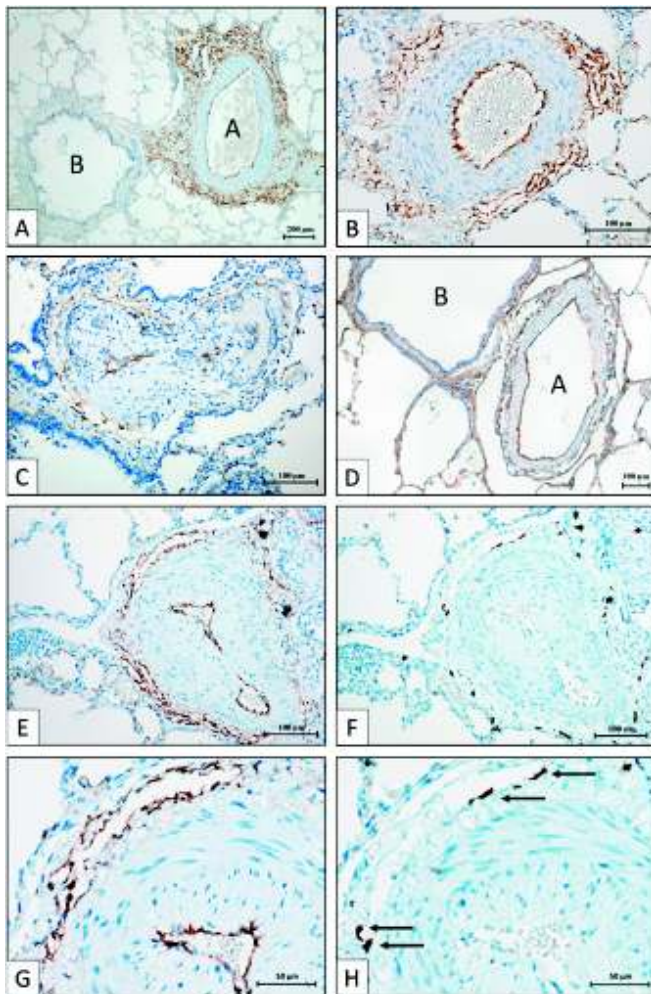


Figure 6. Immunohistochemical localization of CD34 and c-kit expression in pulmonary arterial lesions. In pulmonary arterial lesions of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension (IPAH), we observed the presence of a large expansion of vasa vasorum CD34⁺ vessels around the remodeled pulmonary arteries (A, B) and plexiform lesions (C). CD34 staining showed rare CD34⁺ vessels around pulmonary arteries of control subjects (D). Immunostaining for CD34 (E, G) and c-kit (F, H) in consecutive sections confirmed that c-kit⁺ cells had a perivascular distribution and seemed to be localized in these small CD34⁺ vessels surrounding the remodeled pulmonary arteries (arrows). A = artery; B = bronchus.

cells and that hypoxia enhances differentiation of VEGFR2⁺/c-kit⁺ cells into α -SMA⁺ cells (10, 11, 25). Frid and coworkers (26) has recently demonstrated that c-kit⁺ cells were present in media and adventitia of distal pulmonary arteries from neonatal hypoxic claves. Interestingly, the authors demonstrated that c-kit⁺ cells may be grown from the vascular lesions and can express α -SMA in this model. In addition, these cells can express inflammatory and proliferative factors that stimulate proliferation of other resident vascular wall cells supporting the idea that c-kit-expressing cells could contribute both directly and indirectly to the vascular remodeling process (26). In the present study, we found rare c-kit⁺ cells expressing α -SMA, reinforcing the hypothesis that c-kit⁺ cells may also directly participate in vascular remodeling. However, c-kit⁺/SMA⁺ cells could also be myofibroblasts or, considering the fact that c-kit⁺/SMA⁺ cells are observed in the embryonic lung (27), dual positive staining may be indicative of the reversion of existing pulmonary SMCs to a fetal program. *In vitro* studies are

necessary to determine the potential of c-kit⁺ progenitor cells to differentiate into SMCs.

As previously reported in IPAH, in PAH associated with congenital heart diseases (14, 15, 28), and in experimental pulmonary hypertension (12, 13), we confirmed that IPAH is associated with an increased number of mast cells in pulmonary arterial lesions. It is now recognized that mast cells may be involved in a variety of adaptive or pathologic responses associated with chronic inflammation (16) and may be involved in airway and cardiac remodeling process (17, 18, 29, 30). Interestingly, the role of lung mast cells in animal models of hypoxic pulmonary hypertension has been recently reported (31, 32).

Recent studies highlight that circulating inflammatory and BM-derived progenitor cells may contribute to vascular remodeling in some forms of systemic cardiovascular disease, such as atherosclerosis and myocardial infarction (10, 33–36). Diller and coworkers (37) showed that the number of circulating endothelial progenitor cells (EPC) was low in patients with Eisenmenger syndrome and IPAH compared with control subjects, and that reduction in EPC numbers correlated with severity of the disease. The apparent discrepancy between studies showing that IPAH is either linked to an increase in circulating EPC (38, 39) or a depletion (40, 41) may be explained by different cell types or timing of analysis. Early in the disease, pulmonary endothelial injury might be compensated by an increase in circulating EPC, in an attempt to repair. Later in the disease, reduction of EPCs could reflect overwhelmed EPC repair response, enhanced homing to the pulmonary vasculature, and pulmonary vascular remodeling. In our study, increased mobilization of BM-derived cells was associated with a significant elevation in plasma concentration of soluble c-kit. Of note, it was reported that the levels of circulating soluble c-kit positively correlated with the numbers of CD34⁺ cells in mobilized peripheral blood (42) and that soluble c-kit competes with the c-kit receptor and blocks binding to stem cell factor (43). The enhanced mobilization of c-kit⁺ progenitors from the BM caused by increased concentration of soluble c-kit could also be potentiated by the decreased expression of c-kit on the lin-CD34^{high}CD133^{high} (c-kit^{high}CXCR4^{low}), potentially leading to a decreased sensitivity of these cells to the BM homing chemokine SCF. This pathway could explain at least in part the significant accumulation of c-kit⁺ progenitors cells around IPAH pulmonary vascular lesions. Although we measured an accumulation of c-kit⁺ cells around remodeled vessels in IPAH lungs, we do not know the relative involvement of each circulating CD34^{high}CD133^{high} and CD34^{low}CD133⁻ populations in pulmonary vascular remodeling. Hence, an ongoing study will allow us to ascertain the link between CD34^{low}CD133⁻, fibrocytes and myofibroblastic remodeling of PAH lesions.

Finally, this study characterizing the infiltration of c-kit⁺ cells and c-kit expression in pulmonary arterial lesions of idiopathic PAH may have clinical implications in the development of new therapeutic strategies for this devastating disease. It has been recently demonstrated that tyrosine kinase inhibitors, such as imatinib, or combined tyrosine and multiple kinase inhibitor, such as sorafenib, may improve experimental pulmonary hypertension in animal models (44, 45). The efficacy of these drugs is thought to be linked to the inhibition of platelet-derived growth factor receptor. Imatinib is currently being tested in IPAH (46–48). However, tyrosine kinase inhibitors have multiple targets in the large family of kinase receptors, leading to difficulties predicting the risk–benefit ratio of these drugs. In particular, it has been clearly demonstrated that imatinib or sorafenib may induce potential cardiac toxicity, raising the problem of safety in patients with IPAH with

underlying right heart failure (49, 50). Furthermore, many alternative kinase inhibitors are available in the field of oncology, and there is an urgent need to define better the tyrosine kinase targets of interest in the context of IPAH to screen drugs with the lowest risk–benefit ratio. Interestingly, imatinib and sorafenib have the potential to inhibit c-kit and we recently reported that imatinib reduces perivascular accumulation of BM-derived c-kit⁺ cells in mice exposed to chronic hypoxia. These data suggest that the beneficial effect of tyrosine kinase inhibitors may at least in part be caused by the reduction of c-kit⁺ cell recruitment (22).

In conclusion, we have demonstrated the potential involvement of c-kit⁺ cells, including hematopoietic progenitors and mast cells, in IPAH. Recruitment of c-kit⁺ cells in pulmonary vascular lesions is associated with an increase in the BM-derived progenitor cell mobilizing soluble factor c-kit, the mobilization of circulating progenitors, and an expansion of vasa vasorum expressing CXL12/SDF-1 α . According to experimental data in the literature, these data suggest that c-kit and vasa vasorum expansion may be novel targets for innovative therapies in the field of IPAH.

Author Disclosure: None of the authors has a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

Acknowledgment: The authors thank Isabelle Klingelschmitt for her technical support.

References

- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004;351:1425–1436.
- Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tudor RM. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:25S–32S.
- Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004;43:13S–24S.
- Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, Hayashi S, Kunisada T, Sudo T, Kina T, Nakauchi H, Nishikawa S. Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991;174:63–71.
- Miettinen M, Lasota J. Kit (cd117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2005;13:205–220.
- Ashman LK, Buhning HJ, Aylett GW, Broudy VC, Muller C. Epitope mapping and functional studies with three monoclonal antibodies to the c-kit receptor tyrosine kinase, yb5.B8, 17f11, and sr-1. *J Cell Physiol* 1994;158:545–554.
- Lerner NB, Nocka KH, Cole SR, Qiu FH, Strife A, Ashman LK, Besmer P. Monoclonal antibody yb5.B8 identifies the human c-kit protein product. *Blood* 1991;77:1876–1883.
- Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG, Clogston CL, Lu HS, Broudy VC, Bartley TD, Parker VP, Langley KE. Soluble kit receptor in human serum. *Blood* 1995;85:66–73.
- Yarden Y, Kuang WJ, Yang-Feng T, Coussens L, Munemitsu S, Dull TJ, Chen E, Schlessinger J, Francke U, Ullrich A. Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand. *EMBO J* 1987;6:3341–3351.
- Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403–409.
- Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Limana F, Jakoniuk I, Quaini F, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, Anversa P. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10344–10349.
- Davie NJ, Crossno JT Jr, Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, Carpenter TC, Brunetti JA, McNiece IK, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286:L668–L678.
- Crossno JT Jr, Garat CV, Reusch JE, Morris KG, Dempsey EC, McMurtry IF, Stenmark KR, Klemm DJ. Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;292:L885–L897.
- 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.
- Heath D, Yacoub M. Lung mast cells in plexogenic pulmonary arterio-pathy. *J Clin Pathol* 1991;44:1003–1006.
- Metz M, Grimbaldston MA, Nakae S, Piliponsky AM, Tsai M, Galli SJ. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation. *Immunol Rev* 2007;217:304–328.
- Okayama Y, Ra C, Saito H. Role of mast cells in airway remodeling. *Curr Opin Immunol* 2007;19:687–693.
- Janicki JS, Brower GL, Gardner JD, Forman MF, Stewart JA Jr, Murray DB, Chancey AL. Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload. *Cardiovasc Res* 2006;69:657–665.
- Montani D, Perros F, Gambaryan N, Dorfmueller P, Girerd B, Simonneau G, Hammad H, Lambrecht B, Launay J, Cohen-Kaminsky S, et al. Bone marrow derived c-kit positive cells in pulmonary arterial hypertension [abstract]. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;A96:1668.
- Perros F, Montani D, Dorfmueller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, et al. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:81–88.
- Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, et al. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:1023–1030.
- Gambaryan N, Perros F, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Mazmanian M, Renaud J, Simonneau G, Lombet A, Humbert M. Targeting of c-kit⁺ hematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2010.
- Ray P, Krishnamoorthy N, Ray A. Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells: regulators of T cell differentiation. *Cell Cycle* 2008;7:2826–2832.
- Perros F, Dorfmueller P, Souza R, Durand-Gasselin I, Mussot S, Mazmanian M, Herve P, Emilie D, Simonneau G, Humbert M. Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2007;29:462–468.
- Satoh K, Fukumoto Y, Nakano M, Sugimura K, Nawata J, Demachi J, Karibe A, Kagaya Y, Ishii N, Sugamura K, et al. Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1. *Cardiovasc Res* 2009;81:226–234.
- Frid M, Li M, Gnanasekharan M, Burke D, Fragoso M, Strassheim D, Sylman J, Stenmark K. Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and prometogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;297:L1059–L1072.
- Shinkai T, Shinkai M, Pirker MA, Montedonico S, Puri P. Spatial and temporal patterns of c-kit positive cells in embryonic lungs. *Pediatr Surg Int* 2010.
- Hamada H, Terai M, Kimura H, Hirano K, Oana S, Niimi H. Increased expression of mast cell chymase in the lungs of patients with congenital heart disease associated with early pulmonary vascular disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1303–1308.
- Matsumoto T, Wada A, Tsutamoto T, Ohnishi M, Isono T, Kinoshita M. Chymase inhibition prevents cardiac fibrosis and improves diastolic dysfunction in the progression of heart failure. *Circulation* 2003;107:2555–2558.
- Levick SP, Gardner JD, Holland M, Hauer-Jensen M, Janicki JS, Brower GL. Protection from adverse myocardial remodeling secondary to chronic volume overload in mast cell deficient rats. *J Mol Cell Cardiol* 2008;45:56–61.
- Maxova H, Vasilkova M, Novotna J, Vajnerova O, Banasova A, Vizek M, Hergert J. Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate delayed the regression of hypoxic pulmonary hypertension in rats. *Respiration* 2010.
- Banasova A, Maxova H, Hampl V, Vizek M, Povysilova V, Novotna J, Vajnerova O, Hnilickova O, Hergert J. Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia. *Respiration* 2008;76:102–107.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M, Isner JM. Bone marrow origin of endothelial

- progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221–228.
34. Sata M. Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:1008–1014.
35. Burke SE, Lubbers NL, Chen YW, Hsieh GC, Mollison KW, Luly JR, Wegner CD. Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin. *J Cardiovasc Pharmacol* 1999;33:829–835.
36. Sahara M, Sata M, Morita T, Nakamura K, Hirata Y, Nagai R. Diverse contribution of bone marrow-derived cells to vascular remodeling associated with pulmonary arterial hypertension and arterial neointimal formation. *Circulation* 2007;115:509–517.
37. Diller GP, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bedard E, Gibbs JS, Bauersachs J, et al. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2008;117:3020–3030.
38. Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, et al. Evidence for dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2009.
39. Asosingh K, Aldred MA, Vasanthi A, Drazba J, Sharp J, Farver C, Comhair SA, Xu W, Licina L, Huang L, et al. Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol* 2008;172:615–627.
40. Fadini GP, Schiavon M, Rea F, Avogaro A, Agostini C. Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;176:724–725, author reply 725.
41. Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, Junzhu C. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 2008;102:1073–1079.
42. Ishiga K, Kawatani T, Tajima F, Omura H, Nanba E, Kawasaki H. Serum-soluble c-kit levels during mobilization of peripheral blood stem cells correlate with stem cell yield. *Int J Hematol* 2000;72:186–193.
43. Turner AM, Bennett LG, Lin NL, Wypych J, Bartley TD, Hunt RW, Atkins HL, Langley KE, Parker V, Martin F, et al. Identification and characterization of a soluble c-kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* 1995;85:2052–2058.
44. Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, et al. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005;115:2811–2821.
45. Klein M, Schermuly RT, Ellinghaus P, Milting H, Riedl B, Nikolova S, Pullamsetti SS, Weissmann N, Dony E, Savai R, et al. Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling. *Circulation* 2008;118:2081–2090.
46. Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005;353:1412–1413.
47. Ghofrani H, Morrell N, Hoeper M, Olschewski H, Peacock A, Barst R, Shapiro S, Quinn D, Pascoe S. Long term use of imatinib in patients with severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2010;181:A2513.
48. Souza R, Sitbon O, Parent F, Simonneau G, Humbert M. Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2006; 61:736.
49. Chen MH, Kerkela R, Force T. Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics. *Circulation* 2008;118:84–95.
50. Kerkela R, Grazette L, Yacobi R, Iliescu C, Patten R, Beahm C, Walters B, Shevtsov S, Pesant S, Clubb FJ, et al. Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate. *Nat Med* 2006;12:908–916.

3 Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence la contribution de progéniteurs c-kit+/triptase- et des mastocytes c-kit+/triptase+ dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Nous avons montré une augmentation significative de deux populations de progéniteurs circulants : les progéniteurs angiogéniques $\text{lin}^- \text{CD34}^{\text{high}} \text{CD133}^{\text{high}} (\text{c-kit}^{\text{high}} \text{CXCR4}^{\text{low}})$ et des progéniteurs mésenchymateux $\text{lin}^- \text{CD34}^{\text{low}} \text{CD133}^- (\text{c-kit}^{\text{low}} \text{CXCR4}^{\text{high}})$ chez les patients souffrant d'HTAP. Nous avons également montré *in vitro* que les deux populations répondent au signal induit par la chimiokine CXCL12, qui est la principale voie de recrutement des progéniteurs vers les sites lésionnels chez l'homme. De façon cohérente, le taux plasmatique d'un facteur mobilisant les cellules c-kit+, le c-kit soluble, était augmenté chez les patients atteints d'HTAP. L'analyse histologique des coupes de poumons HTAP a montré une forte expression de CXCR4 et CXCL12 dans des artères remodelées et des lésions plexiformes des patients HTAP. Bien qu'au niveau pulmonaire la chimiokine CXCL12 était significativement surexprimée, son taux dans le plasma n'était pas altéré par rapport aux sujets témoins. Cependant, les taux circulants de chimiokines ne reflètent pas forcément pas leur expression locale au niveau des artères remodelées. Ainsi, la quantification des vaisseaux CD34+ confirme que les lésions vasculaires sont associées à l'expansion de *vasa vasorum* dans laquelle les progéniteurs c-kit+ sont probablement impliqués. Il a été également montré que les cellules c-kit+ se différencient en cellules CML «like» *in vivo* et sont potentiellement impliquées dans le remodelage vasculaire.

Dans cette étude nous avons montré que l'augmentation d'ARNm codant pour c-kit corrèle avec le recrutement périvasculaire de cellules c-kit+, y compris les progéniteurs c-kit+. Ces résultats sont en accord avec les travaux menés dans les modèles animaux montrant que la mobilisation des cellules dérivées de la moelle osseuse est associée avec leur recrutement vasculaire pulmonaire sous l'effet de l'hypoxie chronique (Davie et al. 2004). Le rôle des cellules c-kit+ autour des vaisseaux remodelés n'est pas encore clairement établi. Néanmoins, de plus en plus de données indiquent qu'elles participent à la pathogenèse de l'HTAP. Dans le modèle d'HTAP induite par l'hypoxie chronique chez les veaux nouveau-nés, les cellules mononuclées

circulantes semblent se différencier en cellules endothéliales et en cellules musculaires lisses, en fonction des conditions de culture, ce qui laisse supposer leur implication potentielle dans le remodelage vasculaire pulmonaire (Davie et al. 2004). Dans le même modèle, les études récentes montrent un rôle bénéfique des statines et d'antagonistes de PPAR γ sur le remodelage artériel. Cet effet a été associé à la diminution des cellules CXCR4+/VEGFR2+/c-kit+ dans l'adventice des vaisseaux remodelés (Crossno et al. 2007; Satoh et al. 2009). Tandis qu'on considère habituellement les cellules c-kit+ comme originaires de la moelle osseuse, certains articles indiquent que c-kit pourrait être exprimé par les fibroblastes pulmonaires suggérant que cette voie de signalisation pourrait être impliquée dans la migration et la prolifération des fibroblastes pulmonaires (Ling et al. 2010). c-kit pourrait également être exprimé à la surface des cellules dendritique (Ray et al. 2008). Afin de vérifier la nature des cellules c-kit+ infiltrant les lésions vasculaires pulmonaire d'HTAP, nous avons réalisé des doubles marquages c-kit/MHC class II sur les coupes de poumons HTAP. Nous avons pu mettre en évidence deux populations phénotypiquement bien distinctes : les progéniteurs c-kit+ et les cellules présentatrices d'antigène CMH class II+. Les cellules c-kit+ recrutées au niveau périvasculaire ne sont donc pas des cellules dendritiques ni aucune autre population de CPA. Dans le modèle d'HTAP expérimentale, l'hypoxie chronique est associée avec une expansion des *vasa vasorum* dans l'adventice des artères pulmonaires (Davie et al. 2004). Nous avons observé une forte augmentation des *vasa vasorum* autour des artères remodelées et des lésions plexiformes dans des poumons des patients atteints d'HTAP. Nous avons également montré la surexpression de CXCL12 par les *vasa vasorum*, comparée au contrôle, indiquant que leur expansion peut causer le recrutement de cellules c-kit+ dans l'HTAP. Les publications récentes rapportent que les progéniteurs c-kit+ originaires de la moelle osseuse sont capables de se différencier en cellules vasculaires pulmonaires. Par exemple l'hypoxie favorise la différenciation des cellules c-kit+/VEGFR2+ en cellules α -SMA+ (Orlic et al. 2001; Sata et al. 2002; Satoh et al. 2009). En hypoxie chronique les progéniteurs c-kit+ sont présents dans la media et dans l'adventice des artères remodelées et sont capables, *in vitro*, de produire de l' α -SMA. Ces cellules sont également capables de produire des cytokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissance, permettant la prolifération d'autres types cellulaires résidents. Ces résultats

suggèrent dans les deux cas, que les progéniteurs c-kit+ peuvent participer de façon direct et indirecte au remodelage vasculaire pulmonaire (Frid et al. 2009). Dans notre étude, nous avons mis en évidence la présence de cellules c-kit+/ α -SMA+ au sein des lésions vasculaires pulmonaires, en confirmant l'hypothèse basée sur la participation directe des progéniteurs c-kit+ dans le remodelage vasculaire. Cependant, vu la fréquence très faible de ces cellules nous n'avons pas pu les quantifier.

Une autre population de cellules c-kit+ est présente dans les poumons des patients HTAP. Il s'agit cette fois des mastocytes. Les mastocytes sont également retrouvés dans l'HTAP expérimentale (Davie et al. 2004; Crossno et al. 2007), ainsi que dans l'HTAP associée avec les cardiopathies congénitales (Heath et al. 1991; Hamada et al. 1999; Mitani et al. 1999). Grâce à la production des médiateurs de l'inflammation tels que la tryptase, la chymase, l'activin-A, le TNF- α , le TGF- β et d'autres, les mastocytes sont impliqués dans le remodelage des voies respiratoires et en particulier dans la prolifération des CML (Okayama et al. 2007). Les facteurs sécrétés par les mastocytes sont capables d'activer les métalloprotéinases matricielles et par conséquent, de faciliter le remodelage vasculaire humain et expérimental (Janicki et al. 2006). La participation des mastocytes dans l'HTAP induite par l'hypoxie chez le rat a récemment été signalée (Banasova et al. 2008; Maxova et al. 2010).

Ce travail montre que le recrutement des cellules c-kit+ (les progéniteurs et les mastocytes) et l'expansion de *vasa vasorum* peuvent représenter une cible intéressante dans le but de développer des thérapies innovantes de l'HTAP.

II - LE ROLE DE CXCL₁₂, CXCR₄ ET CXCR₇ DANS LE RECRUTEMENT DES PROGENITEURS C-KIT⁺ DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE EXPERIMENTALE

1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, l'HTAP humaine est associée à un recrutement important de cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse autour des artères remodelées et des lésions plexiformes. En parallèle de cette étude, nous avons mieux voulu comprendre le rôle des progéniteurs c-kit⁺ dans le remodelage vasculaire et l'HTAP. Plusieurs publications récentes rapportent la présence des progéniteurs des cellules endothéliales, de cellules musculaires lisses et des fibroblastes dans des espaces périvasculaires des vaisseaux remodelés (Fadini et al.; Imasawa et al. 2001; Simper et al. 2002). Les données actuelles sont ainsi très incomplètes en ce qui concerne le choix de marqueurs des progéniteurs. Le récepteur de tyrosine kinase c-kit semble être exprimé par l'ensemble de cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse (Ogawa et al. 1991).

Des nombreuses études montrent le rôle clé de la chimiokine CXCL₁₂ et de son récepteur CXCR₄ dans la dissémination des métastases (Muller et al. 2001), le trafic lymphocytaire (Zlotnik et al. 2000) et la mobilisation des progéniteurs hématopoïétiques dans les tissus ischémiques (Simonneau et al. 2009). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, il existe un autre récepteur à 7 domaines transmembranaires capable de lier CXCL₁₂, CXCR₇ (Samson et al. 1996; Joost et al. 2002). CXCR₇ est capable de former un hétérodimer avec CXCR₄ ce qui favorise la transduction du signal (Sierro et al. 2007). Par la suite, de nombreuses études ont permis d'identifier les cellules exprimant CXCR₇ à leur surface. Parmi elles, on retrouve les cellules tumorales, les cellules endothéliales activées, les cellules issues du foie fœtal et d'autres types cellulaires (Burns et al. 2006). CXCR₇ participe également à de nombreux processus tels que la survie cellulaire, l'adhésion et le développement tumorale dans des modèles animaux (Burns et al. 2006). L'expression de CXCL₁₂ ainsi

que ses récepteurs est augmentée en réponse à l'hypoxie et représente donc la voie majeure d'attraction des cellules progénitrices circulantes dans les tissus (Schioppa et al. 2003; Ceradini et al. 2004).

Cette étude avait pour but de déterminer le rôle des progéniteurs hématopoiétiques c-kit⁺ dans le modèle d'HTAP induit par l'hypoxie, en bloquant leur recrutement *via* CXCR₄/CXCL₁₂. Ce travail est basé sur l'hypothèse que les progéniteurs hématopoïétiques c-kit⁺ participent au remodelage vasculaire, l'hypertrophie cardiaque, l'installation et la progression de la maladie. Nous avons voulu vérifier si le blocage du recrutement pulmonaire de ces cellules allait réduire l'ensemble de ces altérations et l'HTAP induite par l'hypoxie.

2 Résultats

Article 2

Targeting of bone-marrow derived c-kit⁺ stem cells prevents hypoxic pulmonary hypertension

Natalia Gambaryan, Frédéric Perros, David Montani, Sylvia Cohen-Kaminsky, Michel Mazmanian, Jean-François Renaud, Gérald Simonneau, Alain Lombet and Marc Humbert.

European Respiratory Journal, 2010. Accepté pour la publication.



Targeting of c-kit+ haematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension

N. Gambaryan^{*,#,*}, F. Perros^{*,#,*}, D. Montani^{*,#,*}, S. Cohen-Kaminsky^{*,#,*},
M. Mazmanian^{*,#,*}, J-F. Renaud^{*,#,*}, G. Simonneau^{*,#,*},
A. Lombet^{*,#,*} and M. Humbert^{*,#,*}

ABSTRACT: Haematopoietic c-kit+ progenitor cells may contribute to pulmonary vascular remodelling and pulmonary hypertension (PH). Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and its receptors CXCR4 and CXCR7 have been shown to be critical for homing and mobilisation of haematopoietic c-kit+ progenitor cells in the perivascular niche.

We administered AMD3100, a CXCR4 antagonist, and CCX771, a CXCR7 antagonist, to chronic hypoxia exposed mice in order to study the role of c-kit+ progenitor cells in PH. CXCL12, CXCR4 and CXCR7 protein expression, haemodynamic parameters, right ventricular mass, extent of vascular remodelling and perivascular progenitor cell accumulation were studied.

Chronic hypoxia-exposed mice showed increased total lung tissue expression of CXCR4, CXCR7 and CXCL12 after development of PH. This was associated with significantly increased right ventricular systolic pressure and evidence of right ventricular hypertrophy, vascular remodelling and perivascular c-kit+/sca-1+ progenitor cell accumulation. CCX771 administration did not abrogate these effects. In contrast, administration of AMD3100, whether alone or combined with CCX771, prevented vascular remodelling, PH and perivascular accumulation of c-kit+/sca-1+ progenitor cells, with a synergistic effect of these agents.

This study offers important pathophysiological insights into the role of haematopoietic c-kit+ progenitors in hypoxia-induced vascular remodelling and may have therapeutic implications for PH.

KEYWORDS: CXCR4, haematopoietic c-kit+ progenitor cells, hypoxia, pulmonary hypertension, stromal derived factor-1

Many studies in recent years have demonstrated that non-resident progenitor cells may contribute to chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension (PH) [1]. There is accumulating evidence for the existence of bone marrow (BM)-derived circulating endothelial progenitor cells [2], circulating smooth muscle progenitor cells [3] and circulating fibrocytes [4], which may contribute to the process of vascular remodelling. Currently, there is no definitive consensus on the single best marker for BM-derived vascular progenitor cells. However, a generally accepted marker for BM-derived haematopoietic progenitor cells is c-kit/CD117, a transmembrane tyrosine kinase receptor for stem cell factor [5]. Previous studies have reported that c-kit+ cells are mobilised from the BM and tracked to atherosclerotic lesions [6] and sites of myocardial infarction [7]. Moreover,

TOSHNER *et al.* [8] have shown the presence of cells expressing progenitor markers particularly within the plexiform lesions associated with severe pulmonary arterial hypertension in humans. This was accompanied by the expression of progenitor homing signals in these lesions.

The CXC chemokine stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and its receptor CXCR4 play a major role in regulating cancer cell metastasis [9], lymphocyte trafficking [10] and mobilisation of haematopoietic progenitor cells to ischaemic tissue [11]. Recent evidence indicates that there is another seven transmembrane CXCL12 receptor encoded by RDC1/CXCR7 [12, 13]. CXCR7 may complex with CXCR4, forming a heterodimer that potentiates CXCL12 signalling [14]. Surface expression of CXCR7 was reported on tumour cells, activated endothelial cells, fetal

AFFILIATIONS

*Faculté de médecine, Université Paris-Sud, Kremlin-Bicêtre, #INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire, Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, *Centre Chirurgical Marie Lannelongue, §Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, and *Centre National de Référence de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécélère, AP-HP, Clamart, France.

CORRESPONDENCE

M. Humbert
Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire
Hôpital Antoine-Bécélère
157 rue de la Porte de Trivaux
92140 Clamart
France
E-mail: marc.humbert@abc.aphp.fr

Received:

March 23 2010
Accepted after revision:
Sept 18 2010
First published online:
Sept 30 2010

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

liver cells and other cell types [15]. It has been suggested that CXCR7 regulates several major biological processes including cell survival, cell adhesion and tumour development in animal models [15]. Expression of CXCR4, CXCR7 and CXCL12 is upregulated in response to tissue hypoxia and contributes to the recruitment of circulating progenitor cells [16–18].

Accordingly, the aim of our study was to determine if administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist, CCX771, a CXCR7 antagonist, or both would attenuate hypoxia-induced PH by reducing pulmonary c-kit⁺ haematopoietic progenitor cell accumulation.

MATERIALS AND METHODS

Study design

Preventative strategy

44 6-week old male C57BL/6J mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were exposed to normobaric hypoxia (10% inspiratory oxygen fraction (F_{I,O_2})) or normoxia (20.9% F_{I,O_2}) for 3 weeks and then randomly assigned to four groups to receive daily: 1) intraperitoneal injections of saline; 2) intraperitoneal injections of 10 mg·kg⁻¹ AMD3100 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France); 3) subcutaneous injections of 10 mg·kg⁻¹ CCX771 (Chemocentryx, Mountain View, CA, USA); and 4) combined treatments with AMD3100 and CCX771, both at 10 mg·kg⁻¹ from day 1 to day 21.

Therapeutic strategy

28 6-week old male C57BL/6J mice were exposed to normobaric hypoxia (10% F_{I,O_2}) or normoxia (20.9% F_{I,O_2}) for 5 weeks. After 3 weeks of this exposure, the mice were randomly assigned to receive daily: 1) intraperitoneal injections of saline; 2) intraperitoneal injections of 10 mg·kg⁻¹ AMD3100; 3) subcutaneous injections of 10 mg·kg⁻¹ CCX771; and 4) combined treatments with AMD3100 and CCX771, both at 10 mg·kg⁻¹ from day 21 to day 35.

Animal experiments were approved by the administrative panel on animal care at Centre de Chirurgie Expérimentale Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, France).

Haemodynamic measurements and tissue collection

Mice were anaesthetised with intraperitoneal injection of ketamine (60 mg·kg⁻¹) and xylazine (8 mg·kg⁻¹). Blood samples were collected from the retro-orbital plexus. Right ventricular systolic pressure (RVSP) was recorded after insertion of a 24-gauge needle connected to a pressure transducer into the right ventricle *via* the right jugular vein. Mice were euthanised by exsanguination. Lungs were inflated by intratracheal infusion of PBS:OCT (1:1), snap frozen and stored at -80°C. Right ventricular hypertrophy was assessed by calculating the weight ratio of the right ventricle (RV) to the left ventricle (LV) plus septum (S) (RV/(LV+S)).

Immunofluorescence

Staining was performed on 5 µm acetone-fixed frozen sections. The anti-mouse primary antibodies used were: fluorescein isothiocyanate-conjugated anti- α -smooth muscle actin (Sigma-Aldrich), biotinylated anti-CD184/CXCR4 (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France), anti-RDC1/CXCR7 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), anti-SDF-1 α /CXCL12 α (eBioscience, San Diego, CA, USA), biotinylated anti-c-kit (Abcam, Paris,

France), anti-Sca-1 (R&D Systems, Lille, France), anti-Fc ϵ RI α (immunoglobulin E high affinity receptor; eBioscience), and anti-mast cells tryptase (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Isotype-matched irrelevant antibodies were used as negative controls. AlexaFluor488-, AlexaFluor594- or AlexaFluor647-conjugated species-specific secondary antibodies or streptavidin were used to reveal the staining (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Slides were observed under a routine fluorescence and confocal laser scanning microscope (Olympus FV-1000; Olympus, Rungis, France) with appropriate emission filters.

Microscopic morphometry

Medial thickness defined as the ratio of the medial wall thickness to the external diameter of pulmonary arterioles with a diameter <30 µm, 30–50 µm, 50–75 µm and 75–100 µm was measured on 30 arterioles per α -actin-stained slide at random. The mean number of c-kit⁺ cells per pulmonary artery (cross-sectional diameter of 30–100 µm) was calculated by counting c-kit expressing cells on 30 arterioles per mice (n=3 per group).

Western blot

Western blot was performed on normoxic and hypoxic lungs (n=3–5), as previously described [19]. Membranes were stained with anti-CXCR4 (Capralogics, Hardwick, VT, USA), anti-CXCR7 (Novus Biologicals) or anti-CXCL12 (eBioscience) antibodies then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Protein bands were visualised by Lumi-LightPLUS Western Blotting Substrate (Roche, Neuilly-sur-Seine, France) using New Hyperfilm ECL (GE Healthcare, Orsay, France). Membranes were stripped in the Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Fisher, Brebières, France) and reused for detecting β -actin bands with a goat-polyclonal antibody (Abcam). Protein band intensity was determined using ImageJ (National Institutes for Health, Bethesda, MD, USA; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

Quantitative variables were presented as mean \pm SEM. Between groups, multiple group comparisons were performed with ANOVA and the Fisher projected least significant difference method as a *post hoc* analysis. A p-value <0.05 was considered to reflect statistical significance.

RESULTS

CXCL12, CXCR4 and CXCR7 expression and perivascular haematopoietic progenitor cell accumulation in lungs after 3 weeks of hypoxia

There was a significantly increased expression of CXCR4, CXCR7 and CXCL12 in the total lung tissues of hypoxic mice (1.08 \pm 0.19, 0.55 \pm 0.02 and 1.52 \pm 0.25, respectively) compared with normoxic mice (0.37 \pm 0.07, 0.23 \pm 0.02 and 0.45 \pm 0.03, all p<0.05) (fig. 1a–d). This was associated with a strong immunostaining for CXCL12 in hypoxic pulmonary arterial endothelial and smooth muscle cells and for CXCR4 and CXCR7 in pulmonary arterial endothelial cells compared with normoxia. Moreover, chronic normobaric hypoxia was associated with a perivascular accumulation of CXCR4⁺ cells and c-kit⁺ cells around remodelled pulmonary arteries (fig. 1e–l). We examined the origin of these cells using haematopoietic and mast cell markers. Double immunostaining for c-kit, in

combination with Sca-1 and CXCR4, respectively, confirmed the haematopoietic origin of these cells. Moreover, most accumulated cells were negative for FcεRIα and mast cell tryptase. Double immunofluorescence for c-kit and α-smooth muscle actin (α-SMA) showed that some c-kit+ cells observed around pulmonary arterial lesions may co-express α-SMA, indicating a likely differentiation of these cells into myofibroblasts (fig. 2).

Effects of AMD3100 and CCX771 on hypoxia-induced PH

Haematocrit

We verified that haematocrit values were significantly increased in hypoxic mice on day 21 as well as day 35 compared with normoxic control mice (61.7 ± 1.2 versus 46.0 ± 1.4 , $p < 0.0001$). AMD3100 and CCX771 treatment had no effect on the haematocrit values observed in hypoxic animals (data not shown).

Haemodynamics and right ventricular hypertrophy

Preventative strategy

We then sought to elucidate whether inhibition of CXCR4/CXCR7 would prevent PH. The RVSP of hypoxic mice was significantly increased compared with normoxic mice (28.6 ± 0.6 mmHg versus 22.7 ± 0.5 mmHg, $p < 0.001$). The RVSP of AMD3100-treated mice (25.0 ± 0.5 mmHg) was substantially lower than the RVSP of the hypoxic mice ($p < 0.001$) but still significantly higher than the RVSP of normoxic mice ($p = 0.02$), indicating a significant but partial effect of AMD3100. While CCX771 alone had no effect on hypoxia-induced PH (28.3 ± 0.4 mmHg), a treatment combining AMD3100 and CCX771 induced a RVSP significantly lower than RVSP of hypoxic mice (23.4 ± 0.6 mmHg, $p < 0.0001$), indicating a synergistic effect of AMD3100 and CCX771. Accordingly, the RVSP in combined treatment with AMD3100 and CCX771 was not significantly different from RVSP of normoxic mice ($p = 0.46$) (fig. 3a).

Hypoxia-induced PH was associated with a significant hypertrophy of the right ventricle, defined by the RV/(LV+S) ratio, compared with normoxic controls (0.41 ± 0.02 versus 0.29 ± 0.01 , $p < 0.0001$). In accordance with the beneficial effect of AMD3100 on RVSP in hypoxic mice, the RV/(LV+S) ratio was also significantly decreased in hypoxia-exposed AMD3100-treated mice (0.35 ± 0.01). CCX771 alone had no effect on hypoxia-induced right ventricular hypertrophy (0.41 ± 0.02) while combined treatment with AMD3100 and CCX771 was not statistically significant from normoxic mice (0.33 ± 0.02 , $p = 0.14$) (fig. 3b).

Therapeutic strategy

Exposure of adult mice to 5 weeks hypoxia also resulted in a marked increase in RVSP (28.8 ± 0.5 mmHg versus 22.7 ± 0.4 mmHg, $p < 0.0001$) and in right ventricular hypertrophy (0.39 ± 0.03 versus 0.29 ± 0.04 , $p < 0.0001$) compared with normoxia. In contrast, administration of AMD3100, CCX771 or both for 2 weeks in mice with established PH had no significant effect on RVSP and RV/(LV+S) ratio (data not shown).

Effect of CXCR4 and CXCR7 antagonism on hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling

We then studied the effects of CXCR4 and CXCR7 antagonism on pulmonary vascular remodelling in mice. Medial thickness of pulmonary arterioles < 30 μm, 30 – 50 μm, 50 – 75 μm and 75 – 100 μm in hypoxic mice was significantly increased compared with normoxic mice. Medial thickness of pulmonary arterioles < 30 μm, 30 – 50 μm, 50 – 75 μm and 75 – 100 μm in AMD3100-treated hypoxic mice was significantly decreased compared with the hypoxic control mice, but remained increased compared with the normoxic animals. CCX771 treatment alone had no significant effect on hypoxia-induced pulmonary arterial thickening. However, the medial thickness in hypoxic mice receiving a treatment combining AMD3100 and CCX771 was significantly lower compared with hypoxic control mice and hypoxic mice treated with AMD3100 or CCX771 alone. No difference was observed between the medial thickness in hypoxic mice treated with the combined AMD3100 and CCX771 treatment and medial thickness of normoxic mice (fig. 4).

Effect of CXCR4 and CXCR7 antagonism on hypoxia-induced perivascular c-kit+ progenitor cell accumulation

Hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling was associated with a significant accumulation of c-kit+/FcεRIα-/tryptase- progenitor cells distinct from the few c-kit+/FcεRIα+/tryptase+ mast cells in the adventitia of remodelled pulmonary arteries compared with normoxia (3.8 ± 0.1 versus 0.6 ± 0.1 cells·artery⁻¹, $p < 0.0001$).

Given that CXCL12 is an integral component of progenitor cells mobilisation during hypoxia and that c-kit+ cells were increased in the lungs of adult mice with hypoxia-induced PH, we next evaluated if perivascular c-kit+ cell numbers could be decreased by inhibition of the CXCR4/CXCR7 pathway. AMD3100 therapy significantly decreased the number of c-kit+ cells compared with hypoxic mice (1.8 ± 0.1 cells·artery⁻¹, $p < 0.0001$), although it remained significantly higher than in normoxic mice ($p < 0.0001$). Combined AMD3100 and CCX771 treatment (1.0 ± 0.1 cells·artery⁻¹) was the most efficient in reducing hypoxia-induced c-kit+ progenitor cell accumulation compared with AMD3100 alone ($p < 0.0001$) and normoxic mice ($p = 0.016$) (fig. 5).

DISCUSSION

We analysed the effects of the antagonism of two major chemokine receptors involved in the recruitment of haematopoietic progenitor cells in the setting of hypoxia-induced PH. We demonstrated that AMD3100, an antagonist of CXCR4, and its combination with CCX771, an antagonist of CXCR7, prevent, at least in part, pulmonary vascular remodelling, PH and right ventricular hypertrophy induced by chronic hypoxia. These effects were associated with a significantly decreased number of perivascular c-kit+ haematopoietic progenitor cells associated with hypoxia-induced PH.

Hypoxia is the main stimulus for the induction of PH in highlanders or PH complicating chronic respiratory disorders, such as chronic obstructive pulmonary disease and interstitial lung diseases. While acute hypoxia causes selective pulmonary arteriolar vasoconstriction, chronic exposure to hypoxia results in morphological and functional changes in the pulmonary

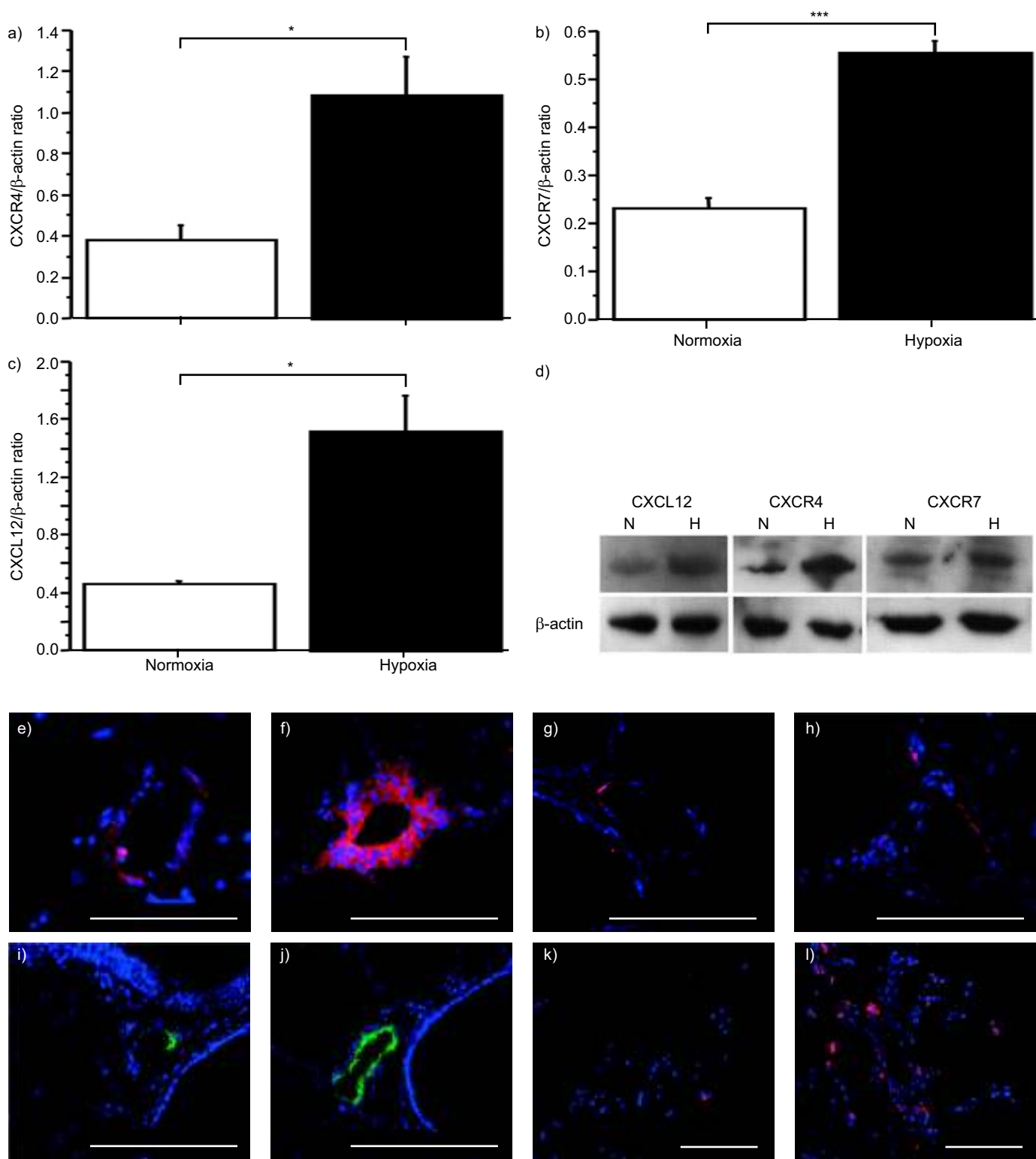


FIGURE 1. CXCL12, CXCR4, and CXCR7 expression and perivascular haematopoietic progenitor cell accumulation in lungs after 3 weeks of hypoxia. a–d) Overexpression of CXCL12 and its two receptors CXCR4 and CXCR7 in total lung protein extracts from hypoxic (H) mice compared with normoxic (N) mice measured by western blotting. *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$. Expression is normalised towards β -actin. $n = 3$ in the control group *versus* $n = 5$ in the hypoxic group. e–l) Immunohistochemical analysis of vascular localisation of e, f) CXCL12 and their receptors g, h) CXCR4 and i, j) CXCR7, and k, l) accumulation of perivascular c-kit+ and CXCR4+ cells in normoxia (e, g, i, k) compared with hypoxia (f, h, j, l) mouse lung. Scale bars = 50 μ m.

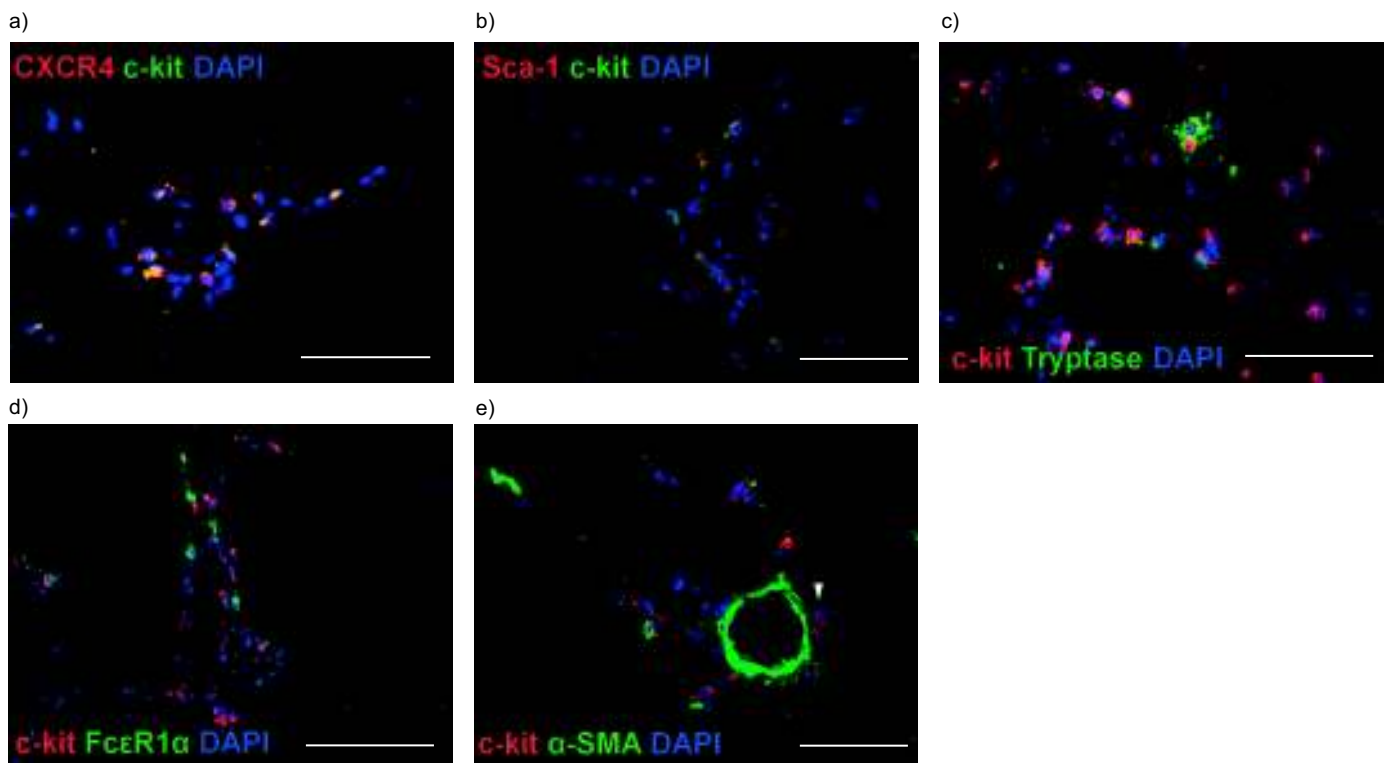


FIGURE 2. Characterisation of haematopoietic c-kit⁺ progenitor cells in pulmonary vasculature during hypoxia. Hypoxic pulmonary hypertension mice have shown a lung accumulation of c-kit⁺ cells. Most c-kit⁺ cells co-expressed the progenitor haematopoietic marker a) CXCR4 and b) Sca-1. Double immunofluorescent staining of c-kit for mast cell c) tryptase and d) FcεR1α has shown most of c-kit⁺ cells to be negative for both of these markers. e) Some cells were positive for dual staining with c-kit and α-SMA, indicating a possible differentiation of these cells into myofibroblasts (arrowhead). Scale bars=50 μm.

vascular bed [20]. Hypoxia is a potent activator of the CXCR4/CXCL12 pathway. Of note, CXCL12 acting through CXCR4 is the main chemokine that modulates trafficking of haematopoietic stem and progenitor cells. Recently, it has been shown that CXCL12 plays a crucial role to mobilise and recruit BM-derived CXCR4⁺ proangiogenic cells to the hypoxic tissue. CXCL12 can act through CXCR4 on vascular endothelium [21], upregulating and activating adhesion molecules to promote stable interactions with circulating cells [22]. Moreover, recruited CXCR4⁺ cells may produce angiogenic cytokines that promote the proliferation and differentiation of resident vascular cells [11]. In our present study we extend, in adult hypoxic animals, recent data obtained in neonatal animals demonstrating hypoxia-induced perivascular CXCL12 and CXCR4 overexpression that can result in pulmonary artery adventitial c-kit⁺ haematopoietic progenitor cell accumulation [23, 24]. YOUNG *et al.* [24] showed that the inhibition of the CXCL12/CXCR4 axis in the setting of lung development both inhibited and reversed pulmonary vascular remodelling in neonatal PH mice and this was associated with decreased stem cell lung expression. However, this study lacked precise identification and counts of progenitor cells. The count of c-kit⁺ cells was performed on whole images and not in the vicinity of remodelled vessels. In addition, no marker was used to exclude mast cells that also express c-kit. The c-kit⁺ cells localised in the parenchyma are likely to be mast cells co-expressing FcεR1α or tryptase. We unequivocally demonstrated that inhibition of the CXCL12/CXCR4 axis decreased

pulmonary vascular remodelling as well as the number of recruited pulmonary c-kit⁺/FcεR1α⁻ and c-kit⁺/tryptase⁻ cells in an experimental model of PH, by directly counting these cells in the vicinity of remodelled small arteries that were categorised by size.

We also extended the study to the role of RDC1/CXCR7, another recently identified receptor of CXCL12 [12, 13]. Indeed, several reports indicate that CXCR7 plays a role in the response to hypoxia [25, 26]. CXCR7 may complex with CXCR4, forming a heterodimer that potentiates CXCL12 signalling [14]. It has been demonstrated that CXCR7 regulates several important biological processes including cell survival, cell adhesion and tumour development in animal models [15]. However, the mechanisms responsible for CXCR7 signal transduction are not completely understood. To date, the CXCL12/CXCR7 interaction has not been shown to activate G-protein-mediated signal transduction and it has been speculated that CXCR7 may clear secreted CXCL12 from the extracellular environment and thereby help maintain a defined CXCL12 gradient [27]. While AMD3100 had only a partial effect and CCX771 had no effect on hypoxia-induced c-kit⁺ progenitor cell accumulation and PH, we showed that combined CXCR4 and CXCR7 antagonism may have synergistic effects and prevent hypoxia-induced haematopoietic progenitor cell accumulation in the perivascular area and PH. These results may be explained by several recently described features of these pathways. KALATSKAYA *et al.* [28] showed that AMD3100, mainly known as a competitive ligand for CXCR4,

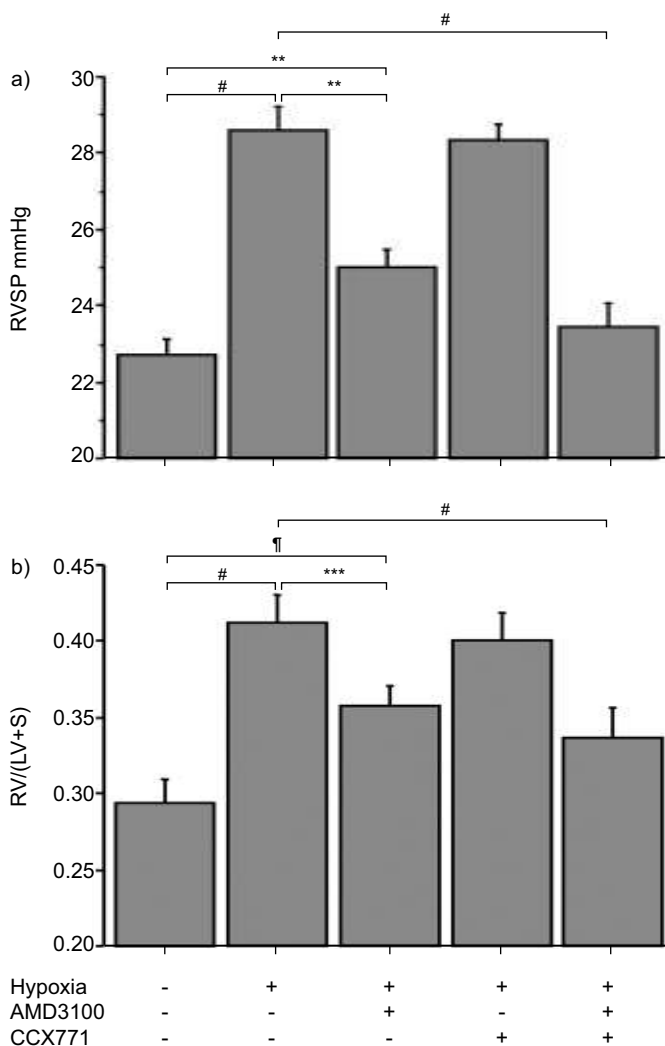


FIGURE 3. Impact of AMD3100, CCX771 and their combination on haemodynamic and right ventricular hypertrophy in hypoxia-induced pulmonary hypertension. a) Right ventricular systolic pressure (RVSP) in the different treatment groups. b) Ratio of the right ventricle (RV) to the left ventricle (LV) plus septum (S) weight (RV/(LV+S)). #: $p < 0.0001$; †: $p < 0.02$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$.

is also an allosteric ligand for CXCR7 at concentrations that are generally used by investigators in *in vitro* studies. Accordingly, in contrast to its negative effect on the CXCR4/CXCL12 interaction, AMD3100 may positively modulate CXCL12 effects and binding with CXCR7. Such a mechanism could participate in the synergy we observed by combined antagonism of the two receptors. In addition, AMD3100 recruits β -arrestin to CXCR7 but blocks β -arrestin recruitment to CXCR4. This might explain the two-fold decrease in haematopoietic c-kit+ cell accumulation and the partial improvement of vascular remodelling in the setting of AMD3100 monotherapy. Moreover, it could explain why these parameters were completely reversed with combined AMD3100 and CCX771 therapy. Thus, our study shows that blocking the CXCL12/CXCR4 axis is not sufficient to fully prevent hypoxic PH and the associated progenitor cell accumulation, but the combined

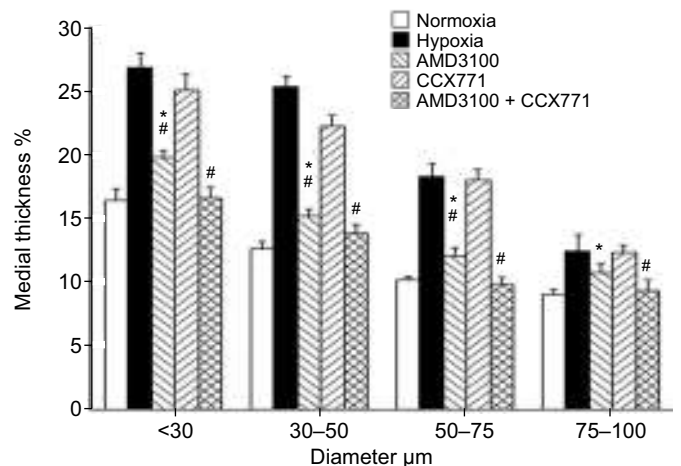


FIGURE 4. Effects of AMD3100, CCX771 and their combination on the medial wall thickness. 30 pulmonary arteries per mice ($n=3$) were sized and separated into four groups: <30 μm , 30–50 μm , 50–75 μm and 75–100 μm . Each bar represents the mean ratio of the medial wall thickness to the external diameter of pulmonary arterioles, measured on at least 30 arteries from three slides. *: $p < 0.05$ versus control; #: $p < 0.05$ versus hypoxia at day 21.

CXCR4/CXCR7 antagonism enables baseline maintenance of RVSP, RV to LV plus S ratio, pulmonary arterial media thickness, as well as perivascular haematopoietic c-kit+ progenitor cell count. MAZZINGHI *et al.* [29] have shown that the CXCL12/CXCR4 interaction is responsible for the recruitment of renal multipotent progenitors, but a CXCL12/CXCR7 interaction is also required for their transendothelial migration. In our study, we determined that CXCR4 was expressed by haematopoietic c-kit+ and endothelial cells and CXCR7 was mainly expressed by endothelial cells. It can be hypothesised that CXCL12 expressed by endothelial and smooth muscle cells

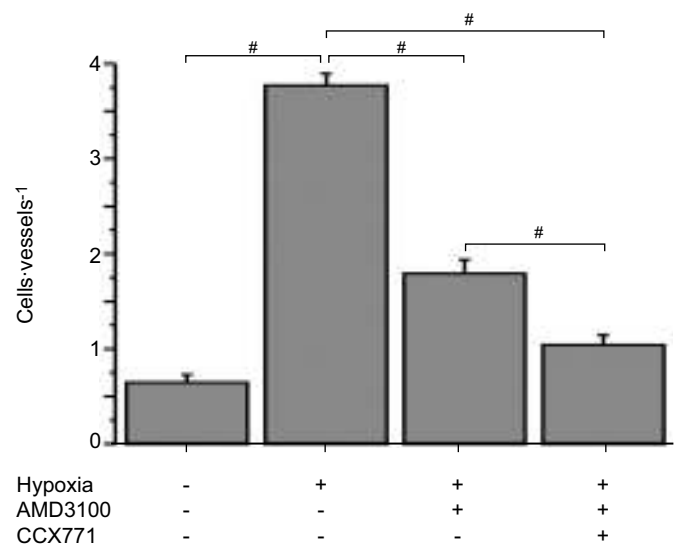


FIGURE 5. Analysis of the c-kit + cell infiltration in the vicinity of vascular lesions. Effect of CXCR4 and CXCR7 antagonism on hypoxia-induced perivascular accumulation of haematopoietic c-kit+ progenitor cells. #: $p < 0.0001$.

acts on CXCR7 expressed by endothelial cells (as paracrine and autocrine secretion) and induces activation of the endothelial cells, and thus, increases adhesion and transendothelial migration of progenitor cells. BM-derived cells were shown to differentiate into α -SMA+ cells in remodelled pulmonary arteries in hypoxic conditions, and selective depletion of circulating mesenchymal precursors with serial intravenous injections of liposomes containing clodronate or of gadolinium chloride prevented pulmonary adventitial remodelling [30], suggesting that these cells may have functional relevance.

Studying the destiny of progenitor cells was not in the scope of this study and deserves further investigations with refined kinetics studies, as well as studies of the mechanism of action of CXCR4, CXCR7 and c-kit antagonists. We cannot exclude that beneficial treatment with CXCR4 and CXCR7 antagonists may be explained not only by the decreased accumulation of haematopoietic progenitor cells in the perivascular area but also by potential effects on the inflammatory response, described in chronic hypoxia, which may promote a progenitor cell's recruitment.

In conclusion, our data demonstrated that mobilisation and homing of haematopoietic c-kit+ progenitor cells in remodelled pulmonary arteries of hypoxic lung were potently reduced by CXCR4 and combined CXCR4 and CXCR7 antagonism. Moreover, these effects on c-kit+ cell accumulation were associated with prevention of PH and pulmonary vascular remodelling. This is the first study demonstrating that combination of AMD3100 and CCX771 reduces the number of perivascular c-kit+ progenitors in hypoxia-induced PH. This study offers important pathophysiological insights into the role of haematopoietic c-kit+ progenitor cells in adult chronic hypoxia-induced vascular remodelling and may have important implications for human PH.

SUPPORT STATEMENT

This study has been 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. N. Gambaryan is supported by a grant from Société de Pneumologie de Langue Française. F. Perros is supported by a Long-Term Fellowship grant of the European Respiratory Society (LTRF 171). D. Montani is supported by a grant from Association HTAPFrance.

STATEMENT OF INTEREST

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

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank ChemoCentryx Inc. (Mountain View, CA, USA) for the kind gift of CXCR7 antagonist CCX771. We also thank A. Huertas for critical reading of the manuscript and the Plate-forme d'Imagerie Cellulaire Pitié Salpêtrière for confocal imaging.

REFERENCES

- 1 Frid MG, Li M, Gnanasekharan M, *et al.* Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and prometogenic potentials within the distal pulmonary artery wall. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297: L1059–L1072.
- 2 Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, *et al.* Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J* 2010; 35: 418–425.

- 3 Simper D, Stalboerger PG, Panetta CJ, *et al.* Smooth muscle progenitor cells in human blood. *Circulation* 2002; 106: 1199–1204.
- 4 Abe R, Donnelly SC, Peng T, *et al.* Peripheral blood fibrocytes: differentiation pathway and migration to wound sites. *J Immunol* 2001; 166: 7556–7562.
- 5 Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, *et al.* Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991; 174: 63–71.
- 6 Sata M, Saiura A, Kunisato A, *et al.* Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002; 8: 403–409.
- 7 Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, *et al.* Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10344–10349.
- 8 Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, *et al.* Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2009; 180: 780–787.
- 9 Muller A, Homey B, Soto H, *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50–56.
- 10 Yoshie O. Role of chemokines in trafficking of lymphocytes and dendritic cells. *Int J Hematol* 2000; 72: 399–407.
- 11 Jin DK, Shido K, Kopp HG, *et al.* Cytokine-mediated deployment of SDF-1 induces revascularization through recruitment of CXCR4+ hemangiocytes. *Nat Med* 2006; 12: 557–567.
- 12 Joost P, Methner A. Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands. *Genome Biol* 2002; 3: RESEARCH0063.
- 13 Libert F, Parmentier M, Lefort A, *et al.* Complete nucleotide sequence of a putative G protein coupled receptor: RDC1. *Nucleic Acids Res* 1990; 18: 1917.
- 14 Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, *et al.* Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 14759–14764.
- 15 Burns JM, Summers BC, Wang Y, *et al.* A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *J Exp Med* 2006; 203: 2201–2213.
- 16 Ceradini DJ, Kulkarni AR, Callaghan MJ, *et al.* Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nat Med* 2004; 10: 858–864.
- 17 Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, *et al.* Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003; 198: 1391–1402.
- 18 Burke DL, Frid MG, Kunrath CL, *et al.* Sustained hypoxia promotes the development of a pulmonary artery-specific chronic inflammatory microenvironment. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297: L238–L250.
- 19 Perros F, Montani D, Dorfmüller P, *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 81–88.
- 20 Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, *et al.* Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 1979; 236: H818–H827.
- 21 Gupta SK, Lysko PG, Pillarisetti K, *et al.* Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 1998; 273: 4282–4287.
- 22 Kryczek I, Lange A, Mottram P, *et al.* CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 465–472.
- 23 Davie NJ, Crossno JT Jr, Frid MG, *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.
- 24 Young KC, Torres E, Hatzistergos KE, *et al.* Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circ Res* 2009; 104: 1293–1301.

- 25** Qing X, Svaren J, Keith IM. mRNA expression of novel CGRP1 receptors and their activity-modifying proteins in hypoxic rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 280: L547–L554.
- 26** Ladoux A, Frelin C. Coordinated up-regulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier. *J Biol Chem* 2000; 275: 39914–39919.
- 27** Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *J Neuroimmunol* 2008; 198: 9–13.
- 28** Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, *et al.* AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Mol Pharmacol* 2009; 75: 1240–1247.
- 29** Mazzinghi B, Ronconi E, Lazzeri E, *et al.* Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells. *J Exp Med* 2008; 205: 479–490.
- 30** 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.

3 Conclusion

Pour étudier du rôle des progéniteurs hématopoïétiques c-kit⁺ dans l'HTAP, nous avons utilisé des antagonistes des récepteurs CXCR₄ et CXCR₇. Ces antagonistes permettent d'améliorer l'HTAP hypoxique grâce au blocage du recrutement pulmonaire des progéniteurs hématopoïétiques, en particulier c-kit⁺. De plus, l'utilisation préventive des 2 antagonistes simultanément permet d'améliorer de façon synergique l'hémodynamique, le remodelage vasculaire pulmonaire et le remodelage cardiaque.

Contrairement à l'hypoxie aiguë qui provoque une simple vasoconstriction, l'hypoxie chronique induit des changements morphologiques et fonctionnels du lit vasculaire pulmonaire (Rabinovitch et al. 1979). Dans cette étude, nous avons utilisé le modèle murin d'HTAP induite par l'hypoxie normobare chronique durant 3 semaines. Il est actuellement bien connu que l'hypoxie induit l'expression de CXCL₁₂ et de ses 2 récepteurs CXCR₄ et CXCR₇ via HIF-1 α (*hypoxia inducible factor -1 α*). Dans un premier temps nous avons montré la surexpression de CXCL₁₂ par les CE et les CML ainsi que la surexpression de CXCR₄ et CXCR₇ par les CE de petites artérioles pulmonaires. Nous avons montré également que l'hypoxie chronique provoquait le recrutement des cellules CXCR₄+c-kit⁺ dans les espaces périvasculaires des artérioles pulmonaires. L'axe CXCL₁₂/CXCR₄ joue un rôle clé dans la mobilisation et le recrutement des cellules proangiogéniques CXCR₄⁺ dérivées de la moelle osseuse dans les tissus hypoxiques (Busillo et al. 2010). L'interaction CXCL₁₂/CXCR₄ induit l'expression et l'activation des molécules d'adhésion par les CE ce qui permet la capture des cellules circulantes (Kryczek et al. 2005). De plus, une fois que les cellules CXCR₄⁺ ont migré dans le tissu, elle sont capables de produire des cytokines angiogéniques permettant la prolifération et la différenciation des cellules vasculaires résidentes (Simonneau et al. 2009). Les données récentes sur des animaux néonataux montrent la surexpression périvasculaire de CXCL₁₂ et CXCR₄ dans le poumon en hypoxie, ce qui provoque une accumulation des cellules c-kit⁺ dérivées de la moelle osseuse dans l'adventice des petites artères pulmonaires (Davie et al. 2004; Young et al. 2009). Young *et al* ont pu montrer que l'inhibition de l'axe CXCL₁₂/CXCR₄ chez les souris néo-natales

hypertendues réduit le remodelage vasculaire pulmonaire grâce à la diminution du recrutement des cellules précurseurs (Young et al. 2009). Cependant, cette étude manque de précision sur la nature des ces précurseurs et leur quantification. Le comptage a été effectué sur le poumon total et non au sein des artères remodelées. De plus, les auteurs n'ont pas exclu les mastocytes qui sont également c-kit⁺. Dans notre étude nous avons montré que l'inhibition de voie CXCL₁₂/CXCR₄ diminue le remodelage vasculaire pulmonaire et l'accumulation des cellules c-kit⁺/FcεRIα⁻ et c-kit⁺/tryptase⁻ dans l'HTAP hypoxique de la souris.

En outre, nous avons étudié le rôle d'un autre récepteur de CXCL₁₂ - CXCR₇, en hypoxie. Certains rapports soulignent l'importance de CXCR₇ en réponse à l'hypoxie (Ladoux et al. 2000; Qing et al. 2001). Le rôle de CXCR₇ a été démontré dans plusieurs processus physiologiques et physiopathologiques, tels que la survie cellulaire, l'adhésion et la développement de la tumeur dans des modèles animaux (Burns et al. 2006). Malgré cela, le mécanisme exact responsable de la transduction du signal médié par CXCR₇ reste incertain. L'interaction CXCL₁₂/CXCR₇ ne provoque pas de transduction de signal ce qui suggère que CXCR₇ a un rôle régulateur sur le taux extracellulaire de CXCL₁₂, tout en maintenant le gradient de CXCL₁₂ (Thelen et al. 2008).

Alors que l'AMD₃₁₀₀ a un effet partiel sur le recrutement des cellules progénitrices en hypoxie, la combinaison de cet antagoniste de CXCR₄ avec l'antagoniste de CXCR₇ présente un effet synergique capable de prévenir le développement de l'HTAP hypoxique. Kalatskaya *et al* ont montré que l'AMD₃₁₀₀, est un ligand allostérique pour CXCR₇ à des concentrations souvent utilisées par les investigateurs dans des études *in vitro*. Contrairement à son effet inhibiteur sur CXCR₄, l'AMD₃₁₀₀ peut moduler positivement la liaison de CXCL₁₂ avec CXCR₇. Ce mécanisme pourrait être impliqué dans la synergie que nous avons observée dans le cas de traitements combinés avec les 2 antagonistes. AMD₃₁₀₀ provoque le recrutement des β-arrestines auprès de CXCR₇, en bloquant leur recrutement vers CXCR₄ (Kalatskaya et al. 2009). Cela pourrait expliquer l'amélioration partielle du remodelage vasculaire et de l'HTAP avec l'AMD₃₁₀₀ monothérapie. Cette hypothèse explique également la réversibilité complète des paramètres hémodynamiques, ainsi

que du remodelage vasculaire associé à l'HTAP avec le traitement combiné (AMD₃₁₀₀ + CCX₇₇₁).

Dans les tissus rénaux, CXCR₇ participe également à la transmigration à travers la barrière endothéliale (Mazzeinghi et al. 2008). Dans notre étude nous avons montré que CXCR₄ était exprimé par les cellules c-kit⁺ dérivées de la moelle osseuse, ainsi que par les cellules endothéliales, tandis que CXCR₇ était exprimée en majorité par les cellules endothéliales. Cette expression pourrait être à la base d'une régulation para- et autocrine. CXCL₁₂ exprimée par les CE et les CML lie CXCR₇ sur les CE, ce qui provoque leur activation et, augmente l'adhésion et la transmigration des cellules progénitrices. Une fois attirées dans les tissus interstitiels, les cellules c-kit⁺ semblent se différencier en CML - « like », produire l' α -SMA et participer au remodelage vasculaire pulmonaire. Une expérience basée sur la déplétion sélective des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse par le clodronate ou gadolinium chloride prévient le remodelage pulmonaire induit par l'hypoxie et confirme cette hypothèse (Frid et al. 2006).

En conclusion, nous avons montré que le remodelage vasculaire pulmonaire, l'hypertrophie cardiaque droite, ainsi que le recrutement des progéniteurs c-kit⁺, induits par l'hypoxie, sont inhibés par le traitement combiné des 2 antagonistes AMD₃₁₀₀ et CCX₇₇₁. Ce travail pourrait contribuer à développer des actions thérapeutiques ciblées permettant la mise en place de traitements à la fois plus spécifiques et plus efficaces susceptibles d'améliorer la survie des patients HTAP.

III - IMATINIB INHIBE LE RECRUTEMENT DES PROGENITEURS C-KIT+ ET AMELIORE L'HYPERTENSION PULMONAIRE EXPERIMENTALE

1 Introduction

Les cellules progénitrices dérivées de la moelle osseuse sont recrutées autour des vaisseaux remodelés au cours du développement de l'HTAP et jouent un rôle important dans la pathogenèse de la maladie. Le marqueur commun de l'ensemble de cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques dérivés de la moelle osseuse est le récepteur de tyrosine kinase c-kit (Ogawa et al. 1991). L'expression de c-kit diminue durant la différenciation cellulaire, à l'exception des mastocytes, qui maintiennent l'expression de ce récepteur à leur surface (Fukuda et al. 1995). Avec son ligand *stem cell factor* (SCF), c-kit est impliqué dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire. La mutation de c-kit chez l'homme est associée à de nombreux cancers, comme la leucémie myéloïde aigue, les tumeurs gastro-intestinales (>90%), mastocytomes (>70%), La lymphome sinonasale des cellules T (17%) et seminomes/dysgerminomes (9%) (Heinrich et al. 2002).

L'utilisation de molécules antiprolifératives dans l'HTAP, telles que les inhibiteurs de tyrosine kinases à large spectre, comme l'imatinib mesylate (Imatinib, Gleevec), a été proposée par Schermuly *et al* (Schermuly et al. 2005). Grâce à son action sur les récepteurs bcr-abl, c-kit et les récepteurs α et β du PDGF, il a été montré que l'imatinib combat le remodelage vasculaire pulmonaire présent dans les modèles expérimentaux d'HTAP (HTAP induit par l'hypoxie et la monocrotaline), en inhibant la prolifération et en augmentant l'apoptose des CML (Schermuly et al. 2005). Nous avons supposé que le PDGFR présent sur les CML n'est pas la seule cible de l'imatinib. En tant qu'inhibiteur de large spectre des tyrosines kinases, nous avons étudié son effet sur les cellules progénitrices c-kit+.

Dans cette étude nous avons utilisé le même modèle d'HTAP induite par l'hypoxie, décrit dans le paragraphe précédent. La question posée était :

l'administration d'imatinib *in vivo* diminuera-t-elle le recrutement pulmonaire des cellules c-kit+, induite par l'hypoxie ?

2 Résultats

Letter 3

Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit⁺ cell mobilization in hypoxic PH

Natalia Gambaryan, Frédéric Perros, David Montani, Sylvia Cohen-Kaminsky, Michel Mazmanian and Marc Humbert.

European Respiratory Journal, 2010. 36(5): 1209-1211.



LETTER

Imatinib inhibits bone marrow-derived c-kit⁺ cell mobilisation in hypoxic pulmonary hypertension

To the Editors:

We read with great interest the review by FADINI *et al.* [1] in the *European Respiratory Journal* discussing the role of bone marrow (BM)-derived stem cells and endothelial progenitors in pulmonary hypertension (PH). This topic is indeed very relevant to pulmonary vascular medicine, as demonstrated by pioneering studies demonstrating that haematopoietic stem cells can be recruited in the pulmonary artery adventitia of neonatal animals with hypoxic PH [2]. In addition, BM-derived cells may express smooth muscle actin in hypoxia-remodelled pulmonary arteries, and selective depletion of circulating BM-derived precursors prevents pulmonary adventitial remodeling, suggesting that these cells may have functional relevance in the pathophysiology of hypoxia-induced PH [3]. CD117/c-kit, a transmembrane receptor tyrosine kinase for the stem cell factor (SCF), is a marker for BM-derived haematopoietic stem cells, and this receptor can be targeted by tyrosine kinase inhibitors which have been recently proposed as novel therapeutic agents to be tested in PH [4]. Indeed, a novel antiproliferative-based strategy using therapeutic agents such as imatinib mesylate inhibiting several tyrosine kinases associated with disease states, including BCR-ABL, c-kit, and platelet-derived growth factor (PDGF) receptors α and β , has been demonstrated to reverse pulmonary vascular remodelling in animal models of PH (chronic hypoxia- and monocrotaline-induced PH), through inhibition of proliferation and increased apoptosis rate of pulmonary arterial smooth muscle cells [5]. As imatinib has a broad spectrum of tyrosine kinase inhibition, we hypothesised that it may exert its beneficial effect on PH not only by decreasing smooth muscle cell proliferation through PDGF receptor inhibition, as initially suggested [5], but also by targeting c-kit. Hence, we wondered if administration of imatinib could attenuate experimental PH, at least in part, by reducing the pulmonary perivascular recruitment of BM-derived c-kit⁺ stem cells.

We used the murine model of PH induced by chronic normobaric hypoxia (10% inspiratory oxygen fraction).

6-week old male C57BL/6J mice (Janvier, Le Genest-St-Isle, France) were exposed to 10% normobaric hypoxia for 3 weeks. Imatinib (Novartis, Horsham, UK) was orally administered during the period of hypoxia at 10 mg·kg⁻¹·day⁻¹. Immunofluorescent staining was performed on 7- μ m acetone-fixed, frozen lung sections. To unequivocally distinguish BM-derived c-kit⁺ from mast cells, perivascular cells were characterised not only by c-kit expression but also by Fc ϵ RI α (immunoglobulin E high affinity receptor) and tryptase. Hence, c-kit⁺/Fc ϵ RI α ⁻/tryptase⁻ BM-derived stem cells are different from c-kit⁺/Fc ϵ RI α ⁺/tryptase⁺ mast cells. Thus, we

combined biotinylated anti-c-kit (Abcam, Paris, France), anti-Fc ϵ RI α (immunoglobulin E high affinity receptor) (eBioscience, San Diego, CA, USA) and anti-mast cell tryptase antibodies (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA). Isotype-matched, irrelevant antibodies were used as negative controls. Medial thickness (defined as the ratio of the medial wall thickness to the external diameter of pulmonary arterioles with a diameter <30 μ m, 30–50 μ m, 50–75 μ m or 75–100 μ m) was measured on 30 randomly selected arterioles stained for smooth muscle cell α -actin. The mean number of c-kit⁺ cells per pulmonary artery (cross-sectional diameter 30–100 μ m) was calculated by counting c-kit⁺ cells on 90 randomly selected arterioles per group. Statistical analysis was performed with StatEl software (Ad Science, Paris, France) using parametric (ANOVA) or nonparametric tests (Kruskal–Wallis, Mann–Whitney).

Right ventricular systolic pressure (RVSP) was recorded by right ventricle catheterisation in mice anaesthetised with intraperitoneal injection of ketamine (60 mg·kg⁻¹) and xylazine (8 mg·kg⁻¹). Right ventricular hypertrophy was assessed by calculating the weight ratio of the right ventricle (RV) to the left ventricle (LV) plus septum (S): RV/(LV+S).

After 3 weeks of hypoxia, the RVSP was significantly elevated, as compared to normoxia. RVSP was significantly lower in imatinib-treated mice, as compared to hypoxic mice, but still higher than in normoxic mice (fig. 1a). Hypoxia-induced PH was associated with a significant hypertrophy of the right ventricle, as compared to normoxic controls. In accordance with the beneficial effect of imatinib on RVSP, the RV/(LV+S) ratio was significantly decreased in imatinib-treated hypoxic mice, as compared to hypoxic controls (fig. 1b). Medial thickness of pulmonary arterioles <30 μ m, 30–50 μ m, 50–75 μ m and 75–100 μ m of hypoxic mice was significantly increased, as compared to normoxic mice. Imatinib-treated mice showed significant decrease of medial thickness compared with hypoxic mice (fig. 1c). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling was associated with a significant accumulation of c-kit⁺/Fc ϵ RI α ⁻/tryptase⁻ cells in the adventitia of remodelled pulmonary arteries, as compared to normoxia. The recruitment of c-kit⁺/Fc ϵ RI α ⁻/tryptase⁻ cells in the perivascular area of imatinib-treated mice was significantly decreased as compared to hypoxic mice (fig. 1d).

Our study provides evidence that imatinib, a BCR-ABL/c-kit/PDGF receptor tyrosine kinase inhibitor, may prevent pulmonary vascular remodelling, PH and RV hypertrophy induced by chronic hypoxia. These effects were associated with a significant reduction of perivascular BM-derived c-kit⁺ cell accumulation. Imatinib has been demonstrated to reverse

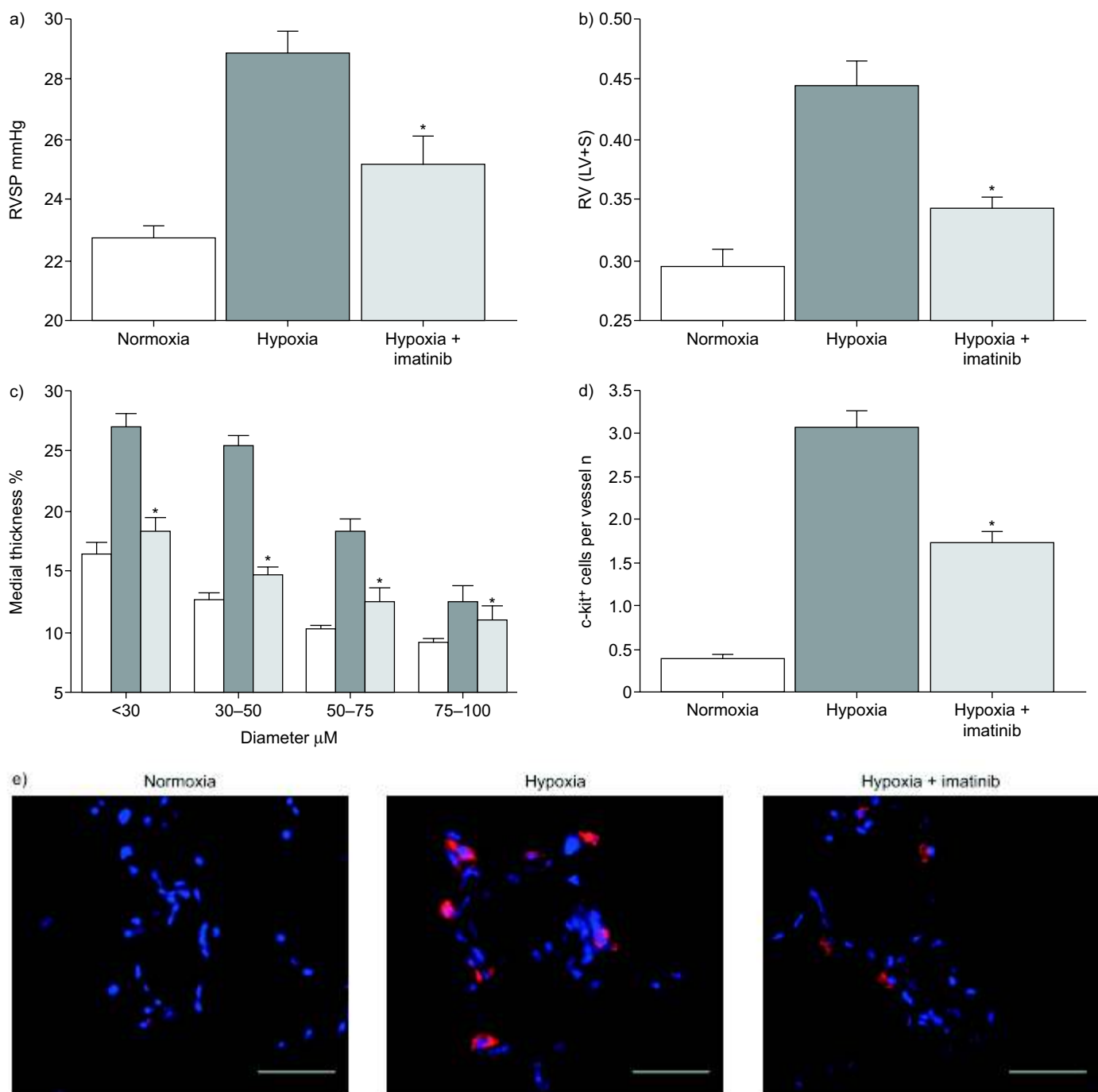


FIGURE 1. Imatinib treatment significantly decreases a) the right ventricular systolic pressure (RVSP), b) the right ventricular hypertrophy defined by the ratio right ventricle/(left ventricle+septum (RV/(LV+S))), c) the medial wall thickness of small pulmonary arteries, and d) the pulmonary perivascular c-kit⁺ bone marrow-derived stem cells recruitment, induced by chronic normobaric hypoxia. Data are presented as mean \pm SEM. n=8–10 animals per group. *: p<0.05 in imatinib-treated mice as compared to untreated hypoxic control. Scale bars=50 μ m. □: normoxia; ■: hypoxia; ■: imatinib.

pulmonary vascular remodelling in animal models of PH and in a small number of human cases of pulmonary arterial hypertension [6, 7]. It is widely accepted that PDGF and its receptors are overexpressed within the pulmonary artery wall of patients displaying pulmonary arterial hypertension, and that PDGF promotes pulmonary arterial remodelling, which can be, at least in part, treated by PDGF inhibition with

imatinib. Moreover, this molecule has been shown to suppress haematopoietic progenitor cells *in vitro* [8], and in patients with chronic myeloid leukemia [9]. We demonstrated that imatinib decreases the perivascular accumulation of BM-derived c-kit⁺ cells in mice exposed to chronic hypoxia. We therefore hypothesise that c-kit blockade by imatinib may exert its beneficial effect in hypoxic PH, not only by decreasing

pulmonary artery smooth muscle cell proliferation through PDGF receptor inhibition, but also through reduced recruitment of BM-derived c-kit⁺ cells by directly blocking their expansion in the BM and/or *in situ* in the lungs [5, 10].

N. Gambaryan^{*#¶}, F. Perros^{#¶}, D. Montani^{#¶}, S. Cohen-Kaminsky^{#¶}, G.M. Mazmanian^{†+} and M. Humbert^{*#¶}

^{*}Université Paris-Sud, Faculté de Médecine, [#]Centre National de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécélère, [¶]INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire, Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, and [†]Laboratoire de Chirurgie Expérimentale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, Paris, France.

Correspondence: M. Humbert, Service de Pneumologie et Réanimation, Respiratoire, Hôpital Antoine-Bécélère, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, Paris, France. E-mail: marc.humbert@abc.aphp.fr

Support Statement: This study has been supported in part by grants from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and the Université Paris-Sud 11.

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

REFERENCES

- 1 Fadini GP, Avogaro A, Ferraccioli G, *et al.* Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications. *Eur Respir J* 2010; 35: 418–425.
- 2 Davie NJ, Crossno JT Jr, Frid MG, *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.
- 3 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.
- 4 Ogawa M, Matsuzaki Y, Nishikawa S, *et al.* Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 1991; 174: 63–71.
- 5 Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, *et al.* Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 2005; 115: 2811–2821.
- 6 Souza R, Sitbon O, Parent F, *et al.* Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension. *Thorax* 2006; 61: 736.
- 7 Ghofrani HA, Seeger W, Grimminger F. Imatinib for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2005; 353: 1412–1413.
- 8 Bartolovic K, Balabanov S, Hartmann U, *et al.* Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells *in vitro*. *Blood* 2004; 103: 523–529.
- 9 Agis H, Jaeger E, Doninger B, *et al.* *In vivo* effects of imatinib mesylate on human haematopoietic progenitor cells. *Eur J Clin Invest* 2006; 36: 402–408.
- 10 Perros F, Montani D, Dorfmüller P, *et al.* Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2008; 178: 81–88.

DOI: 10.1183/09031936.00052210

3 Conclusion

Cette étude a permis de préciser le rôle des cellules c-kit⁺ dérivées de la moelle osseuse dans le développement de l'HTAP. Nous avons montré que le remodelage vasculaire pulmonaire induit par l'hypoxie était associé à une accumulation des cellules c-kit⁺/FcεRIα⁻/tryptase⁻ dans l'adventice des artères remodelées. L'imatinib prévient l'accumulation des cellules progénitrices ainsi que le développement de l'HTAP induit par l'hypoxie. Cette étude montre que l'imatinib, inhibiteur de bcr-abl/c-kit/PDGFR, prévient le remodelage vasculaire pulmonaire, l'hypertrophie cardiaque et l'HTAP. De plus, imatinib diminue de façon importante l'accumulation des cellules progénitrices c-kit⁺ dans les espaces périvasculaires. L'effet de l'imatinib sur la régression du remodelage vasculaire avait déjà été démontré dans des modèles expérimentaux d'HTAP et dans quelques cas d'HTAP humaine (Schermy et al. 2005; Souza et al. 2006). Il avait également été montré que le PDGF, ainsi que ses récepteurs, étaient surexprimés dans les parois des artères pulmonaires des patients atteints d'HTAP. Le PDGF provoque le remodelage pulmonaire qui peut être réduit, au moins partiellement, par le traitement avec l'imatinib. De plus, cette molécule a un effet supprimeur sur les progéniteurs hématopoïétiques *in vitro* (Bartolovic et al. 2004) et *in vivo*, chez les patients atteints de leucémie myéloïde chronique.

La réduction de l'accumulation des cellules c-kit⁺ dans les lésions vasculaires pulmonaires d'HTAP par l'imatinib peut résulter du blocage de leur expansion dans la moelle osseuse, ou d'une action locale sur ces cellules dans le poumon.

IV - FIBROCYTES CIRCULANTS DANS L'HTAP HUMAINE

1 Introduction

Comme nous l'avons vu précédemment, les cellules souches hématopoïétiques ont un rôle important dans l'HTAP expérimentale et l'HTAP humaine. Cependant, il existe une autre population de précurseurs mésenchymateux circulants d'origine hématopoïétique, impliquée dans la pathogenèse de l'HTAP. Il s'agit des fibrocytes circulants, décrits pour la première fois en 1994 par le group de Bucala *et al* (Bucala et al. 1994). Le terme de fibrocyte a été utilisé pour la première fois en 1994 afin de définir une souspopulation de leucocytes pouvant s'accumuler dans les lésions tissulaires et ayant certaines caractéristiques fibroblastiques (Bellini et al. 2007). Ces cellules représentent moins de 1% des leucocytes circulants et ont pour caractéristique d'exprimer à la fois des marqueurs hématopoïétiques (comme CD34, CD11b et CD45) et des marqueurs mésenchymateux (comme le collagène I, III et la vimentine) (Bucala et al. 1994). Les fibrocytes circulants possèdent de nombreuses fonctions comme la phagocytose, la présentation d'antigène, la production de cytokines, de chimiokines et de matrice extracellulaire, Ils peuvent aussi proliférer et se différencier. Ils sont capables de répondre à une grande variété de cytokines et de facteurs de croissances. Les fibrocytes secrètent des facteurs angiogéniques comme le VEGF et le PDGF-A et ont un effet sur la formation des vaisseaux *de novo* (Hartlapp et al. 2001). De plus, la production de MMP-9 par les fibrocytes provoque l'invasion des cellules endothéliales, ce qui facilite le processus d'angiogenèse. Grâce à leur propriétés multifonctionnelles, les fibrocytes sont impliqués dans plusieurs pathologies caractérisées par un remodelage tissulaire comme la sclérodermie, l'arthrite rhumatoïde, le COPD, l'asthme ou encore le fibrose pulmonaire (Galligan et al.; Schmidt et al. 2003; Strieter et al. 2009).

Les travaux précédents montrent l'implication des fibrocytes circulants dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Dans des modèles d'HTAP induite par l'hypoxie chez le rat, la souris et le veau, les fibrocytes circulants sont recrutés dans l'adventice des petites artères remodelées, commencent à exprimer l' α -SMA et se différencient en

CML (Frid et al. 2006). Ce recrutement peut être diminué par le treprostinil (l'analogue stable de prostacycline) (Nikam et al. 2010).

2 Résultats

Letter 4

Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension

Natalia Gambaryan, Sylvia Cohen-Kaminsky, David Montani, Barbara Girerd, Alice Huertas, Andrei Seferian, Marc Humbert and Frédéric Perros.

European Respiratory Journal, 2011. Accepté pour la publication.

Circulating fibrocytes and pulmonary arterial hypertension

Natalia GAMBARYAN^{1,2,3,4}, Sylvia COHEN-KAMINSKY^{1,2,3,4}, PhD, David MONTANI^{1,2,3,4}, MD, PhD, Barbara GIRERD^{1,2,3,4}, PhD, Alice HUERTAS^{1,2,3,4}, MD, Andrei SEFERIAN^{1,2,3,4}, Marc HUMBERT^{1,2,3,4}, MD, PhD and Frederic PERROS^{1,2,3,4} PhD

¹ *Univ Paris-Sud, Faculté de Médecine, Kremlin-Bicêtre, F-94276;*

² *Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécère, AP-HP, Clamart, F-92140;*

³ *INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire: Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, F-92350;*

⁴ *Département de la Recherche Médicale, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis-Robinson, F-92350;*

To the editors:

We read with great interest the recent editorial by Professor Stenmark and colleagues [1] about the potential role of fibrocytes in pulmonary arterial hypertension (PAH), as well as 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 CXCL12/CXCR4 axis in the lung [4], but the role of fibrocytes in PAH is still not clear. A previous study in rat and calf experimental models of pulmonary hypertension has shown that pulmonary adventitial remodelling is due to robust recruitment of non-resident, bone marrow-derived cells that can produce collagen and express α -actin of smooth muscle cells, thus representing fibrocytes [5]. A unique feature of fibrocytes, described by Bucala et al, is that they are circulating 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 like 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, capacity to proliferate and differentiate. On the other hand, they respond to a variety of cytokines and growth factors. Fibrocytes also produce angiogenic factors such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and platelet-derived growth factor A (PDGF-A) and thus, have a potent effect on *de novo* blood vessel formation, as evidenced by studies in an *in vivo* Matrigel model of angiogenesis. Fibrocyte expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), which mediates endothelial cell invasion, further facilitates the angiogenic process. Fibrocytes have been suggested 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 on Pulmonary Hypertension (Université Paris-Sud, INSERM U999, Hôpital Antoine Bécélère, APHP, Clamart, France). All procedures for informed consent, data collection, and privacy protection were approved by our institutional Ethics Committee. Diagnosis, based on right-heart catheterization demonstrated severe precapillary 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 to identify fibrocytes in triple staining. Fibrocyte number was expressed as absolute cell count per ml of blood and as percentage of total peripheral blood mononuclear cells (PBMC). 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 (0.67 ± 0.02 % in control subjects *vs* 0.22 ± 0.04 % in PAH patients, $p < 0.05$, Fig.1A). However, the number of fibrocytes per ml of blood was not significantly different ($31,709 \pm 6,444$ cells/ml in control subjects *vs* $16,781 \pm 3,256$ cells/ml 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 but also on other PBMC populations. We have shown an increased expression of CD11b on the circulating fibrocytes from PAH patients (1075 ± 116 in control subjects *vs* $2,069 \pm 264$ in PAH patients, $p < 0.001$), normalized to the mean fluorescence

intensity (MFI) of CD11b of isotype controls, indicating increased activation (Fig.1 B-D). We also found CD11b membrane overexpression on PAH monocytes (1462 ± 169 in control subjects vs 2425 ± 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 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's environment, as well as to serum amyloid P (SAP) levels, that have inhibitory action on their differentiation. It was also demonstrated that addition of the profibrotic cytokines IL-4 and IL-13 to human PBMC cultured in serum-free medium, promotes fibrocyte differentiation, whereas antifibrotic cytokines IFN- γ and IL-12 have inhibitory effect. In further studies it will be interesting to examine the level of these factors in plasma of PAH patients. To further explore the functional competence of circulating fibrocytes, we analyzed their capacity to differentiate *in vitro*. We cultured PBMC in serum-free media during 4 days as previously described [8]. After 4 days, PBMC were air dried, acetone-fixed and stained with specific antibodies for fibrocyte quantification (Fig. 1 E-F). We observed a significant decrease in the percentage of differentiated spindle-shaped CD45+vimentin+ cells in PAH patients *in vitro* (73 ± 3 % in control subjects vs 61 ± 2 % in PAH patients, $p < 0.05$, Fig. 1G). In accordance with Nikam et al [2], who found rare fibrocytes in only 2 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 (data not shown) of 4 samples we analysed. Last, we did not find any association between the level of circulating fibrocytes and clinical parameters (pulmonary hemodynamics, New York Heart Association (NYHA) class, six minute walk distance and plasma brain natriuretic peptide), questioning their overall predictive value in PAH (data not shown).

From this study and previous ones on 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 mobilization mechanisms. To prove this hypothesis, additional studies on the expression of adhesion molecules like VLA-4, CCR5 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 ischemic heart disease [9], which occurred in the absence of obvious mobilization defects. Another non-exclusive 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 by us and 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 (CR3), Mac-1 and α M β 2), 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 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 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.

GRANTS: The study was supported by HTAP France association.

Correspondence: Frederic Perros, PhD, INSERM U999, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, 133 avenue de la Resistance, 92350 Le Plessis-Robinson, France.
Tel: +33-1-40 94 25 12; Fax: +33-1-40 94 25 22; e-mail: frederic.perros@gmail.com

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, Weissmann N, Kwapiszewska G, Morrell N, Klepetko W, Fink L, Seeger W, Voswinckel R. 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, 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; [Epub ahead of print].
4. Gambaryan N, Perros F, Montani D, Cohen-Kaminsky S, Mazmanian M, Renaud JF, Simonneau G, Lombet A, Humbert M. Targeting of c-kit⁺ hematopoietic progenitor cells prevents hypoxic pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 2010; [Epub ahead of print].
5. Frid MG, Brunetti JA, Burke DL, Carpenter TC, Davie NJ, Reeves JT, Roedersheimer MT, van Rooijen N, Stenmark KR. 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, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* 1994; 1: 71-81.
7. Strieter RM, Keeley EC, Hughes MA, Burdick MD, Mehrad B. 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, Assmus B, Aicher A, Walter D, Martin H, Zeiher A, Dimmeler S. 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.

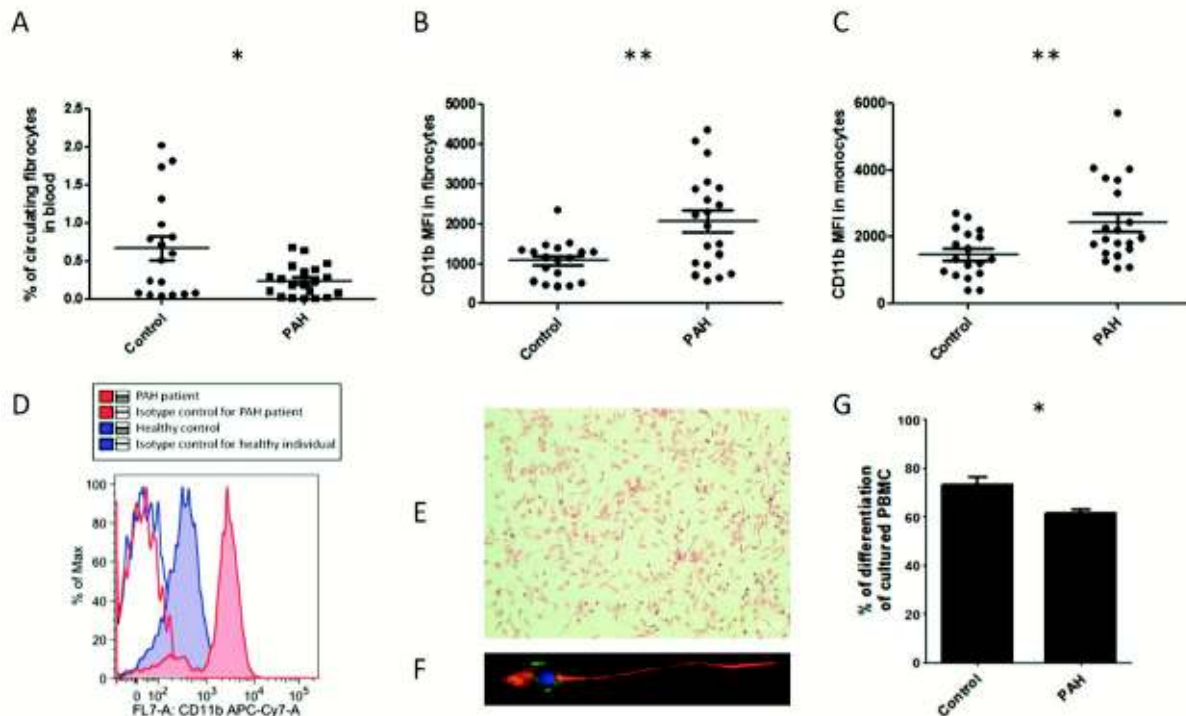


Figure – 1. *Ex vivo* and *in vitro* analysis of circulating fibrocytes in controls compared to PAH patients. (A) Circulating fibrocyte count in peripheral blood of healthy control subjects and PAH patients, characterized by anti-CD11b-APC.Cy7 and anti-CD34-PE.Cy5 surface antibodies (BD Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and intracellular staining with vimentin-phycoerythrin (PE) *versus* IgG1-PE isotype control (Abcam, Paris, France). (B) CD11b mean fluorescence intensity (MFI) on fibrocyte and (C) monocyte population in peripheral blood, normalized to isotype controls. n=18 in 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 and PAH patients (blue tinted and red tinted lines respectively) as compared to isotype controls (blue red and

lines). Flow cytometry data acquisition was performed on a MACSQuant analyzer (Miltenyi, Paris, France) and data were analyzed 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 group. Data are presented as mean±SEM. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA), using t-test and Mann–Whitney U-test. *: p<0.05; **: p<0.001.

3 Conclusion

Cette étude a eu pour but de montrer l'impact des fibrocytes circulants dans l'HTAP humaine. Nous avons montré une diminution du pourcentage (mais pas du nombre absolu) des fibrocytes circulants dans le sang périphérique des patients atteints d'HTAP. Nous avons donc pensé que la quantification des fibrocytes circulants n'est pas suffisante pour juger de leur impact dans la maladie. Nous avons donc examiné leur état d'activation en nous basant sur le taux d'expression de CD11b à leur surface. Nous avons également examiné leur potentiel en tant que biomarqueurs de l'activité et la progression de la maladie, mais aucune corrélation entre le nombre des fibrocytes ni leur état d'activation n'ont été trouvés.

Le taux diminué des fibrocytes circulants dans le sang des patients atteints d'HTAP pourrait s'expliquer par plusieurs hypothèses. Tout d'abord il peut y avoir un défaut dans le mécanisme de mobilisation des fibrocytes. Pour prouver cette hypothèse, une étude supplémentaire de l'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chimiokines, comme VLA-4, CCR5 et CXCR4, sur les fibrocytes circulantes est nécessaire. Par ailleurs, la diminution des fibrocytes peut s'expliquer par la diminution de la prolifération des cellules CD34+, sans défaut de la mobilisation. Cette hypothèse a été développée récemment chez les patients atteints de l'ischémie chronique du cœur (Heeschen et al. 2004). Une autre hypothèse qui n'est pas exclue, associe la diminution des fibrocytes dans le sang périphérique avec leur recrutement dans le poumon. Cette hypothèse, proposée par le group de Stenmark (Frid et al. 2006) est contradictoire avec nos données, ainsi que les données de Nikam et al (Nikam et al. 2010) obtenues sur les poumons humains. Il reste cependant difficile d'extrapoler les données obtenues dans le modèle hypoxique sur l'HTAP humaine. L'HTAP humaine se développe progressivement sur plusieurs années, alors que les animaux deviennent hypertendus pulmonaires après 3 semaine d'exposition à l'hypoxie. Enfin, les poumons analysés sont obtenus au cours de la transplantation et sont donc au stade terminal de la maladie.

Un autre point important de cette étude est l'expression élevée de CD11b à la surface des fibrocytes circulants. CD11b est un intégrine (connue également sous les noms CR₃, Mac-1 et α M β 2) qui est exprimée principalement par les neutrophiles, les macrophages et les monocytes. CD11b est cruciale pour le fonctionnement correct de ces cellules ainsi que le développement de la réponse inflammatoire. CD11b est faiblement exprimée et présente dans sa conformation inactive sur les leucocytes circulants. Cependant, après activation, l'expression de ce marqueur est augmentée (Hogg et al. 2001). Les facteurs qui provoquent l'activation et la surexpression de CD11b ne sont pas encore connus. Plusieurs scénarios expliquant la surexpression de CD11b à la surface des fibrocytes sont possibles. Ce phénomène pourrait être lié à un certain degré d'hypoxémie chez les patients atteints d'HTAP. Il peut également être lié à l'activation cellulaire au cours d'une réponse inflammatoire. Chez les patients atteints d'HTAP, les 2 scénarios sont possibles. La surexpression de CD11b à la surface des fibrocytes pourrait augmenter leur capacité d'adhérence aux cellules endothéliales, d'extravasation et de migration dans les tissus interstitiels adjacents. La question centrale qui reste à élucider : les fibrocytes se différencient-ils en fibroblastes lésionnels et en myofibroblastes ou stimulent-ils la prolifération et la différenciation d'autres cellules précurseurs ou les cellules mésenchymateuses résidentes du poumon ?

En conclusion, nos données indiquent que le taux des fibrocytes circulants ne peut pas être prédictif de l'activation ou la progression de la maladie. L'analyse plus complète de leur état d'activation et de leur fonction est nécessaire.

DISCUSSION & PERSPECTIVES

I PROGENITEURS ET REMODELAGE VASCULAIRE

La première partie de ma thèse a consisté en l'étude du rôle des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans le remodelage vasculaire pulmonaire au cours de l'HTAP. Nous avons mis en évidence une accumulation des progéniteurs c-kit+ autour des artères remodelées et des lésions plexiformes dans les poumons explantés des patients atteints d'HTAP. Je me suis intéressée aux mécanismes responsables de ce recrutement, à la fonction et au destin de ces progéniteurs dans l'HTAP humaine et expérimentale.

Dysfonction endothéliale et recrutement de progéniteurs

L'une des causes principales de l'HTAP est la dysfonction endothéliale qui survient de façon précoce dans la pathogenèse de la maladie. Des études montrent que les cellules endothéliales au sein des lésions plexiformes présentent une origine oligoclonale (Lee, Shroyer et al. 1998). De très récents travaux ayant analysé la ploïdie des CE au sein des artères remodelées manquent d'arguments en faveur de la fusion cellulaire. Cela nous laisse supposer que l'origine de cette oligoclonalité provient soit de l'expansion des cellules souches résidentes pulmonaires soit du recrutement de progéniteurs circulants dérivés de la moelle osseuse. Des études *ex vivo* de réparation vasculaire pulmonaire impliquent le recrutement de progéniteurs angiogéniques CD133+ et leur incorporation dans les artères pulmonaires dans le cas de BPCO (Peinado, Ramirez et al. 2006). Les données obtenues grâce au modèle expérimentale d'HTAP induite par l'hypoxie chronique montrent que la chimiokine CXCL12 mobilise les progéniteurs dérivés de la moelle osseuse en réponse à l'hypoxie (Satoh, Fukumoto et al. 2009). Dans notre étude nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la chimiokine CXCL12 au sein des lésions plexiformes et par les *vasa vasora* qui se développent autour des artères pulmonaires remodelées dans les poumons explantés de patients avec HTAP. Etant donné l'importance pressentie de l'inflammation dans l'HTAP cela n'est pas surprenant car CXCL12 est connue pour son effet chimioattractant pour les neutrophiles (Christopher and Link 2007) et les

lymphocytes T (Oberlin, Amara et al. 1996). Par ailleurs, nos résultats montrent une augmentation de deux populations circulantes de progéniteurs: les progéniteurs angiogéniques ($lin^-/CD34^{high}/CD133^{high}/c-kit^{high}/CXCR4^{low}$) et potentiellement mésenchymateux ($lin^-/CD34^{low}/CD133^-/c-kit^{low}/CXCR4^{high}$) liés à une augmentation du taux plasmatique d'un facteur mobilisant pour les cellules c-kit+, le c-kit soluble. Une source alternative de progéniteurs est l'expansion des cellules souches résidentes pulmonaires. Des études chez le rat montrent que les CE microvasculaires originaires de cellules souches résidentes sont capables de reconstruire toute la hiérarchie microvasculaire (Alvarez, Huang et al. 2008). Chez l'homme le phénotype hyperprolifératif des CE pulmonaires a été décrit récemment (Masri, Xu et al. 2007). De plus, les progéniteurs endothéliaux isolés à partir du sang périphérique des patients atteints d'HTAP et porteurs de la mutation de *BMPR-2* présentent un phénotype hyperprolifératif et une capacité angiogénique anormale, comparés aux témoins (Toshner, Voswinckel et al. 2009).

Mécanismes de recrutement des progéniteurs

Le mécanisme de recrutement des progéniteurs c-kit+ pourrait être lié aux plaquettes. Les anomalies vasculaires rencontrées dans l'HTAP peuvent conduire à une libération par les plaquettes de différents facteurs pro-coagulants, vasoactifs ou mitogéniques. En effet, la fonction des plaquettes n'est pas limitée à la coagulation. Les plaquettes stockent et libèrent d'importants médiateurs qui interviennent dans la vasoconstriction et le remodelage tels que le thromboxane A₂ (TXA₂), le PDGF, la 5-HT, le TGF-β et le VEGF. De plus, une étude très récente montre l'implication des plaquettes dans la régulation du taux circulant et tissulaire des cellules dérivées de la moelle osseuse. En utilisant des souris transgéniques – GFP+ les auteurs montrent que la déplétion des plaquettes avec des anticorps dirigés contre GPIIb/IIIa atténue de façon très significative le recrutement des cellules GFP+ dans les tissus hypoxiques. Inversement, l'injection de plaquettes entraîne la mobilisation de cellules GFP+ dans la circulation et accélère le processus d'angiogenèse dans différents modèles d'ischémie (Feng, Madajka et al. 2011). L'activation des plaquettes chez les patients atteints d'HTAP (Lopes, Maeda et al. 1993; Nakonechnicov, Gabbasov et al. 1996) pourrait donc

favoriser la mobilisation et le recrutement pulmonaire des 2 populations de progéniteurs circulants que nous avons identifiés.

Une autre piste qui nous semble très intéressante est liée aux molécules d'adhésion. La dysfonction endothéliale dans l'HTAP est également caractérisée par l'activation et l'expression de molécules d'adhésion qui entraînent la migration de cellules inflammatoires et de progéniteurs participant au remodelage vasculaire. Les molécules d'adhésion sont exprimées par l'endothélium vasculaire et par les leucocytes en réponse aux signaux inflammatoires (Springer 1990). Alors qu'en conditions physiologiques l'expression des molécules d'adhésion est limitée, afin d'éviter la mise en place d'un processus inflammatoire, une expression importante de molécules d'adhésion est critique pour l'intégrité de la paroi vasculaire au cours de l'inflammation chronique. Chez l'homme, plusieurs publications décrivent une expression accrue de molécules d'adhésion dans la plaque d'athérome (Davies, Gordon et al. 1993; O'Brien, Allen et al. 1993; Johnson-Tidey, McGregor et al. 1994; O'Brien, McDonald et al. 1996). De plus, des taux élevés de molécules d'adhésion solubles ont été associés à une augmentation du risque d'accidents cardiovasculaires (Mulvihill, Foley et al. 2002). Nous avons mesuré une augmentation de l'expression de l'intégrine CD11b à la surface des fibrocytes et des monocytes circulants. CD11b, cruciale pour le fonctionnement normal des neutrophiles, macrophages et monocytes, est également importante dans le développement de la réponse inflammatoire. CD11b est faiblement exprimée et est présente dans sa conformation inactive sur les leucocytes circulants, mais est rapidement surexprimée sous l'influence des signaux inflammatoires (Hogg and Leitinger 2001). Dans le cas des monocytes et des fibrocytes, la surexpression de CD11b pourrait refléter leur activation au cours de la réponse inflammatoire et, par conséquent, une capacité accrue d'adhérer et de migrer au travers de la barrière endothéliale dans les tissus adjacents. Afin de compléter les données que nous avons obtenues, des études supplémentaires sont nécessaires. Il serait intéressant d'examiner *in vitro* la capacité migratoire et l'adhésion des monocytes, dérivés du sang des patients HTAP, sur les cellules endothéliales microvasculaires. Il serait également important d'étudier le profil d'expression des molécules d'adhésions sur les cellules endothéliales des artères distales pulmonaires. Cela pourrait permettre une meilleure

compréhension du mécanisme de la migration des cellules inflammatoires vers le site lésionnel au cours du développement de l'HTAP.

Destin des progéniteurs au cours du remodelage vasculaire

Quant au destin des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse, à part les précurseurs des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses et des fibroblastes, discuté dans les détails dans l'introduction, les études récentes montrent qu'une population parmi les précurseurs endothéliaux caractérisés comme CD133+CD34+KDR+CD45+ représente une lignée hématopoïétique et donne la naissance à des macrophages pro-angiogéniques (Case, Mead et al. 2007; Yoder, Mead et al. 2007). Les macrophages appartiennent à des cellules du système immunitaire inné et contribuent à l'homéostasie tissulaire au cours du développement et chez l'adulte. Ils entraînent également la régénération tissulaire et le remodelage après une atteinte tissulaire grâce à l'induction d'une néoangiogenèse. Le mécanisme impliqué dans la reprogrammation des macrophages vers un phénotype angiogénique, est néanmoins pas connu. L'une des hypothèses est reliée aux cellules apoptotiques (Brecht, Weigert et al. 2011). Les auteurs montrent que les cellules apoptotiques dans des conditions de stress ou d'atteinte tissulaire sont capables d'induire des propriétés angiogéniques dans des macrophages primaires humains. Ils ont également déterminé le médiateur lipidique responsable de ce processus, la sphingosine-1-phosphate (S1P). L'activation des récepteurs de S1P (S1P1/3) provoque la surexpression de la cyclooxygénase-2, l'enzyme responsable de la production des prostanoïdes par les macrophages. La libération de la prostaglandine E2 (PGE2) en particulier, stimule la migration des cellules endothéliales. Il faut noter que parmi les mécanismes impliqués dans le développement de l'HTAP, l'apoptose des cellules endothéliales et la dénudation vasculaire jouent un rôle essentiel dans le déclenchement de la maladie. Selon cette hypothèse, les cellules endothéliales apoptotiques pourraient induire la reprogrammation des macrophages recrutés dans des poumons au stade précoce du développement de l'HTAP, comme cela a été montré sur les modèles expérimentaux (Frid, Brunetti et al. 2006).

II LE TRIO CXCL₁₂, CXCR₄ ET CXCR₇

Dans un deuxième temps nous avons montré que la chimiokine CXCL₁₂ et ses 2 récepteurs CXCR₄ et CXCR₇ sont impliqués dans l'HTAP induite par l'hypoxie chez la souris et participent au recrutement des cellules progénitrices c-kit⁺ dérivées de la moelle osseuse. Les cellules c-kit⁺ migrent et se positionnent dans le poumon afin de participer au remodelage vasculaire pulmonaire. Nous avons utilisé les antagonistes spécifiques des récepteurs CXCR₄ et CXCR₇ (AMD₃₁₀₀ et CCX₇₇₁ respectivement), afin d'étudier leur importance dans le recrutement des progéniteurs dans le poumon des souris hypoxiques. Nous avons mis en évidence que le blocage du récepteur CXCR₄ seul ou en association avec le blocage de CXCR₇ diminue le recrutement des cellules progénitrices c-kit⁺ et prévient l'HTAP. L'utilisation simultanée des 2 antagonistes AMD₃₁₀₀ et CCX₇₇₁ grâce à leurs actions synergiques semble être la plus efficace dans la lutte contre l'HTAP.

Nous avons montré que l'antagoniste de CXCR₄, AMD₃₁₀₀, atténue l'accumulation des cellules c-kit⁺ et améliore en partie les paramètres de l'HTAP. CXCR₄ a été le premier récepteur de chimiokine à être identifié comme co-récepteur d'entrée du VIH. En effet, ce récepteur est exprimé à la surface de la majorité des cellules hématopoïétiques incluant les lymphocytes T, les cellules B et leurs précurseurs, les monocytes, les neutrophiles, les cellules progénitrices CD₃₄⁺ dérivées de la moelle osseuse. Il est également présent à la surface des cellules dendritiques dérivées du sang, des cellules de Langerhans, des cellules T matures ou non du thymus. En plus, CXCR₄ est exprimée à la surface des cellules endothéliales vasculaires, des neurones du système nerveux central et périphérique, des microglies et des astrocytes (Murphy, Baggiolini et al. 2000). Ainsi, les souris n'exprimant pas CXCR₄ ou CXCL₁₂ meurent *in utero* ou à la naissance dû à un cerveau sous-développé, une malformation de la valve cardiaque ainsi qu'un mauvais fonctionnement du septum ventriculaire entraînant une communication interventriculaire (Nagasawa, Hirota et al. 1996; Tachibana, Hirota et al. 1998). L'interaction de CXCL₁₂ avec son récepteur CXCR₄ régule plusieurs processus biologiques essentiels comprenant le développement du cœur, des neurones, la mobilisation des cellules souches, la néo-vascularisation et la

tumorigenèse (Vandercappellen, Van Damme et al. 2011). En absence de pathologie, ce couple ligand/récepteur participe à l'homéostasie. Cependant, l'axe CXCL12/CXCR4 joue également un rôle important dans la dissémination des métastases qui comprend la transformation cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion à travers la matrice extracellulaire et la membrane vasculaire basale, l'entrée dans la circulation sanguine et éventuellement le développement de nouveaux sites métastatiques dans les organes spécifiques (Kucia, Reza et al. 2005). Ainsi, le couple CXCL12/CXCR4 représente une cible thérapeutique potentielle comme traitement anti-cancéreux à cause de sa capacité à attirer les cellules cancéreuses exprimant CXCR4 vers un organe spécifique exprimant CXCL12. La liaison de CXCL12 à CXCR4 module l'activation et l'interaction avec des protéines G et induit le recrutement de la β -arrestine à CXCR4 en activant une cascade de signalisation *via* ERK1/2 (Busillo, Armando et al. 2010). Par ailleurs, pour CXCR4 la signalisation par la voie β -arrestine semble nécessaire pour la migration cellulaire (Sun, Cheng et al. 2002).

L'antagoniste AMD3100 qui est une molécule synthétique appartenant à la famille des bicyclams, se lie à CXCR4 et bloque la signalisation induite par CXCL12. De plus, l'AMD3100 n'est pas toxique et présente un index de sélectivité très élevé envers sa cible (De Clercq 2009). Aujourd'hui, nous savons que l'interaction de CXCL12 à CXCR4 joue un rôle crucial dans la domiciliation des cellules souches hématopoïétiques dans la moelle osseuse. L'interaction CXCL12-CXCR4 retient les cellules souches hématopoïétiques au niveau de la moelle osseuse et assure la présence d'un pool de cellules souches nécessaires pour une hématopoïèse efficace (De Clercq 2009). Selon notre hypothèse, l'AMD3100 empêche la liaison de CXCL12, induit une mobilisation des précurseurs hématopoïétiques dans la circulation, mais bloque leur recrutement vers le site inflammatoire. L'administration de AMD3100 à des souris placées en hypoxie a confirmé que l'AMD3100 atténue le recrutement pulmonaire des cellules progénitrices c-kit⁺. L'effet partiel de cet antagoniste sur le recrutement des c-kit⁺ et la régression de l'HTAP pourrait être liés à l'existence d'un autre récepteur de CXCL12, CXCR7.

Avant la découverte de son interaction avec CXCL12, CXCR7 était considéré comme un récepteur orphelin, c'est à dire sans ligand connu. La chimiokine CXCL11 (ITAC, *Interferon -inducible T-cells alpha chemoattractant*) a également été identifiée

comme liant CXCR7 (Burns, Summers et al. 2006). CXCR7 est un récepteur exprimé de façon ubiquitaire dans les tissus hématopoïétiques et non-hématopoïétiques et se trouve exprimé en surface des neutrophiles, des monocytes, des lymphocytes B et T ainsi que leurs précurseurs (Balabanian, Lagane et al. 2005; Infantino, Moepps et al. 2006; Sierro, Biben et al. 2007). CXCR7 se trouve également exprimé au niveau des cellules endothéliales tôt dans le développement embryonnaire (Burns, Summers et al. 2006). Tout comme pour CXCR4, l'absence d'expression de CXCR7 cause une malformation de la valve cardiaque ainsi qu'un mauvais fonctionnement du septum ventriculaire provoquant la mort périnatale (Sierro, Biben et al. 2007). Ainsi, CXCR7 joue un rôle dans le développement du système cardiovasculaire que ce soit au niveau de la formation des différents compartiments du cœur ou au niveau de sa vascularisation.

La découverte de CXCR7 comme ligand naturel de CXCL12 mène à revoir les données antérieures et leurs interprétations concernant les effets biologiques de CXCL12, qui avaient été attribuées exclusivement à CXCR4. En plus d'être potentiellement impliqué dans le processus d'hématopoïèse, CXCR7 joue un rôle important dans la tumorigenèse. En effet, l'expression de CXCR7 augmente la prolifération des cellules tumorales fibroblastiques (Raggio, Ruhl et al. 2005). De plus, ce récepteur joue un rôle clé dans l'induction du développement, de la progression, et de la prolifération de la tumeur, et ce, indépendamment de la présence de CXCR4. Il a été montré que CXCR7 induisait la croissance des cellules dans le cancer du sein et du poumon. De plus, CXCR7 se retrouve exprimé au niveau de vaisseaux sanguins associés à la tumeur mais pas dans des vaisseaux sanguins normaux (Miao, Luker et al. 2007). Ainsi, l'expression membranaire de CXCR7 est proportionnelle à la prolifération et à la vascularisation de la tumeur. Dans une étude plus récente, CXCR7 a été identifié comme étant fortement exprimé à la surface des cellules humaines de cancer de la prostate (Wang, Shiozawa et al. 2008). Dans ces cellules, il a été montré que CXCR7 régule la prolifération, la survie et l'adhésion cellulaire, le chimiotactisme et induit l'expression de facteurs pro-angiogéniques tel que l'interleukine-8 (Maksym, Tarnowski et al. 2009).

Les stratégies thérapeutiques visant CXCR7 représentent une opportunité unique dans le traitement du cancer tel que le cancer du sein et du poumon (Miao, Luker et al. 2007). Dans cet article, les auteurs montrent que CXCR7 seul induit le développement et la croissance des tumeurs du cancer du sein et du poumon, et ce, en l'absence de CXCR4. D'ailleurs, l'abolition de l'expression de CXCR7 par des siRNA résulte en une diminution significative de la taille des tumeurs. Toutefois, les mécanismes fonctionnels par lesquels CXCR7 promeut la croissance cellulaire des tumeurs du sein et du poumon sont encore inconnus. Aussi, les rôles de CXCR7 au niveau de la domiciliation, de la mobilisation, de la prolifération et de la survie cellulaire des cellules souches hématopoïétiques restent à clarifier.

CXCR7 est un récepteur de chimiokine dont la voie de signalisation n'est pas classique pour un récepteur à 7 segments transmembranaires. Contrairement au récepteur de chimiokine CXCR4, CXCR7 n'active pas les protéines G hétérotrimériques classiques, ni n'induit le chimiotactisme. Toutefois, le rôle de CXCR7 dans le processus du chimiotactisme est plutôt controversé. Grymula *et al* et Burns *et al* démontrent que CXCR7 n'induit pas le chimiotactisme (Burns, Summers et al. 2006; Grymula, Tarnowski et al. 2010), alors que Balabanian *et al* montrent le contraire (Balabanian, Lagane et al. 2005). Une étude récente a montré que CXCR7 interagit de façon constitutive avec la sous-unité G α i sans engendrer son activation (Levoye, Balabanian et al. 2009). En revanche, le motif hautement conservé DRYLAIV, connu pour interagir avec la protéine G hétérotrimérique et qui est essentiel pour la transduction du signal en réponse au ligand, est altéré dans CXCR7, ce qui pourrait expliquer la nature inhabituelle de son interaction avec la sous-unité G α i (Thelen and Thelen 2008). De plus, l'activation de CXCR7 ne mène pas à l'activation du flux calcique qui passe normalement par l'interaction et l'activation de la protéine Gq (Burns, Summers et al. 2006). Toutefois, le recrutement de la β -arrestine pourrait aussi se faire indépendamment de l'interaction du récepteur avec la protéine G hétérotrimérique, et pourrait induire à son tour des cascades de signalisation menant à l'activation des Map kinase telles que les MAPK 42/44. Rajagopal *et al* montrent que l'activation des MAPK 42/44 *via* CXCR7 est uniquement médiée par le recrutement de la β -arrestine, et non par son interaction avec les protéines G hétérotrimériques (Rajagopal, Kim et al. 2010).

De plus, CXCR7 peut s'hétérodimériser avec CXCR4 et ainsi diminuer la signalisation des protéines G médiée par CXCR4 (Levoye, Balabanian et al. 2009). Il a été suggéré que la modulation fonctionnelle de CXCR4 est l'un des principaux rôles de CXCR7 (Thelen and Thelen 2008). Plusieurs groupes de recherche considèrent CXCR7 comme un récepteur « decoy », c'est à dire sans signalisation propre et qu'il est fonctionnel uniquement lorsqu'il forme un dimère avec un autre récepteur de chimiokine (Haraldsen and Rot 2006; Thelen and Thelen 2008). D'autres auteurs observent que CXCR7 joue le rôle d'adaptateur pour un groupe de molécules impliquées dans l'activation rapide des intégrines *via* CXCL12/CXCR4 (Hartmann, Grabovsky et al. 2008). Dans cette étude, il est montré que CXCR7 se trouve plutôt dans des vésicules d'endosomes précoces situées sous la membrane cellulaire et qu'il y a un recyclage constant de CXCR7 entre cette membrane et les vésicules d'endosomes. Ceci assure un pool cytoplasmique de CXCR7 ayant pour le but de provoquer l'activation des intégrines sur une longue période de temps (Hartmann, Grabovsky et al. 2008).

Les molécules synthétiques ciblant CXCR7 et développées initialement ont été proposées en tant qu'antagonistes de ce récepteur. Par exemple CCX451, identifiée pour la première fois par Melikian *et al* inhibe la liaison du CXCL12 radioactif au récepteur CXCR7 (Melikian, Burns et al. 2004). CCX451 a été initialement considérée, par les auteurs, comme un antagoniste puisqu'elle inhibe l'interaction de liaison entre CXCL12 et CXCR7. Par la suite, un analogue de CCX451 a été créé, le CCX754. Le CCX754 a des propriétés pharmaco-cinétiques supérieures à celles du CCX451. CCX754 se lie plus fortement à CXCR7 et montre une grande sélectivité à CXCR7 par rapport aux autres CXCRs (Burns, Summers et al. 2006). L'efficacité de CCX754 a aussi été évaluée *in vivo* chez des souris SCID (*severe combined immunodeficiency*) où ces molécules réduisent la taille des tumeurs de différents cancers tels que le lymphome humain de type B, le cancer humain et murin du poumon et induisent le recrutement de la β -arrestine à CXCR7 (Zabel, Wang et al. 2009). Cet effet sur la prolifération cellulaire a été également confirmé *in vitro* (Burns, Summers et al. 2006).

Dans notre étude, nous avons utilisé une nouvelle molécule de la série « CCX », développée par la compagnie « Chemocentryx » ciblant sélectivement CXCR7, la molécule CCX771. Cependant, il a été montré récemment que CCX771 induit le

recrutement de la β -arrestine à CXCR7 avec un EC_{50} de 2,8nM, comparativement à 52nM pour CXCL12 (Zabel, Wang et al. 2009). CCX771 inhibe plus fortement la migration transendothéliale des cellules induite *via* l'axe CXCL12/CXCR4, comparé à l'AMD3100 (Zabel et al., 2009). Cette activation de la voie β -arrestine pourrait indiquer que ce serait plutôt l'activation de CXCR7 par les composés « CCX », et non pas leur inhibition, qui serait responsable de leurs effets. Ils ne seraient donc non pas antagonistes, mais agonistes de CXCR7. Nos résultats pourraient donc être réinterprétés à la lumière de cette hypothèse sur le mode de fonctionnement supposé de CCX771. Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'un des principaux rôles de CXCR7 est la modulation fonctionnelle de CXCR4. La formation d'un hétérodimère avec CXCR4 diminue la signalisation des protéines G médiée par ce dernier. Cela pourrait expliquer l'effet synergique de ces deux molécules.

Afin de compléter les données que nous avons obtenues sur le rôle de CXCL12, CXCR4 et CXCR7 dans l'HTAP, il serait intéressant d'étudier les divers polymorphismes de cette chimiokine et leurs récepteurs dans des cohortes de patients atteints d'HTAP. Nous pourrions ainsi analyser s'il y a une association entre ces polymorphismes et la survenue de l'HTAP ou de sa progression, ou d'autres paramètres étudiés. Récemment, Lee *et al* ont étudié la présence du polymorphisme de CXCL12 et CXCR4 chez des patients ayant un cancer du poumon non à petites cellules et chez des individus témoins (Lee, Kuo et al. 2011). Ils ont constaté que les patients porteurs homozygote de certains polymorphismes de CXCL12 et CXCR4 sont plus susceptibles de développer la maladie. Une autre étude sur une cohorte iranienne de patients atteints de cancer du poumon a montré que le polymorphisme G801A de CXCL12 est lié à une susceptibilité de développer la maladie (Razmkhah, Doroudchi et al. 2005).

L'ensemble de ces éléments met en évidence le rôle des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse dans le remodelage vasculaire pulmonaire. Ces cellules pourraient avoir dans certains cas un intérêt en tant qu'outils de diagnostic permettant soit d'identifier des sujets à risque pour l'HTAP avant l'apparition de symptômes cliniques, soit de

permettre de prédire l'évolution de l'HTAP afin d'adapter le traitement en conséquence. D'autre part, les molécules ciblant la chimiokine CXCL12 et ses récepteurs CXCR4 et CXCR7 constituent un nouveau type de traitement très prometteur pour de nombreuses pathologies, dont l'HTAP (Figure 21).

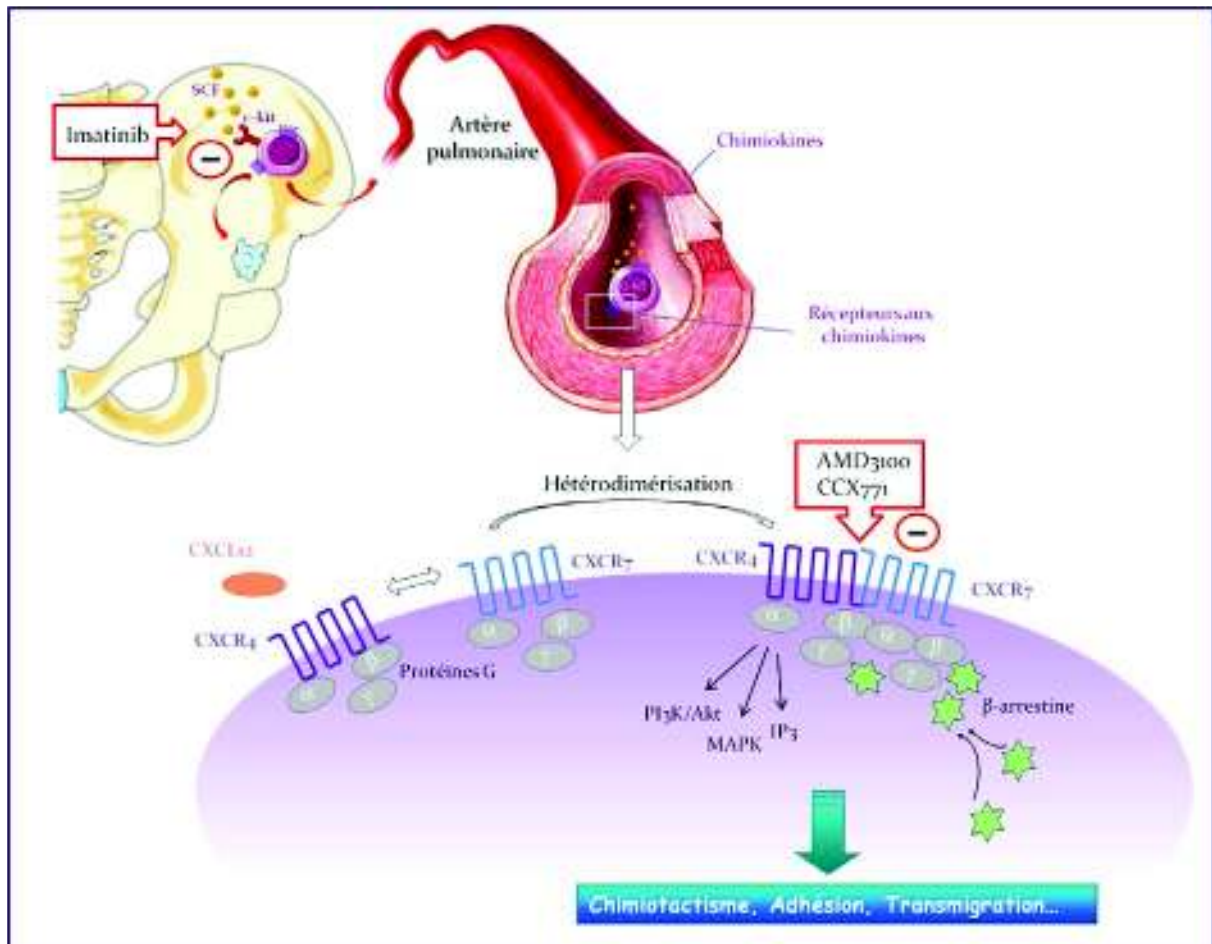


Figure 21 - Modèle intégré de la réponse chimiotactique des progéniteurs dérivés de la moelle osseuse à la chimiokine CXCL12. En réponse à CXCL12, CXCR4 forme un hétérodimère avec CXCR7 et entraîne différentes cascades de signalisations menant à la migration cellulaire. L'imatinib intervient au niveau de la moelle osseuse en inhibant c-kit et empêche la liaison avec SCF en diminuant la survie des cellules progénitrices. AMD3100 et CCX771 agissent en antagonisant les récepteurs CXCR4 et CXCR7 respectivement et inhibent la migration, l'adhésion et la transmigration des progéniteurs.

Article 5

**Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary
arterial hypertension in rats**

Price L, Montani D, Tcherakian C, Dorfmueller P, Souza R, Gambaryan N, Chaumais MC, Shao D, Simonneau G, Howard L, Adcock IM, Wort SJ, Humbert M and Perros F.

European Respiratory Journal, 2011, 37(4): 813-822.



Dexamethasone reverses monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats

L.C. Price^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, D. Montani^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, C. Tcherakian^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, P. Dorfmüller^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, R. Souza^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, N. Gambaryan^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, M-C. Chaumais^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, D.M. Shao⁺, G. Simonneau^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}, L.S. Howard[§], I.M. Adcock[‡], S.J. Wort⁺, M. Humbert^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||} and F. Perros^{*,#,\\$,†,‡,§,¶,||}

ABSTRACT: Pulmonary arterial hypertension (PAH) is associated with dysregulated bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-II signaling and pulmonary vascular inflammation. We evaluated the effects of dexamethasone on monocrotaline (MCT)-induced PAH in rats for potential reversal of PAH at late time-points.

Saline-treated control, MCT-exposed, MCT-exposed and dexamethasone-treated rats (5 mg·kg⁻¹·day⁻¹, 1.25 mg·kg⁻¹ and 2.5 mg·kg⁻¹·48 h⁻¹) were evaluated at day 28 and day 35 following MCT for haemodynamic parameters, right ventricular hypertrophy, morphometry, immunohistochemistry, and *IL6* and *BMPR2* expression.

Dexamethasone improved haemodynamics and pulmonary vascular remodelling, preventing PAH development at early (day 1–14 and 1–28) and reversing PAH at late (day 14–28 and 21–35) time-points following MCT, as well as improving survival in MCT-exposed rats compared with controls. Both MCT-induced pulmonary *IL6* overexpression and interleukin (IL)-6-expressing adventitial inflammatory cell infiltration were reduced with dexamethasone. This was associated with pulmonary *BMPR2* downregulation following MCT, which was increased with dexamethasone, in whole lung and control pulmonary artery smooth muscle cells. Dexamethasone also reduced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells *in vitro*.

Experimental PAH can be prevented and reversed by dexamethasone, and survival is improved. In this model, mechanisms may involve reduction of IL-6-expressing inflammatory cells, restoration of pulmonary *BMPR2* expression and reduced proliferation of vascular smooth muscle cells.

KEYWORDS: Bone morphogenetic protein receptor, corticosteroids, inflammation, monocrotaline, pulmonary arterial hypertension, type II

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is characterised by a progressive increase in pulmonary vascular resistance, ultimately leading to right ventricular failure and death [1]. The principal pathological finding is remodelling of small pulmonary arteries with marked proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC), resulting in obstruction of these resistance pulmonary arteries [2]. Inflammatory mechanisms are believed to play a key role in both human and experimental PAH [3]. In idiopathic (I)PAH, infiltrates of macrophages and lymphocytes are found in the range of plexiform lesions with local expression of chemokines CC motif ligand (CCL)2 (monocyte chemoattractant protein-1), CCL5 (RANTES (regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted)) and CX₃C motif ligand 1 (fractalkine) [4–7].

Histopathological specimens from patients displaying severe PAH in the context of connective tissue diseases suggest that inflammation and remodelling are key contributors to pulmonary vascular disease complicating inflammatory diseases [4]. Proinflammatory cytokines, including interleukin (IL)-1 and IL-6, are elevated in both human IPAH [8] and MCT-induced PAH [9, 10]. Autoimmunity is also demonstrated to contribute to PAH in patients characterised by circulating autoantibodies [11]. Pathogenic autoantibodies target endothelial cells and may induce vascular endothelial apoptosis, promoting PAH development [12].

The suggestion that treatment with corticosteroids and/or immunosuppressants may dramatically improve PAH stems from the improvement seen

AFFILIATIONS

*Faculté de Médecine, Université Paris-Sud, Paris,

#AP-HP, Centre National de Référence de l'Hypertension

Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Hôpital Antoine Bécclère, Clamart,

†INSERM U999, Hypertension Artérielle Pulmonaire,

Physiopathologie et Innovation Thérapeutique, IPSIT, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France.

‡Unit of Thoracic Critical Care,

§Dept of Cell and Molecular Biology, Airways Disease Section, National Heart and Lung Institute, Faculty of Medicine, Imperial College London, and

¶National Pulmonary Hypertension Service, Dept of Cardiac Sciences, Hammersmith Hospital, Imperial College Healthcare NHS Trust, London, UK.

CORRESPONDENCE

M. Humbert, Centre National de Référence de l'Hypertension Artérielle Pulmonaire, Service de Pneumologie, Hôpital Antoine Bécclère, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Université Paris-Sud 11, 157 rue de la Porte de Trivaux, 92140 Clamart, France.
E-mail: marc.humbert@abc.aphp.fr

Received:

Feb 20 2010

Accepted after revision:

July 15 2010

First published online:

Aug 06 2010

European Respiratory Journal

Print ISSN 0903-1936

Online ISSN 1399-3003

in associated PAH following treatment for coexisting systemic inflammatory conditions, including POEMS (polyneuropathy, organomegaly, endocrinopathy, monoclonal immunoglobulin and skin changes) syndrome [13], Castleman's disease [14], systemic lupus erythematosus (SLE) [15, 16] and mixed connective tissue disease [15, 16]. Immunosuppressive therapies including rapamycin [17] and cyclosporin [18] have been shown to attenuate the development of PAH in rats exposed to MCT, including established PAH [17, 18]. Earlier studies have shown that steroids prevent the development of MCT-induced PAH [9, 19–21], although no studies have yet shown that steroids reverse established MCT-induced PAH.

Mutations in the bone morphogenetic protein receptor (BMPR)-II gene (*BMPR2*) have been identified in >50% of familial (F)PAH patients and 10–25% of IPAH patients [22, 23]. Reduced levels of *BMPR1a* [24] and *BMPR2* [25, 26] mRNA expression are seen in the lungs of patients with heritable PAH and IPAH, and in other subtypes of PAH. This reduction in pulmonary *BMPR2* is mirrored in MCT-induced PAH [27, 28]. These mutations disrupt bone morphogenetic protein (BMP)/Smad-mediated signalling [29], potentiate BMP/mitogen-activated protein kinase signalling [30] and could underlie the abnormal vascular cell proliferation observed in FPAH [31]. Interestingly, several studies suggest that dysregulation of the BMP pathway leads to vulnerability to an inflammatory second hit [32–34].

The aim of this study was to test the effects of dexamethasone on pulmonary haemodynamics, and *IL6* and *BMPR2* expression in the asymptomatic and symptomatic phases of development of MCT-induced PAH in rats. We hypothesised that dexamethasone treatment could reverse haemodynamics in established MCT-induced PAH, and that haemodynamic improvements would correlate with normalisation of *IL6* and *BMPR2* mRNA levels.

METHODS

Study design

Male Wistar rats (100 g body weight) were maintained in a temperature-controlled room with a 12/12-h light/dark cycle and randomly divided into: 1) a saline-treated control group ($n=20$); 2) an MCT-exposed group ($n=20$); 3) an MCT-exposed and $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (day 1–14) dexamethasone-treated group (MCT+Dex D1–14; $n=20$); 4) an MCT-exposed and $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (*i.p.*; day 1–28) dexamethasone-treated group (MCT+Dex D1–28; $n=10$); 5) an MCT-exposed and dexamethasone-treated (three dose ranges of $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (Dex5), $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 48 \text{ h}^{-1}$ (Dex2.5) and $1.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot 48 \text{ h}^{-1}$ (Dex1.25); day 14–28; MCT+Dex D14–28) ($n=10$ per group); and 6) an MCT-exposed and $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (day 21–35) dexamethasone-treated group (MCT+Dex D21–35) ($n=10$ per group). All rats had access to standard rat chow and water *ad libitum*. For MCT administration, rats received a single subcutaneous injection of $60 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ MCT (Sigma–Aldrich, Lyon, France), which was dissolved in 1 N HCl, and the pH was adjusted to 7.4 with 1 N NaOH. Ten rats from groups 1–3 were sacrificed to perform experiments 14 days after the MCT exposure and the remaining 10 rats from each group were then sacrificed at 28 or 35 days after MCT exposure.

Haemodynamics

As described by STINGER *et al.* [35], a 3.5 French umbilical vessel catheter (Tyco, Plaisir, France), angled to 90° over the distal 1 cm

and curved slightly at the tip, was introduced into the right external jugular vein of rats anaesthetised with $35 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ketamine, $4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ xylazine and $0.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ acepromazine. Following deaths during anaesthesia in preliminary experiments, presumed relative adrenal suppression was managed using a $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ dose of *i.p.* dexamethasone prior to induction of anaesthesia. With the angle directed anteriorly, the catheter was inserted 2.5 cm proximally, which placed the catheter in the right atrium. The catheter was rotated 90° anticlockwise and inserted 1 cm further, which placed the catheter in the right ventricle, and when advanced an additional 1.5 cm, in the pulmonary artery. Placement at each stage was confirmed by respective pressure contours. Haemodynamic values were automatically calculated by the physiological data acquisition system Cardiomax III (Phymep, Paris, France). Following exsanguination, the lungs were distended by infusion of Optimal Cutting Temperature compound (Miles, Epernon, France) diluted in PBS (1:1) into the trachea, quick-frozen in isopentane on dry ice and stored at -80°C . For Fulton's index of right ventricular hypertrophy, the ratio of the right ventricular weight to left ventricular plus septal weight (RV/LV+S) was calculated.

Gene quantification by quantitative real-time RT-PCR

RNA was extracted from rat lungs using the Total RNA Isolation Mini Kit (Agilent Technologies, Massy, France) and then eluted from silicate columns and reverse-transcribed using the Omniscript Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Constitutively expressed β -actin was selected as an internal housekeeping gene control for the comparative CT method for the relative quantification of *BMPR2* and *IL6* mRNA expression. *BMPR2*, *IL6* and β -actin expression was quantified by RT-PCR using TaqMan Gene Expression Assays (β -actin Rn00667869_m1, *BMPR2* Rn01437210_m1 and *IL6* Rn00561420_m1), TaqMan Universal PCR Master Mix and an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France).

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on $8\text{-}\mu\text{m}$ sections of frozen tissue (-80°C). After routine preparation, slides were processed with the primary antibody anti-IL-6 (1:600; Abcam rabbit polyclonal ab6672; Abcam, Cambridge, UK), then with the secondary antibody (anti-rabbit; kit En Vision+ /HRP; Dako, Trappes, France). Controls used for these antibodies included omission of the primary antibody and incubation with irrelevant immunoglobulins of the same isotype.

Pulmonary artery morphometry

Sections of paraffin-embedded lungs were prepared and stained with haematoxylin and eosin. The slides were evaluated by light microscopy, and the extent of vascular remodelling was assessed by a researcher blinded to the treatment groups. Three whole left lung sections from each rat were evaluated. The percentage medial wall (media/external diameter (ED) $\times 100$) and adventitial thickness (adventitia/ED $\times 100$) of fully muscularised, pre-acinar pulmonary arteries was measured, using 10 randomly chosen vessels from each of the three sections for each rat. For arterioles ($<80 \mu\text{m}$ ED), the degree of muscularisation was score of a scale of 1–3, where: 1=no muscularisation, not occluded; 2=muscularisation, not occluded; and 3=muscularisation, fully occluded).

Primary smooth muscle cell isolation and culture

At baseline (control) and 21 days following exposure to MCT, rats were sacrificed using an overdose of pentobarbital. The lungs were immediately removed and proximal pulmonary arteries were isolated. PASMCs were isolated by enzymatic digestion [36], with purity and verification of PASMCs using immunostaining for smooth muscle α -actin as previously described [37].

Measurement of PASMC proliferation

PASMCs were cultured to 80% confluence in passage 3–6. On day 0 of the proliferation assay, cells were detached with 0.05% trypsin and 0.02% EDTA and seeded in 48-well plates at a density of 5×10^4 cells·well⁻¹ (in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS)). After 48 h of incubation (day 2), the cells were serum-starved (in DMEM with 0.1% FCS) for 24 h. On day 3, cells were washed twice with PBS and recultured in DMEM (10% FCS) with dexamethasone (Sigma–Aldrich). On the basis of preliminary experiments examining the antiproliferative effects of dexamethasone on 10% FCS-stimulated rat PASMCs, the final concentrations used were 10^{-7} – 10^{-8} M. Controls were cultured in DMEM with 10% FCS. On day 4, 24 h after the addition of dexamethasone, the cells were labelled with ³H-thymidine at 1 μ Ci·mL⁻¹ for 24 h and frozen at -80°C. After labelling was completed in all samples, the cells were washed *in situ* with 500 μ L ice-cold uptake buffer, lysed with 500 μ L of 0.1 N NaOH and the radioactivity counted using liquid scintillation spectroscopy [37].

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM, unless otherwise stated. Data were analysed using the nonparametric Kruskal–Wallis test followed by Dunn's test for multiple comparisons, the Mann–Whitney U-test and Spearman's rank correlation. Differences were considered significant at p-values <0.05. Analyses were performed using Statview 5.0.

RESULTS

Dexamethasone treatment improves survival in established MCT-induced PAH

Treatment with 5 mg·kg⁻¹·day⁻¹ dexamethasone from day 14–28 significantly improved survival assessed at day 28 compared with MCT alone (log rank test $p < 0.0001$; fig. 1). Survival was also significantly improved at day 35 following day 21–35 dexamethasone (data not shown).

Dexamethasone treatment normalises haemodynamics and right ventricular hypertrophy in established MCT-induced PAH

28 days after MCT administration, haemodynamic measurements showed a significant increase in mean pulmonary arterial pressure (\bar{P}_{pa} ; 40.8 ± 6.4 versus 16.4 ± 1.5 mmHg in control animals; $p < 0.0001$; fig. 2a), right ventricular systolic pressure (RVSP; 94.3 ± 7.8 versus 35.2 ± 2.4 mmHg in control rats; $p < 0.0001$; fig. 2b) and RV/LV+S (0.6 ± 0.1 versus 0.26 ± 0.06 in controls; $p < 0.0001$; fig. 2c). MCT+Dex D14–28 administration normalised the \bar{P}_{pa} ($p < 0.05$ for Dex5 and Dex2.5; $p = 0.066$ for Dex1.25), RVSP ($p < 0.0001$ for Dex5 and Dex2.5, and $p < 0.05$ for Dex1.25) and RV/LV+S ($p < 0.0001$ for all doses) in a dose-dependent manner. Dex5 was not statistically different to

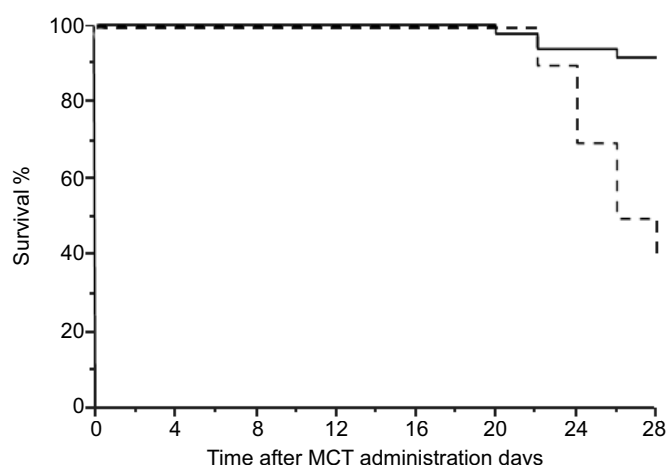


FIGURE 1. Dexamethasone treatment improves survival in monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension. Treatment with 5 mg·kg⁻¹·day⁻¹ dexamethasone from day 14 to 28 (—) had a significant positive impact on survival at day 28 (log rank test, $p = 0.001$) compared to MCT alone (---).

control rats ($p = 0.11$). MCT+Dex D21–35 also normalised \bar{P}_{pa} , RVSP and RV/LV+S ($p < 0.05$ for all compared to MCT alone; fig. 3). Haemodynamic indices were also normalised in all earlier, preventative-phase dexamethasone-treated groups (MCT+Dex D1–14 and D1–28; $p < 0.001$ for both; data not shown).

Dexamethasone treatment reverses pulmonary vascular remodelling in established MCT-induced PAH

Dexamethasone treatment (day 14–28) reduced the degree of muscularisation of peripheral pulmonary arteries and arterioles, as assessed by morphometric analysis. MCT significantly increased the percentage medial thickness of pre-acinar pulmonary arteries (expressed as media/ED $\times 100$) at day 28 compared to controls (31.4 ± 10.1 versus $10.8 \pm 4.93\%$; $p < 0.0001$). This was reduced in a dose-dependent fashion in all the MCT+Dex D14–28 group at day 28 compared to MCT alone ($20.7 \pm 9.47\%$, $18.8 \pm 7.7\%$ and $14.7 \pm 7.46\%$ for Dex1.25, Dex2.5 and Dex5, respectively, versus $31.4 \pm 10.1\%$; $p < 0.0001$ for all). Pulmonary arterial adventitial thickness was also increased at day 28 following MCT compared with control rats (36.5 ± 34.3 versus $8.83 \pm 4.95\%$; $p < 0.0001$), which was reduced with all D14–28 dexamethasone doses ($24.0 \pm 12.6\%$, $16.3 \pm 10.4\%$ and 9.47 ± 5.39 for Dex1.25, Dex2.5 and Dex5, respectively, versus $36.5 \pm 34.3\%$; $p < 0.0001$ for Dex5 and Dex2.5, and $p < 0.05$ for Dex1.25; fig. 4a and b). At day 28 following MCT, there was a significant increase in pulmonary arteriolar (*i.e.* vessels < 80 μ m ED) muscularisation, with an increase seen in the percentage of both nonoccluded and occluded arterioles compared with control rats ($p < 0.0001$). Following MCT+Dex D14–28, the arteriolar muscularisation score was reduced in a dose-dependent manner ($p < 0.05$ for all groups; fig. 4c).

Dexamethasone reduces MCT-induced adventitial infiltration of IL-6-expressing inflammatory cells

In control lungs, immunohistochemistry showed only a weak staining of IL-6 in control lungs (fig. 5a), whereas 28 days after MCT administration, adventitial infiltrating inflammatory cells displayed a strong IL-6 expression in MCT-exposed rats (fig. 5b).

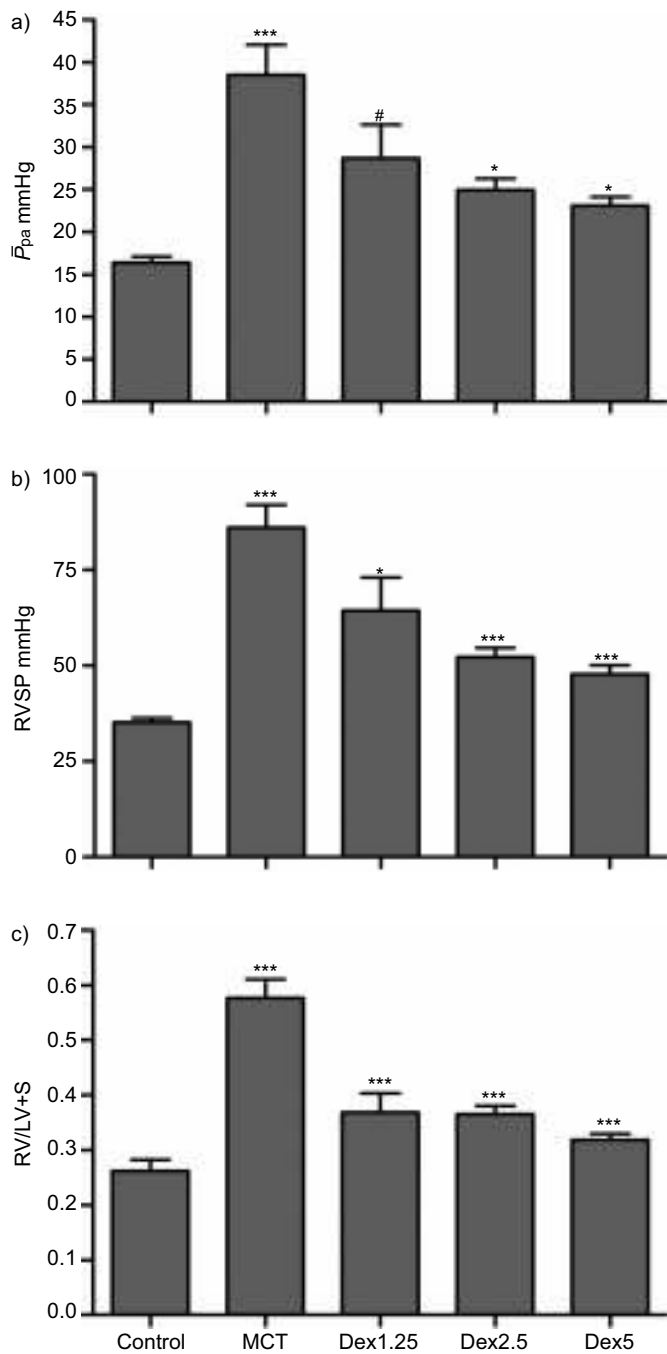


FIGURE 2. Dexamethasone reversed haemodynamics and right ventricular hypertrophy in established monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension at day 28. 28 days after MCT administration, a) mean pulmonary arterial pressure (\bar{P}_{pa}), b) right ventricular systolic pressure (RVSP) and c) right ventricular weight to left ventricular plus septal weight ratio (RV/LV+S) were significantly increased in MCT-exposed rats. Dexamethasone given at three doses ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (Dex5), $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (Dex2.5) and $1.25 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ (Dex1.25)) from day 14 to 28 after MCT administration normalised the \bar{P}_{pa} , RVSP and RV/LV+S. At the highest dose, rats treated with dexamethasone on days 14–28 were no different to control rats (not significant). Data are presented as mean \pm SEM. #: $p=0.066$ compared with control; *: $p<0.05$ compared with control; ***: $p<0.001$ compared with control.

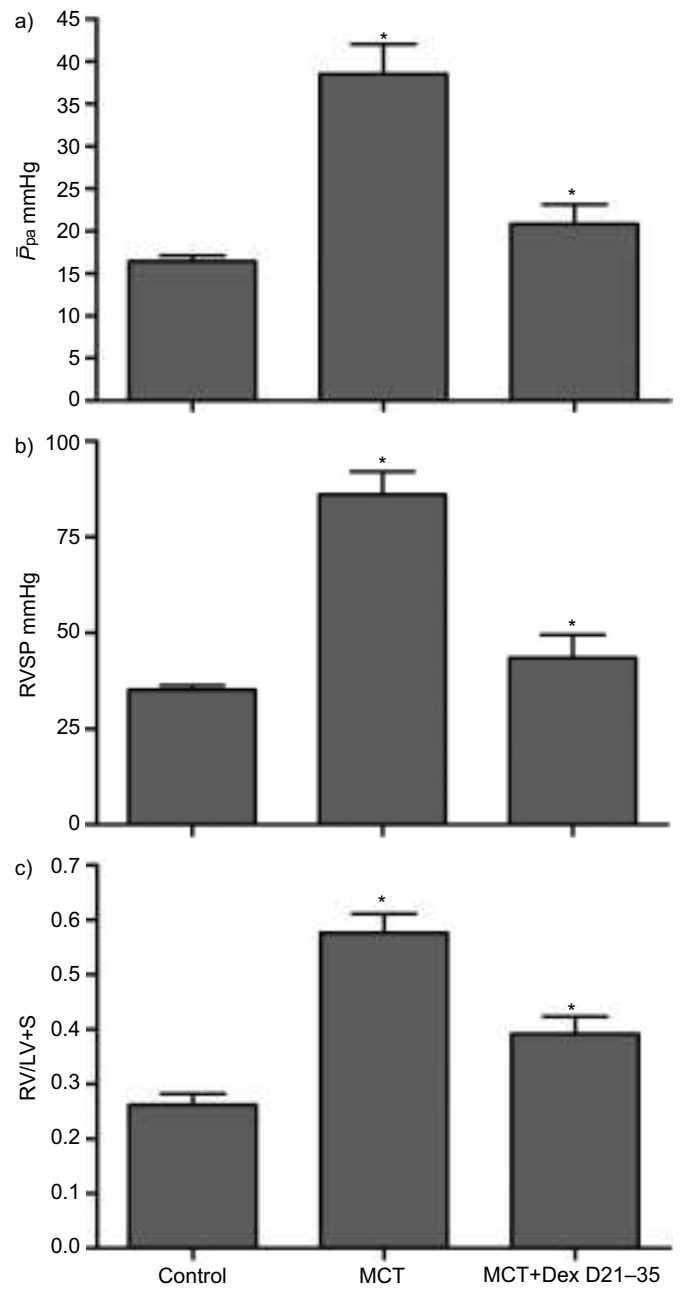


FIGURE 3. Dexamethasone at $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ normalised a) mean pulmonary arterial pressure (\bar{P}_{pa}), b) right ventricular systolic pressure (RVSP) and c) right ventricular weight to left ventricular plus septal weight ratio (RV/LV+S) in established monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension at day 35. Data are presented as mean \pm SEM. MCT+Dex D21–35: MCT plus $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$ dexamethasone from day 21 to 35. *: $p<0.05$ compared with MCT alone.

Lungs from the MCT+Dex D1–28 group exhibited the same faint IL-6 staining as seen in control lungs (fig. 5c).

Dexamethasone inhibits MCT-induced pulmonary IL-6 overexpression

28 days after MCT administration, pulmonary *IL6* mRNA expression measured by quantitative RT-PCR was strongly increased ($p<0.01$). MCT+Dex D1–28 normalised whole-lung *IL6* mRNA expression ($p<0.05$ versus MCT-exposed lungs; no

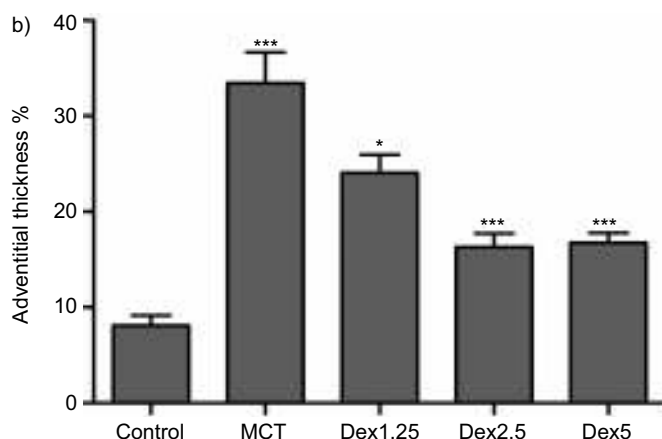
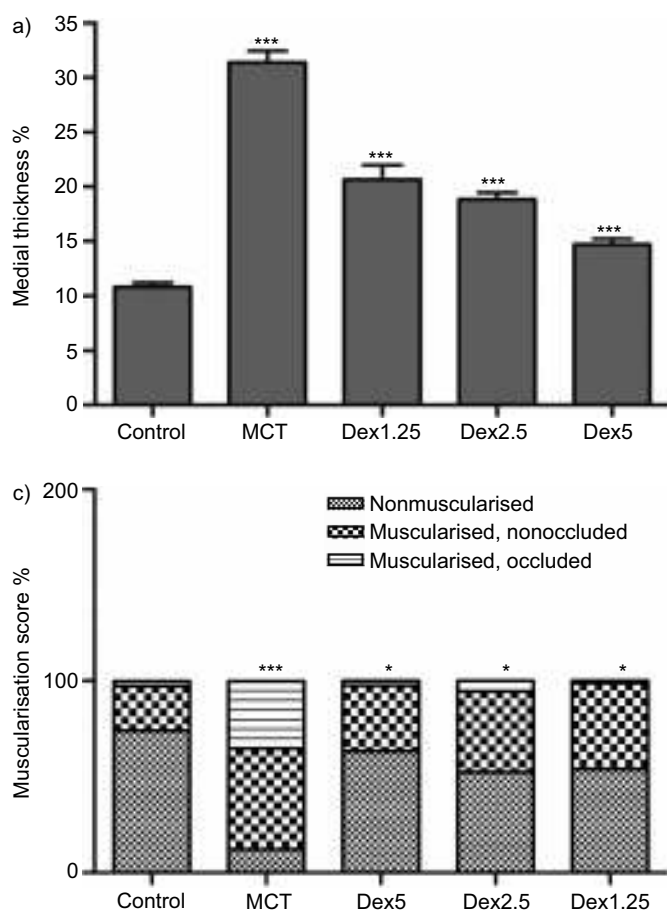


FIGURE 4. Dexamethasone treatment reverses pulmonary vascular remodelling. Effect of dexamethasone treatment (day 14–28) on the degree of muscularisation of peripheral pulmonary arteries: a total of 30 intra-acinar vessels were analysed in each of three lung sections from each rat exposed to monocrotaline (MCT) for 28 days and dexamethasone-treated groups (days 14–28). a) Increased medial thickness in pre-acinar pulmonary arteries at day 28 following MCT compared with controls (31.4 ± 10.1 versus $10.8 \pm 4.93\%$), which was reduced with all doses of dexamethasone at day 28 ($20.7 \pm 9.47\%$, $18.8 \pm 7.7\%$ and $14.7 \pm 7.46\%$ for $1.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ (Dex1.25), $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot 48 \text{ h}^{-1}$ (Dex2.5) and $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{day}^{-1}$ (Dex5), respectively, versus $31.4 \pm 10.1\%$). b) Increased pulmonary arterial adventitial thickness with MCT (36.5 ± 34.3 versus $8.83 \pm 4.95\%$), which was also reduced following dexamethasone between days 14 and 28 in a dose-dependent manner ($24.0 \pm 12.6\%$, $16.3 \pm 10.4\%$ and $9.47 \pm 5.39\%$ for Dex1.25, Dex2.5 and Dex5, respectively, versus $36.5 \pm 34.3\%$). c) Arteriole muscularisation and occlusion scores were increased at day 28 following MCT and were reduced with D14–28 dexamethasone treatment at all doses. *: $p < 0.05$ compared with control; ***: $p < 0.001$ compared with control.

significant difference seen with control lungs). Furthermore, *IL6* was reduced by late (MCT+Dex D14–28) dexamethasone treatment, ($p < 0.05$ versus MCT-exposed lungs at day28) (fig. 6).

Dexamethasone increases pulmonary BMPR2 downregulation in MCT-induced PAH

28 days after MCT administration, pulmonary *BMPR2* mRNA expression was strongly downregulated ($p < 0.01$). MCT+Dex D1–28 (fig. 7a) and D14–28 (fig. 7b) increased whole-lung *BMPR2* expression ($p < 0.01$ and $p < 0.05$ for MCT+Dex D1–28 and D14–28, respectively, versus MCT-exposed lungs; not significantly different to control lungs).

Dexamethasone inhibits proliferation of cultured rat PASC

Proliferation of PASC isolated from pulmonary hypertensive rats (at day 21 following MCT), as assessed by ^3H -thymidine uptake, was inhibited following dexamethasone treatment in a dose-dependent manner, compared with controls in complete medium without dexamethasone (38% reduction at 10^{-8} M dexamethasone and 88% reduction at 10^{-7} M dexamethasone; $p < 0.05$ for both doses compared to controls). Similar results were obtained using manual cell counting techniques (data not shown). At 10^{-8} M dexamethasone, cells isolated from control rats were growth-inhibited to a greater extent by dexamethasone compared with PASCs from MCT-exposed rats ($p < 0.05$) (fig. 8).

Dexamethasone increases BMPR2 and reduces IL-6 expression in rat PASCs

Treatment of rat PASCs with 10^{-8} M dexamethasone led to an increase in cellular *BMPR2*, as measured by quantitative RT-PCR in control cells ($p < 0.05$ compared with untreated cells), whereas there was no significant difference in *BMPR2* following dexamethasone treatment in cells isolated from pulmonary hypertensive rats (fig. 9a). *IL6* mRNA was reduced following dexamethasone treatment ($p < 0.05$ for both control and MCT-exposed cells; fig. 9b).

DISCUSSION

The major findings of this study were as follows. 1) Dexamethasone improved survival in rats with established MCT-induced PAH, with normalisation of haemodynamics, right ventricular hypertrophy and pulmonary vascular remodelling at late time points after MCT. 2) Consistent with previous findings, MCT downregulated *BMPR2* expression and increased *IL-6* activity: we showed that haemodynamic improvements with dexamethasone treatment were associated with a normalization of *BMPR2*. 3) Reduced pulmonary *IL6* overexpression and a reduction in the adventitial infiltration of *IL-6*-expressing inflammatory cells. 4) Dexamethasone inhibited rat PASC proliferation, which was associated with a reduction in *IL6* expression and an increase of *BMPR2* in control PASCs. 5) PASCs isolated from pulmonary hypertensive rats appeared relatively resistant to the *BMPR2* mRNA increase and the anti-proliferative effects of dexamethasone.

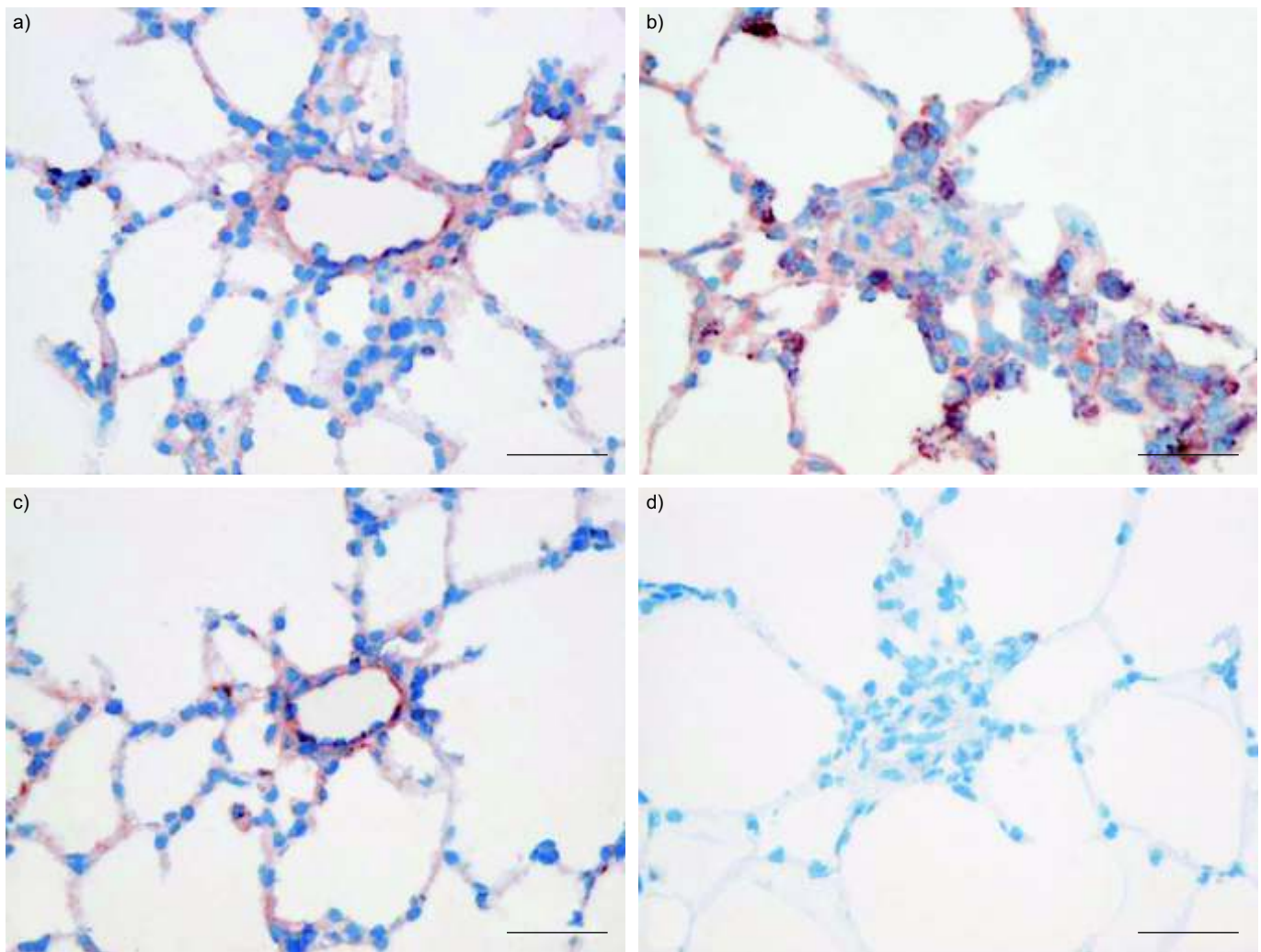


FIGURE 5. Effects of dexamethasone on infiltration of interleukin (IL)-6-expressing inflammatory cells. Immunohistochemical staining for IL-6 (in red) of frozen rat lung tissue sections, counterstained with haematoxylin (nuclei in blue). a) Control lung showing pulmonary arteriole with single layer arteriolar wall and weak staining of IL-6. b) Extensive vascular narrowing of small muscular pulmonary arteries and adventitial infiltrating inflammatory cells displaying a strong IL-6 expression in monocrotaline (MCT) exposed rats. c) Lungs from dexamethasone-treated rats (days 1–28) showing a normal medial wall thickness of small pulmonary arteries and exhibiting a similar weak IL-6 staining as seen in control rats. d) Negative control (omission of primary antibody). Scale bars=50 μm .

Monocrotaline is an “inflammatory” model of PAH, comprising an initial asymptomatic inflammatory phase, followed by a less inflammatory symptomatic phase from day 14, with increased medial volume in both major and intra-acinar pulmonary arteries by 21 days exposure [38, 39]. Previous studies have similarly shown that preventive immunosuppressive therapy is effective in MCT-induced PAH when given before the onset of pulmonary vascular remodelling (*i.e.* prior to day 14) [9, 17, 18, 40–43]. However, although there have been some studies showing reversal of PAH at later time-points with various anti-inflammatory therapies, none has yet used glucocorticoids. The reversal of MCT-induced PAH beyond the onset of vascular remodelling is of clinical relevance. Although patients with IPAH are not believed to have steroid-responsive disease, clinical improvement of PAH is seen in associated inflammatory conditions where immunosuppression (including glucocorticoids) was otherwise indicated, including PAH associated with connective tissue

diseases [44] and SLE [45]. Interestingly, this improvement in PAH occurs particularly in those with earlier, less severe PAH [16], perhaps suggesting that immunosuppressive therapies may be more effective in proliferating, active lesions in early disease than in those with established, fixed pulmonary vascular lesions.

Among the wide spectrum of biological actions of glucocorticoids, dexamethasone has been shown to inhibit vascular cell proliferation [46]. The antiproliferative findings in this study are consistent with a study of prednisolone on platelet-derived growth factor-stimulated PASMCs from PAH patients [47], although that study used much higher doses (equating to 3×10^{-5} and 3×10^{-4} M dexamethasone).

Mutations in *BMPR2* have been shown to be important in familial IPAH [22]. BMPs are members of the transforming growth factor (TGF)- β superfamily, which, through type 1 and 2 receptors, contribute to regulation of cell proliferation,

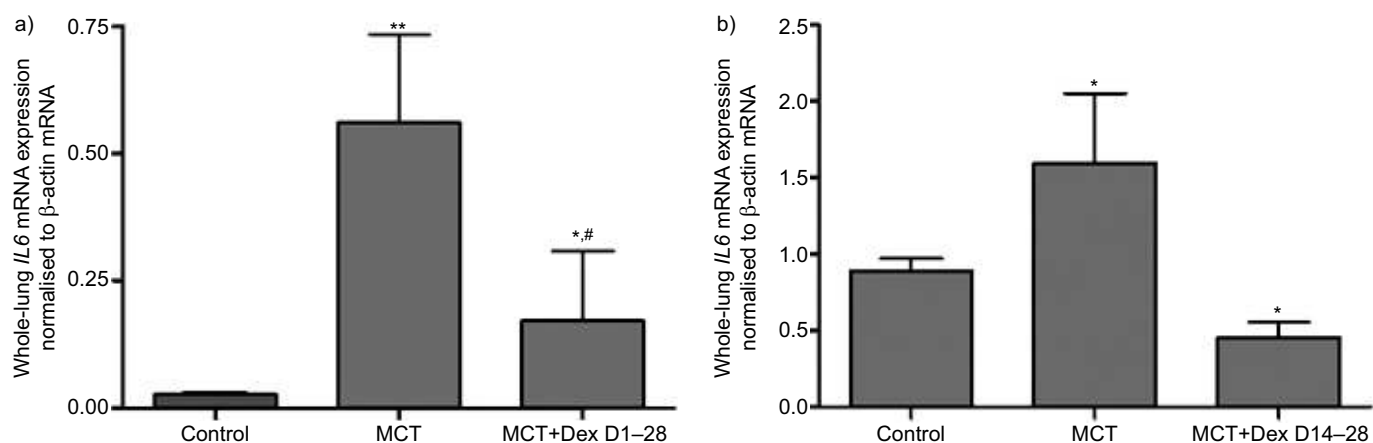


FIGURE 6. Impact of dexamethasone on pulmonary *IL6* mRNA expression in monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension. 28 days after MCT administration, *IL6* mRNA expression was upregulated in lungs of MCT exposed rats. 5 mg·kg⁻¹·day⁻¹ dexamethasone for days a) 1–28 (MCT+Dex D1–28) and b) 14–28 (MCT+Dex D14–28) normalised whole-lung *IL6* mRNA expression. *IL6* mRNA was normalised to the housekeeping gene β-actin. #: not significant compared with control; *: p<0.05; **: p<0.01.

differentiation and apoptosis. In humans, a variety of cell types, including PASMCs and endothelial [48] cells, synthesise and secrete BMPs. BMPR-II-positive cells have also been shown to be closely associated with the inflammatory cell infiltrate in IPAH lesions [49]. One of the normal roles of the BMP signalling pathway is believed to be the prevention of runaway positive feedback loops in inflammatory cytokines. Reduced expression of BMPR-II has been reported in most types of human PAH and an attractive theory is that the dysregulated BMPR-II signalling is followed by an inflammatory second hit early in the pathogenesis of PAH. Our data are consistent with previous studies [27, 28] showing a reduction in BMPR-II in MCT-induced PAH in rats and, as far as we are aware, this is the first study to show a glucocorticoid-induced increase in the low *BMPR2* levels in MCT-induced PAH. The importance of IL-6 has been shown in several studies of PAH. Patients with PAH have increased circulating IL-6 levels [8] and IL-6 is capable, on its own, of causing growth of vascular

smooth muscle cells [50] and PAH [51]. In transgenic mice, IL-6 overexpression induces PAH associated with downregulation of TGF-β signalling [52]. Consistent with previous studies [9, 51], we found that MCT-induced PAH is also associated with increased IL-6 production. Kaposi's sarcoma-associated herpes virus, which may cause PAH in HIV-negative Castleman's disease, encodes a viral, constitutively active form of IL-6 [53]. In addition, recent studies have suggested the involvement of viral infection or autoimmunity [12] in the development of PAH. Thus, there is substantial evidence that the unknown second hit is likely to be inflammatory in character. HAGEN *et al.* [34] have identified a negative feedback loop between IL-6 and the BMP pathway, in which increased IL-6 induces BMP pathway activity and increased BMP pathway activity suppresses IL-6. Furthermore, IL-6 enhances proliferation *via* activation of signal transducer and activator of transcription 3 [54], persistent activation of which has been shown to reduce BMPR-II expression, which may contribute to

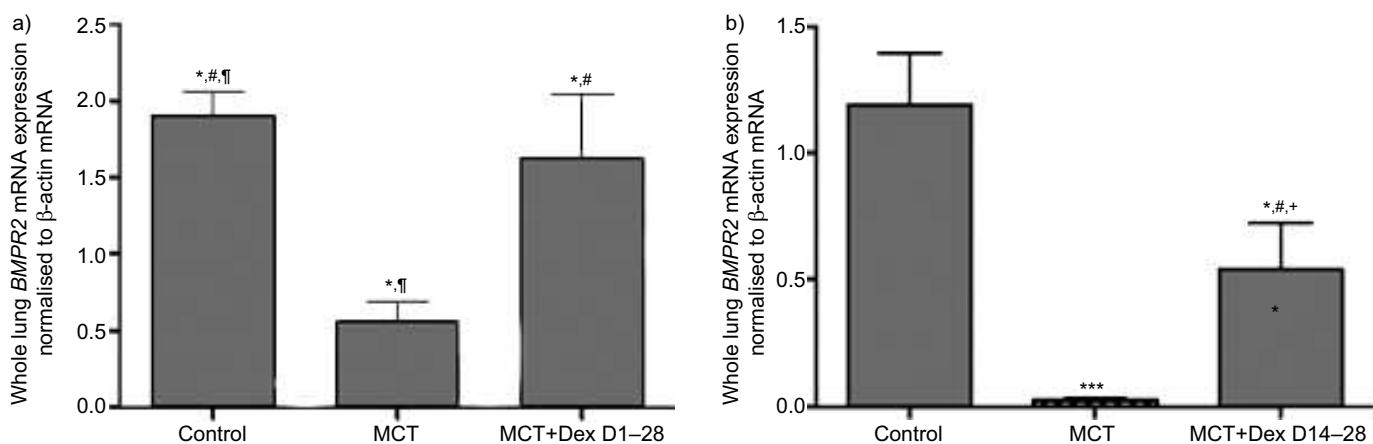


FIGURE 7. Impact of dexamethasone on pulmonary *BMPR2* mRNA expression in monocrotaline (MCT)-induced pulmonary arterial hypertension. 28 days after MCT administration, *BMPR2* mRNA expression was strongly downregulated in lungs of MCT-exposed rats. a) Dexamethasone increased whole lung *BMPR2* mRNA expression in rats treated with dexamethasone between days 1 and 28 (MCT+Dex D1–28) compared with MCT exposed rats and b) following day 14–28 dexamethasone treatment (MCT+Dex D14–28). #: not significant between groups; †: p<0.0001; +: not significant compared with control; *: p<0.05; ***: p<0.001.

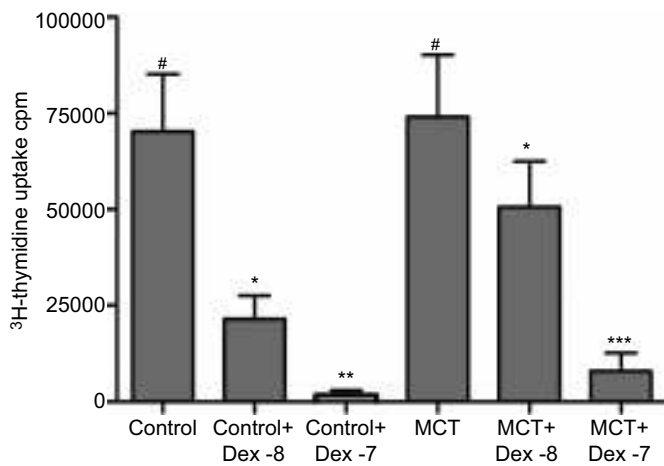


FIGURE 8. Dexamethasone reduces proliferation of cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). Proliferation of PASMCs was assessed by ^3H -thymidine uptake and confirmed using manual counting (data not shown). Proliferation of PASMCs was inhibited following dexamethasone treatment in a dose-dependent manner compared to untreated controls, for both PASMC exposed to monocrotaline (MCT) and non-MCT-exposed cells (control). The concentrations of dexamethasone used were 10^{-7} (Dex -7) and 10^{-8} M (Dex -8). PASMCs isolated from Control+Dex -8 were growth-inhibited to a greater extent than MCT+Dex -8. #: not significant between groups; *: $p < 0.05$ between groups; ***: $p < 0.001$ compared to control.

the loss of BMPR-II during PAH development [55]. Further work showing that, although asymptomatic *BMPR2*^{+/-} mice do not develop pulmonary hypertension spontaneously, under inflammatory stress, they are more susceptible than wild-type mice [32] and mice expressing a dominant-negative *BMPR2* allele in smooth muscle develop elevated right ventricular pressures, with an increase in cytokines and markers of immune response, when the transgene is activated [33]. BMPR-II dysfunction and resulting loss of activity may, therefore, result in unopposed IL-6 production in the context of an as yet unknown inflammatory stimulus.

Our data suggest that dexamethasone interrupts the IL-6–BMPR-II negative feedback loop [34], probably mainly through a dexamethasone-induced reduction in IL-6-expressing inflammatory cells and, possibly, also a direct PASMC effect. The resulting increase in pulmonary *BMPR2* mRNA may thus restore the required dampening effects of BMPR-II signalling on IL-6 function. The mechanisms through which glucocorticoids interact with BMPR-II are unclear, but a gene expression profiling study of asthmatics receiving glucocorticoids suggests an important interaction between the sensitivity of the glucocorticoid receptor and BMPR-II [56].

Limitations of our study include the absence of BMPR-II protein expression analysis to confirm the findings in gene transcription assays, the lack of immunohistochemistry for BMPR-II and the lack of IL-6 immunohistochemistry at later treatment time-points, although we replaced this with quantitative data using RT-PCR for *IL6* and *BMPR2* at these time-points.

In conclusion, we have shown that treatment with dexamethasone improves haemodynamics, reduces remodelling and

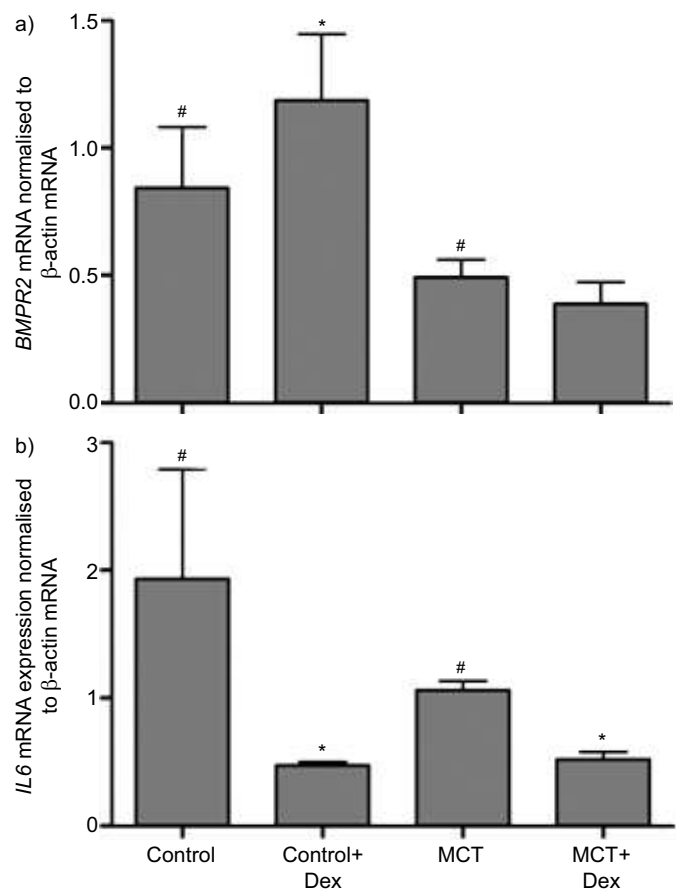


FIGURE 9. Dexamethasone a) increases *BMPR2* and b) reduces *IL6* expression in cultured rat pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs). PASMCs were isolated from control and pulmonary hypertensive rats (day 21 following monocrotaline (MCT)), treated with 10^{-8} M dexamethasone (Dex) and RT-PCR was performed for cellular *BMPR2* and *IL6* mRNA. Dexamethasone treatment increased *BMPR2* in control+Dex but not MCT+Dex, compared with MCT alone. *IL6* was reduced in PASMC from both control+Dex and MCT+Dex compared with controls. #: not significant between groups; *: $p < 0.05$ compared with controls.

improves survival in established MCT-induced PAH, with normalisation of *BMPR2* expression and inflammatory responses. These findings provide new insight into the potential role of immunosuppressants in the treatment of human PAH *via* the regulation of the BMPR-II and IL-6 pathways.

SUPPORT STATEMENT

The study was supported by Chancellerie des Hôpitaux de Paris (Legs Poix), Université Paris-Sud 11 and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. A European Respiratory Society long-term research fellowship was awarded to L.C. Price (no. 139).

STATEMENT OF INTEREST

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

REFERENCES

- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 2004; 351: 1425–1436.

- 2 Pietra GG, Capron F, Stewart S, *et al.* Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 2004; 43: Suppl. S, 25S–32S.
- 3 Dorfmuller P, Perros F, Balabanian K, *et al.* Inflammation in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J* 2003; 22: 358–363.
- 4 Dorfmuller P, Humbert M, Perros F, *et al.* Fibrous remodeling of the pulmonary venous system in pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases. *Hum Pathol* 2007; 38: 893–902.
- 5 Dorfmuller P, Zarka V, Durand-Gasselin I, *et al.* Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 534–539.
- 6 Sanchez O, Marcos E, Perros F, *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.
- 7 Balabanian K, Foussat A, Dorfmuller P, *et al.* CX₃C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1419–1425.
- 8 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.
- 9 Bhargava A, Kumar A, Yuan N, *et al.* Monocrotaline induces interleukin-6 mRNA expression in rat lungs. *Heart Dis* 1999; 1: 126–132.
- 10 Gillespie MN, Goldblum SE, Cohen DA, *et al.* Interleukin 1 bioactivity in the lungs of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Proc Soc Exp Biol Med* 1988; 187: 26–32.
- 11 Mouthon L, Guillevin L, Humbert M. Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease? *Eur Respir J* 2005; 26: 986–988.
- 12 Nicolls MR, Taraseviciene-Stewart L, Rai PR, *et al.* Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective. *Eur Respir J* 2005; 26: 1110–1118.
- 13 Jouve P, Humbert M, Chauveheid MP, *et al.* POEMS syndrome-related pulmonary hypertension is steroid-responsive. *Respir Med* 2007; 101: 353–355.
- 14 Montani D, Achouh L, Marcelin AG, *et al.* Reversibility of pulmonary arterial hypertension in HIV/HIV8-associated Castleman's disease. *Eur Respir J* 2005; 26: 969–972.
- 15 Sanchez O, Sitbon O, Jais X, *et al.* Immunosuppressive therapy in connective tissue diseases-associated pulmonary arterial hypertension. *Chest* 2006; 130: 182–189.
- 16 Jais X, Launay D, Yaici A, *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.
- 17 Nishimura T, Faul JL, Berry GJ, *et al.* 40-O-(2-hydroxyethyl)-rapamycin attenuates pulmonary arterial hypertension and neointimal formation in rats. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 163: 498–502.
- 18 Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, *et al.* The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 11418–11423.
- 19 Langleben D, Reid LM. Effect of methylprednisolone on monocrotaline-induced pulmonary vascular disease and right ventricular hypertrophy. *Lab Invest* 1985; 52: 298–303.
- 20 Tanabe T, Furuya H, Kanemoto N, *et al.* Experimental study on monocrotaline induced pulmonary hypertensive rats. (1) Effect of long-term injection of immunosuppressant. *Tokai J Exp Clin Med* 1981; 6: 41–48.
- 21 Hilliker KS, Roth RA. Alteration of monocrotaline pyrrole-induced cardiopulmonary effects in rats by hydrallazine, dexamethasone or sulphinpyrazone. *Br J Pharmacol* 1984; 82: 375–380.
- 22 Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, *et al.* Heterozygous germline mutations in BMPR2, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 2000; 26: 81–84.
- 23 Thomson JR, Machado RD, Pauculo MW, *et al.* Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF- β family. *J Med Genet* 2000; 37: 741–745.
- 24 Du L, Sullivan CC, Chu D, *et al.* Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 2003; 348: 500–509.
- 25 Atkinson C, Stewart S, Upton PD, *et al.* Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation* 2002; 105: 1672–1678.
- 26 Southwood M, Jeffery TK, Yang X, *et al.* Regulation of bone morphogenetic protein signalling in human pulmonary vascular development. *J Pathol* 2008; 214: 85–95.
- 27 Morty RE, Nejman B, Kwapiszewska G, *et al.* Dysregulated bone morphogenetic protein signaling in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1072–1078.
- 28 Long L, Crosby A, Yang X, *et al.* Altered bone morphogenetic protein and transforming growth factor-beta signaling in rat models of pulmonary hypertension: potential for activin receptor-like kinase-5 inhibition in prevention and progression of disease. *Circulation* 2009; 119: 566–576.
- 29 Nishihara A, Watabe T, Imamura T, *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.
- 30 Rudarakanchana N, Flanagan JA, Chen H, *et al.* Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1517–1525.
- 31 Yang X, Long L, Southwood M, *et al.* Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2005; 96: 1053–1063.
- 32 Song Y, Jones JE, Beppu H, *et al.* Increased susceptibility to pulmonary hypertension in heterozygous BMPR2-mutant mice. *Circulation* 2005; 112: 553–562.
- 33 Tada Y, Majka S, Carr M, *et al.* Molecular effects of loss of BMPR2 signaling in smooth muscle in a transgenic mouse model of PAH. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L1556–L1563.
- 34 Hagen M, Fagan K, Steudel W, *et al.* Interaction of interleukin-6 and the BMP pathway in pulmonary smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 292: L1473–L1479.
- 35 Stinger RB, Iacopino VJ, Alter I, *et al.* Catheterization of the pulmonary artery in the closed-chest rat. *J Appl Physiol* 1981; 51: 1047–1050.
- 36 Eddahibi S, Fabre V, Boni C, *et al.* Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin. *Circ Res* 1999; 84: 329–336.
- 37 Eddahibi S, Humbert M, Fadel E, *et al.* Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 2001; 108: 1141–1150.
- 38 Meyrick B, Gamble W, Reid L. Development of Crotalaria pulmonary hypertension: hemodynamic and structural study. *Am J Physiol* 1980; 239: H692–H702.
- 39 Wilson DW, Segall HJ, Pan LC, *et al.* Progressive inflammatory and structural changes in the pulmonary vasculature of monocrotaline-treated rats. *Microvasc Res* 1989; 38: 57–80.
- 40 Suzuki C, Takahashi M, Morimoto H, *et al.* Mycophenolate mofetil attenuates pulmonary arterial hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 349: 781–788.
- 41 Lu J, Shimpo H, Shimamoto A, *et al.* Specific inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase with FR167653 attenuates vascular proliferation in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2004; 128: 850–859.

- 42 Voelkel NF, Tuder RM, Bridges J, *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist treatment reduces pulmonary hypertension generated in rats by monocrotaline. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11: 664–675.
- 43 Kimura H, Kasahara Y, Kurosu K, *et al.* Alleviation of monocrotaline-induced pulmonary hypertension by antibodies to monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1. *Lab Invest* 1998; 78: 571–581.
- 44 Sanchez O, Humbert M, Sitbon O, *et al.* Treatment of pulmonary hypertension secondary to connective tissue diseases. *Thorax* 1999; 54: 273–277.
- 45 Karmochkine M, Wechsler B, Godeau P, *et al.* Improvement of severe pulmonary hypertension in a patient with SLE. *Ann Rheum Dis* 1996; 55: 561–592.
- 46 Reil TD, Sarkar R, Kashyap VS, *et al.* Dexamethasone suppresses vascular smooth muscle cell proliferation. *J Surg Res* 1999; 85: 109–114.
- 47 Ogawa A, Nakamura K, Matsubara H, *et al.* Prednisolone inhibits proliferation of cultured pulmonary artery smooth muscle cells of patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2005; 112: 1806–1812.
- 48 Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, *et al.* The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* 2002; 277: 5330–5338.
- 49 Hall S, Brogan P, Haworth SG, *et al.* Contribution of inflammation to the pathology of idiopathic pulmonary arterial hypertension in children. *Thorax* 2009; 64: 778–783.
- 50 Ikeda U, Ikeda M, Oohara T, *et al.* Interleukin 6 stimulates growth of vascular smooth muscle cells in a PDGF-dependent manner. *Am J Physiol* 1991; 260: H1713–H1717.
- 51 Miyata M, Sakuma F, Yoshimura A, *et al.* Pulmonary hypertension in rats. 2. Role of interleukin-6. *Int Arch Allergy Immunol* 1995; 108: 287–291.
- 52 Steiner MK, Syrkina OL, Kolliputi N, *et al.* Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res* 2009; 104: 236–244.
- 53 Parravicini C, Corbellino M, Paulli M, *et al.* Expression of a virus-derived cytokine, KSHV vIL-6, in HIV-seronegative Castleman's disease. *Am J Pathol* 1997; 151: 1517–1522.
- 54 Mathew R, Huang J, Shah M, *et al.* Disruption of endothelial-cell caveolin-1 α /raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 2004; 110: 1499–1506.
- 55 Brock M, Trenkmann M, Gay RE, *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.
- 56 Donn R, Berry A, Stevens A, *et al.* Use of gene expression profiling to identify a novel glucocorticoid sensitivity determining gene, BMPRII. *FASEB J* 2007; 21: 402–414.

Article 6

Inhibition of ABCC₄ (MRP₄) prevents and reverses pulmonary hypertension in mice

Hara Y, Sassi Y, Guibert C, Gambaryan N, Dorfmueller P, Eddahibi S, Lompré AM, Humbert M and Hulot JS.

Journal of Clinical Investigation. 2011. Accepté pour la publication.

Inhibition of ABCC4 (MRP4) prevents and reverses pulmonary hypertension in mice

Yannis Hara (1,2), Yassine Sassi (1,2)[§], Christelle Guibert (3)[§], Natacha Gambaryan (4,5), Peter Dorfmüller (4), Saadia Eddahibi (4), Anne-Marie Lompré (1,2), Marc Humbert (4,5)[§], Jean-Sébastien Hulot (1,2,6)[§]

(1) Paris 6 Pierre et Marie Curie University, Paris, France – (2) INSERM UMR 956, Paris-France – (3) INSERM U885, Laboratoire de Physiologie Cellulaire Respiratoire, Bordeaux, France – (4) Univ Paris-Sud; INSERM U999, Centre Chirurgical Marie-Lannelongue, Le Plessis-Robinson, France– (5) AP-HP, Service de Pneumologie et Réanimation Respiratoire, Centre National de Référence de l’Hypertension Pulmonaire Sévère, Hôpital Antoine Béclère, Clamart, France – (6) AP-HP, Pharmacology Department, Pitié-Salpêtrière University Hospital, Paris, France

[§]. These authors equally participated to the study

Conflict of interest: The authors have declared that no conflict of interest exists

Correspondence : Dr Jean-Sébastien Hulot

Service de Pharmacologie, Université Pierre et Marie Curie Paris 6

INSERM UMR956

Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière

91 Bvd de l’hôpital, 75013 Paris, France

Phone: +33.1.40.77.95.84

Fax: +33.1.40.77.96.45

E-mail: jean-sebastien.hulot@psl.aphp.fr

MRP4 (Multidrug Resistance Associated Protein 4) has recently been shown to regulate intracellular levels of cAMP and cGMP in arterial smooth muscle cells. In this report we have studied the role of MRP4 in the development and progression of pulmonary arterial hypertension (PAH), a severe vascular disease characterized by chronically elevated pulmonary artery pressure. PAH is accompanied by remodeling of the small pulmonary arteries as a prelude to right heart failure and premature death.

We show that MRP4 expression is increased in pulmonary arteries from idiopathic PAH patients as well as from wild-type mice exposed to hypoxic conditions. We also show that MRP4 knock-out mice are protected from hypoxic pulmonary hypertension (PH). Based upon these observations, we conducted experiments in which wild-type mice exposed to hypoxia for three weeks were treated with MK571 an MRP4 inhibitor. We show reversal of hypoxic PH development following oral administration of MK571. Finally, we demonstrate through a series of in vitro studies that inhibition of MRP4 is accompanied by an increase in intracellular cAMP and cGMP levels and PKA and PKG activities, suggesting the involvement of cyclic nucleotides-related signalling pathways.

In conclusion, MRP4 is overexpressed in human PAH and experimental PH. Inhibition of MRP4 can not only block but also reverse hypoxic PH development in vivo. Our results suggest modulation of MRP4 as a potential new target for therapeutic intervention in human PAH.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a severe vascular disease characterized by persistent precapillary pulmonary hypertension (PH), leading to progressive right heart failure and premature death (1, 2). PAH may be idiopathic, heritable, or associated with other diseases such as systemic sclerosis (3). The pathological mechanisms underlying this condition remain unclear. Pulmonary-artery endothelial cell dysfunction and structural remodelling of the pulmonary vessels are early features of PAH. Pulmonary vascular remodelling includes proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) leading to medial hypertrophy and increased pulmonary vascular resistance (3). Hypoxia-induced PH in mice is associated with PASMC proliferation, precapillary PH and right heart hypertrophy (4).

Abnormalities in the homeostasis of cyclic nucleotides (namely cAMP and cGMP) are reflected in changes in vascular tone and PASMC proliferation. PASMC from PH patients show decreased cGMP intracellular levels as well as reduced endothelial nitric oxide production, an increase in phosphodiesterase 5 expression and activity, PASMC vasoconstriction and proliferation (5, 6). In recent years, phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors (sildenafil and tadalafil) have been approved for the treatment of PAH (7-12). The levels of cAMP have also been shown to be reduced in PASMC from PH patient, in line with an increased expression of PDE type 1 and 3 (13, 14), also promoting PASMC proliferation. Prostacyclin analogues (epoprostenol, iloprost and treprostinil) that increase PASMC cAMP levels have also been approved for the treatment of PAH (10, 11, 15).

In addition to hydrolysis by PDEs, cAMP and cGMP levels are also affected by a process involving active efflux out of cells. The multidrug-resistance-associated proteins MRP4, a

member of a large family of transmembrane proteins (ATP-binding cassette transporter family class C), have been shown to function as energy-dependent transporters for cyclic nucleotides (16, 17). MRP4 has recently been characterized as an endogenous regulator of intracellular cyclic nucleotides levels and cyclic nucleotides-mediated signalling pathways in coronary artery SMC (18, 19).

The specific role of MRP4 in the progression of pulmonary artery vascular remodelling remains unclear. In this report we describe the effects of MRP4 inhibition in experimental hypoxia-induced PH and also its expression in biopsy samples from PAH patients.

RESULTS

MRP4 over-expression during PAH

We initially compared the expression profiles of MRP4 in lung samples from normal human subjects and from patients with clinical pulmonary hypertension. Immunohistochemistry analysis on human pulmonary arteries in sections from PAH patients revealed MRP4 expression in the media of arteries, endothelial cells and pneumocytes (Figure 1A). In contrast, MRP4 expression was barely detectable in samples from control patients. Western-blot analysis was performed on total lung extracts from PAH patients and normal subjects. In Figure 1B we show a 2.5 fold increase in MRP4 expression in the lungs of PAH individuals. Then we explored MRP4 expression profile in a model of hypoxia-induced PH in mice. We observed a 2.1 fold increase in MRP4 expression in lungs from wild-type (WT) mice exposed to hypoxia compared to normoxia (Figure 2A). In the lung, MRP4 was constitutively expressed in pulmonary arteries (assessed by α -smooth muscle actin staining) and its expression was increased in hypoxic conditions (Figure 2B).

Prevention of hypoxia-induced PH in MRP4 knockout mice

To further study the role of MRP4 on the development of hypoxia-induced PH, we exposed MRP4 knockout mice (MRP4^{-/-}) and WT mice to hypoxia for 4 weeks. Maintenance under normoxia was used as internal control. At baseline, as expected, MRP4 expression in the lung was completely abolished in MRP4^{-/-} mice (Supplemental Figure 1). In WT mice, hypoxia resulted in a marked increase in right ventricle systolic pressure (RVSP) (Figure 3A, left), right ventricle hypertrophy (assessed by the Fulton index) (Figure 3A, right), and distal

pulmonary artery remodelling (Figure 3, B and C). In contrast, we were not able to detect significant changes in these parameters in MRP4^{-/-} mice (Figure 3, A-C). Similar results were obtained when assessing indices of vascular smooth muscle cell proliferation by using Ki67 immunostaining (Supplemental Figure 2, A and B). These results demonstrate that knocking-out MRP4 protects from hypoxia-induced PH development.

Reversal of hypoxia-induced PH by MRP4 inhibitor MK571.

We next wished to determine whether it is possible to reverse PH induced by hypoxia in WT mice. In these experiments, we used MK571, a pharmacological inhibitor of MRP4 (20). As shown on Figure 4A, PH was induced by maintaining WT mice under hypoxia for 3 weeks. Development of PH was monitored by RVSP (Figure 4B), Fulton index (Figure 4C) and distal pulmonary artery wall thickness (Figure 4, D-J). Hypoxia-exposed WT mice were treated with either saline or MK571 (5mg.kg⁻¹.d⁻¹ or 25mg.kg⁻¹.d⁻¹) for 2 other weeks while being maintained in hypoxic conditions. Saline-treated mice displayed all the hallmarks of PH (i.e. an increase in RVSP, Fulton index and an arterial wall thickness). However, following hypoxia, MK571 treated mice displayed lower RVSP (Figure 4B), Fulton index (Figure 4C), and a decrease in the medial thickening of small pulmonary arteries and arterioles (Figure 4, D-J). The right ventricle indices were similar to those observed in control animals maintained under normoxia (Figure 4C). MK571 had no effect on any physiological parameters (RVSP, mean arterial pressure) as measured in mice maintained in normoxia (data not shown). To our knowledge this is the first demonstration in which development of hypoxia-induced PH can be reversed by treatment with a compound targeting MRP4.

To gain a better understanding of the molecular pathway(s) involved in the beneficial effect of MRP4-reversal of PH, we assessed PKA and PKG activity. Specifically, we analyzed VASP phosphorylation on serine 157 and serine 239 respectively. In Figure 4K, we show increased PKA and PKG activities in lung lysates from hypertensive mice treated with MK571. Similar increases were not seen in animals receiving vehicle (saline) controls. These results suggested a possible role for PKA and/or PKG mediated-signalling pathways in the biological effects seen following administration of an MRP4 inhibitor.

Since MK571 has also been reported to inhibit MRP1 (another member of the ATP-binding cassette transporters superfamily) (21), we measured the effect of MRP1 silencing on the cyclic nucleotides levels. MRP1 silencing in vitro by MRP1 siRNA did not increase intracellular nucleotides levels and neither PKA nor PKG activities assessed by VASP phosphorylation (Supplemental Figure 3).

MRP4 function in pulmonary artery smooth muscle cells and endothelial cells

PASMC proliferation and migration are characteristics of PH (5). We next tested the biological consequences of MRP4 knock-down on proliferation and serum-induced migration on cultured human PASMCs. Compared to scrambled siRNA, MRP4 silencing led to a marked decrease in PDGF-induced proliferation (Figure 5A) and in serum-induced migration of hPASMC (Figure 5B). Interestingly, there was no difference in apoptosis between scrambled- or MRP4- siRNA transfected cells (Supplemental Figure 4). Western blot analysis of VASP phosphorylation further revealed a significant increase in PKA and PKG activities following MRP4 silencing (Figure 5C). We then confirmed that MRP4 silencing increased intracellular/extracellular ratios of both cAMP and cGMP in hPASMC in vitro (Figure 5, D and

E). MRP4 is also a physiological transporter of endogenous substrates such as prostaglandins (22) whose accumulation may influence cyclic nucleotides homeostasis. However, inhibition of prostaglandin synthesis did not affect the increase in cAMP intracellular levels following MRP4 silencing (data not shown), thus rather suggesting a direct blockade of cyclic nucleotides efflux. Interestingly, we further observed the changes in cyclic nucleotides levels following MRP4 silencing were further enhanced in presence of the PDE5 inhibitor sildenafil (Figure 5, D and E). In addition, treatment with sildenafil led to an increase of MRP4 protein sildenafil-treated WT mice ($25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$) or in PASMC isolated from PH patients (Supplemental Figure 5, A and B). These results further suggest that MRP4 overexpression could act in a manner to compensate for PDE5 inhibition. In contrast, PDE5 protein expression was unchanged in $\text{MRP4}^{-/-}$ mice or in MRP4-silenced hPASMC (Supplemental Figure 5, C and D). Similar results were observed for PDE3A and PDE4A isoforms (Supplemental Figure 5, E and F). Thus MRP4 silencing inhibits both PASMC proliferation and migration, in line with the regression of pulmonary artery medial hypertrophy observed in vivo. MRP4 modifies the cyclic nucleotides homeostasis in these cells and the combination of both PDE5 inhibitors and MRP4 inhibitors could be considered in order to provide higher increase in cyclic nucleotides levels and further promote their antiproliferative action (23). Of note the beneficial effect of sildenafil in PAH-patients can also be partly linked to MRP4 inhibition (20).

Because pulmonary artery endothelial cell (PAEC) dysfunction is also characteristic of PH, we further tested the biological consequences of MRP4 knock-down in cultured human PAECs by analyzing cell migration. Compared to scrambled siRNA, MRP4 silencing resulted in a significant decrease in PDGF-induced migration (Supplemental Figure 6, A and B). This later

result suggests that MRP4 silencing might also influence endothelial cells activation during PAH.

Pulmonary arteries contraction and relaxation in MRP4 knock-out mice

We then addressed the role of MRP4 in the relaxation and contraction of intrapulmonary arteries from wild type mice and MRP4^{-/-} mice subjected to chronic hypoxia or maintained under normoxia. The relaxation to carbamylcholine was not significantly different in WT and MRP4^{-/-} mice in normoxic or chronic hypoxic conditions (Figure 6A). However, the relaxation to carbamylcholine was strongly reduced in mice with hypoxia-induced PH suggesting an endothelial dysfunction as previously described (24). The contraction to PGF2 alpha (Figures 6A), phenylephrine (Phe) (Figures 6B) and high potassium solutions (KCl 80 mM) (Figure 6C) were similar in WT mice compared to MRP4^{-/-} mice. However, in WT mice as in MRP4^{-/-} mice, the contraction to PGF2 alpha, Phe and KCl 80 mM was significantly higher in hypoxic conditions compared to normoxic conditions (Figures 6, A-C).

MRP4 silencing prevents hypoxia-induced inflammatory response

As inflammation is known to be increased in PH, we finally studied the effect of MRP4 inhibition on the inflammatory response in hypoxia-induced PH. We analyzed in MRP4^{-/-} mice the macrophage and lymphocytes cells recruitment by measuring CD68 and CD45 expression respectively. In both cases, we found a significant reduction in the hypoxia-induced inflammatory response in MRP4^{-/-} mice as compared to WT mice (Figures 7, A and B). We then measured the proinflammatory cytokine IL-6 in total lung homogenates. Under

normoxic conditions, there was no difference in the IL-6 levels between WT and MRP4^{-/-} mice. The amount of IL-6 was however increased after hypoxia in WT mice but not in MRP4^{-/-} mice (Figure 7C). These results suggest that hypoxia induced PH protection by MRP4 knock out is associated with a decrease in the inflammatory response.

DISCUSSION

This study identifies MRP4 as a key regulator in PH. Such evidence firstly comes from in vivo experiments where mice deficient for MRP4 are resistant to hypoxia-induced PH. Furthermore, in an established model of PH induced in WT mice by hypoxia MK571, a MRP4 inhibitor, reversed PH. MRP4 deletion is particularly associated with a strong reduction in the vascular remodelling of small pulmonary arteries. We further demonstrate that MRP4 inhibition is associated with a significant reduction in PASMC proliferation and migration, a significant reduction in PAEC migration and in turn a significant reduction in hypoxia-induced inflammatory response. These results suggest that inhibiting MRP4 may be a useful strategy in human PAH, as MRP4 is over-expressed in human lungs from patients with PAH.

The pulmonary vascular alterations in PAH are characterized by the pathological proliferation and migration of small pulmonary arteries vessel wall constituents including smooth muscle cells and endothelial cells. Several mechanism has been involved in the pathogenesis of PAH, such as an imparaired responses to antiproliferative proapoptotic stimuli as bone morphogenetic protein (BMP) and TGF-beta (3, 25, 26), an abnormal activation of RhoA (27), and a hypersecretion of endothelin-1 (3), but the causal mechanism remains undetermined. Many studies have suggested a role for the dysregulation in cyclic

nucleotides homeostasis observed in PASMC. Pharmacotherapy that aims to increase intracellular levels of cyclic nucleotides has concordantly shown beneficial effects in PAH. Phosphodiesterase type 5 inhibitors and prostacyclin analogs have been approved for the treatment of PAH. Until now, the increase in cyclic nucleotides levels is obtained by either promoting their synthesis (such as prostacyclin and nitric oxide therapies) or inhibiting their degradation by phosphodiesterase inhibition (10). We identified a transmembrane protein called MRP4 as an endogenous regulator that has been previously shown to limit the amplitude of cyclic nucleotide signalling in vascular smooth muscle cells (19). Immunohistochemistry analysis on human pulmonary arteries in sections from PAH patients revealed MRP4 expression in the media of arteries. In contrast, MRP4 expression was barely detectable in samples from control patients. Our results suggest a preferential expression of MRP4 in proliferative SMC and EC in pathological condition. In mice submitted to hypoxia, MRP4 was also upregulated. As seen for PDE1C and PDE5 that are over-expressed in PAH conditions, MRP4 could contribute to the deficiency of cyclic nucleotides intracellular levels in idiopathic PAH. The mechanism involved in the overexpression of MRP4 remains to be determined, but its overexpression in hypoxia can be explained by the presence of an HIF element in its promoter (28).

MRP4 uses the energy of ATP hydrolysis to translocate various molecules such as cyclic nucleotides across cell membranes. Here we demonstrate that MRP4 is present in PASMC and that specific inhibition of MRP4 in PASMC modified the intracellular content of cyclic nucleotides and resulted in an activation of the downstream pathways namely PKA and PKG (29, 30), as shown by VASP phosphorylation. These effects were interestingly obtained without PDE inhibition. This indicates that MRP4 acts as a complementary mechanism, in addition to PDEs, to ensure intracellular cyclic nucleotide homeostasis. This was notably

supported by the additional effect of concomitant PDE5 and MRP4 inhibition on the increase of cyclic nucleotides intracellular levels. These results also suggest that the combination of both PDE5 inhibitors and MRP4 inhibitors could be considered in order to provide higher increase in cyclic nucleotides levels and further promote their antiproliferative action (23, 31-36). In addition, treatment with sildenafil led to an increase of MRP4 protein in PASMC isolated from PH patients further suggesting that MRP4 overexpression could act in a manner to compensate for PDE5 inhibition. In contrast, PDE5 protein expression was unchanged in MRP4^{-/-} mice or in MRP4-silenced hPASMC. Similar results were observed for PDE3A and PDE4A isoforms.

We also found that MRP4 inhibition result in a notable reduction in hypoxia-induced inflammatory response. Inflammatory response is moderately increased in hypoxia-induced PH but is markedly increased during PAH. Many studies have established the involvement of leukocytes, macrophages, and lymphocytes in complex vascular lesions of PAH (37-39). Cytokine and growth factors such as IL-6 and TGF- β 1, which lead to inflammatory cell recruitment, also have an important role in the development of pulmonary vascular remodelling (40, 41). It is likely that the reduction in vascular remodelling observed after MRP4 inhibition results in a reduction in the release of pro-inflammatory factors from activated endothelial cells and smooth muscle cells. To our knowledge, there is no evidence that MRP4 directly controls the release of such factors or directly modulates the function of inflammatory cells. MRP4 expression has however been reported in blood cells progenitors (42). Whether MRP4 prevent the development of PH through a direct impact on the inflammatory process on top of its action on vascular endothelial and smooth muscle cells would deserve further investigations.

We also observed an important effect of the MRP4 inhibitor MK571 on the development of right ventricle hypertrophy. Beyond the reduction in pulmonary pressure following MRP4 inhibition, this beneficial effect could also be linked to a more direct impact of MRP4 inhibition in the right ventricle as previously reported with PDE5 inhibitors (43, 44). MK571 is however also an inhibitor of MRP1, another transporter of ABCC family that is able to extrude leukotrienes (21), molecules acting against the oxidative stress (45). However, the activation of PKA and PKG found in MK571-treated mice is unlikely to be carried by MRP1 inhibition as MRP1 silencing in isolated PASMC had no effect on PKA and PKG activities and on cAMP and cGMP levels. Moreover MK571 has also been recognized as a leukotriene D4 receptor antagonist. LTD4 has been implicated in mitogen-induced proliferation of vascular smooth muscle cells (46). Although inhibition of LTD4-mediated pathways could have been involved in reversal of PH in our model but is unlikely to explain the dramatic increase in PKA or PKG activities. Thus, it is more plausible that the reversal of PH in MK571-treated animals was the result of MRP4 inhibition alone. Thus, the reversal of PH in MK571-treated animals should essentially and directly be related to MRP4 inhibition.

MRP4 is also a physiological transporter of endogenous molecules such as glutathion, glucuronate, sulfate conjugates, urate and prostaglandins (20, 22, 47-49) but none of these molecules had previously been described as modulators of PKA and PKG activity. Finally, the enhancement of PASMC apoptosis has been proposed as a potential mechanism to reverse pulmonary vascular remodelling during PH (5, 50-54). Some studies have shown the role of cyclic nucleotides in modulating apoptosis in PASMC (6). In short-term in vitro experiments, we were however unable to observe an induction of apoptosis following MRP4 silencing. This could be related to a balance between the cAMP anti-apoptotic effects and the cGMP pro-apoptotic ones (55, 56). However, the dramatic reversal of PAH observed in vivo in

MK571 treated mice asks whether apoptosis could be induced following long-term MRP4 inhibition.

We addressed the role of MRP4 in the relaxation and contraction of intrapulmonary arteries from wild type mice and MRP4^{-/-} mice subjected to chronic hypoxia or maintained under normoxia. The results suggest a general hyper-reactivity in intrapulmonary arteries from animals with hypoxia-induced PH in response to contractile stimuli (57). We were unable to find differences in pulmonary arteries relaxation and contraction in MRP4^{-/-} mice even in chronic hypoxic conditions. These experiments were performed in intrapulmonary arteries with an internal diameter of $521.8 \pm 8.7 \mu\text{m}$ (322.6 to 645.4 μm – n = 87) as it was not possible for technical reasons to perform such experiments in smaller vessels (15 to 50 μm of diameter). The alteration of the pulmonary arterial tone and the pulmonary arterial remodelling are however known to be higher when the vessels are smaller (58). Our histological analyses in lungs from hypoxic MRP4^{-/-} mice showed a major change in vascular remodelling for vessels with a lower diameter of 15 to 50 μm but not in larger vessels.

In conclusion, by acting on the possible extrusion of the cyclic nucleotides, inhibition of MRP4 not only blocks but also reverses hypoxia-induced PH in mice. In addition, targeting MRP4 can affect PH-associated proliferation and migration of vascular wall components, in vitro. Collectively, we have presented both in vitro and in vivo findings strongly suggesting inhibition of MRP4 as a novel therapy for treating patients with human PAH.

METHODS

Experimental procedures are described in details in Supplemental methods

Reagents. See Supplemental Methods

Animal model of PH

The MRP4^{-/-} mice were originally derived in the laboratory of John Schuetz and repeatedly back-crossed to FVB (Friend virus B-type) mice to > 99% FVB. Homozygous MRP4^{-/-} mice in FVB background were compared to FVB wild type (WT) mice kept in the same conditions. For the PH prevention protocol, 15 mice from each groups (MRP4^{-/-} and WT, 6 week-old) were exposed to chronic hypoxia (10% O₂) in a ventilated chamber during 28 days. Animals were fed standard chow and water *ad libitum*. Concerning the PH reversal study, 5 week-old WT mice were maintained in hypoxia during 3 weeks, then were randomized to receive, during 2 weeks, either oral vehicle, MK571 at the doses of 5 mg.kg⁻¹.d⁻¹ or 25 mg.kg⁻¹.d⁻¹. At the same time, the experiment was designed for mice in normoxia condition. Increased haematocrit values were checked to assess the efficiency of hypoxia. For hemodynamic measurements, mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of ketamin (100mg/mL, MTC Pharmaceuticals) and xylazine (10 mg/kg, Bayer). A 24-gauge catheter was advanced to the right ventricle through the right jugular vein for measurement of RV pressure with fluid filled force transducers. RV hypertrophy was expressed as the ratio of the RV wall to LV wall plus septum weight (RV/(LV+S) - Fulton index). Experiments were performed by 2 investigators in a blinded fashion. After mice were euthanized, a thoracotomy was performed and after

exsanguination, the left lung was fixed for histology in 10% neutral buffered formalin, the right lung was snap-frozen in liquid nitrogen. Haematoxylin-Eosin (H&E) staining was performed on 6 μm sections according to common procedures. To assess the type of remodelling of muscular pulmonary arteries, microscopic images were analyzed using a computerized morphometric system (Leica). For each mouse, medial thickness of 50 intraracinar arteries in 4 different sections was measured and reported to their cross sectional diameters. Arteries were categorized according to their external diameter: category I included arteries with an external diameter between 15 to 30 μm ; category II with an external diameter between 31 μm and 50 μm , category III between 51 μm and 75 μm and category IV between 76 μm and 100 μm . Analysis was done in a blinded fashion.

Patients with idiopathic PAH and controls

We studied lung specimens obtained at the time of lung transplantation in 8 patients with idiopathic PAH and at the time of thoracic surgery (lobectomy or pneumonectomy for localised lung cancer) in 5 control patients. This study was approved by the local ethics committee (Comité de Protection des Personnes, CPP Ile de France VII, Le Kremlin Bicêtre, France) and patients agreed to contribute to the study with their informed consent. See Supplemental Methods for details.

Immunofluorescence staining. See Supplemental Methods

Isolation and culture of PASMCs and PAECs

Human PASMCs were isolated as previously described (59). To identify PASMCs, we examined cultured cells for expression of muscles-specific contractile and cytoskeletal proteins including smooth-muscle α -actin, desmin, and vinculin. Cells were cultured in SMCBM2 containing 5% FCS (FCS: Fetal calf serum supplemented with epidermal growth factor 10ng/ml, basic fibroblast growth factor 40ng/ml, insulin 1mg/ml) (PromoCell) and antibiotics at 37°C with 5% CO₂. The cells were used between passages 3 and 6. Pulmonary arteries endothelial cells were purchased in Lonza (CC-2527), cultured in EBM-2 (Lonza) containing 5% and growth factors and used between passages 2 and 3.

RNA interference and cellular experiments in PASMCs and PAECs

Cells were transfected with siRNA (50nM) using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) or electroporation using Amaxa® Nucleofector technology according to the manufacturer's instructions. A colorimetric BrdU cell proliferation assay was performed according to the manufacturer's instructions (Roche). Migration of hPASMC was assessed using a micro Boyden Chamber QCM™ 24-Well Colorimetric Cell Migration Assay (Chemicon international) and apoptosis was assessed by using the ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit (Chemicon international) according to the manufacturer's instructions. Cyclic GMP and AMP were measured by specific competitive enzyme immunoassay as recommended by the manufacturer (R&D systems). See Supplemental Methods for details.

Quantitative real-time PCR and Western blotting. See Supplemental Methods.

Vascular reactivity

FVB mice were exposed to chronic hypoxia in a hypobaric chamber (380 mmHg) for 21 days. The chamber was open third a week for 30 min for animal care and cleaning. Control mice (normoxic group) were housed in room air at ambient atmospheric pressure. Mice were sacrificed using CO₂ asphyxia according to the animal care and use local ethics committee (Comité d'éthique régional d'Aquitaine – referenced AP 21/06/2010). The left lung was rapidly removed and rinsed in Krebs solution containing (in mM): 119 NaCl, 4.7 KCl, 1.17 MgSO₄, 25 NaHCO₃, 1.18 KH₂PO₄, 1.5 CaCl₂, and 5.5 D-glucose. Intrapulmonary arteries with an internal diameter of 515.9 ± 11.7 μm (322.6 to 638.5 μm – n = 45) for WT mice and 528 ± 12.9 μm (368.9 to 645.4 μm – n = 43) for MRP4 KO mice (intrapulmonary arteries of the first order) were then dissected free from surrounding connective tissues under binocular control. Segments of pulmonary artery (1.8 – 2 mm length) were mounted in a Mulvany myograph (Multi Myograph System, model 610M, J.P. Trading, Aarhus, Denmark) as previously described (60). Passive length-tension relationship demonstrated that the optimal resting tension corresponded to an equivalent transmural pressure of 15 and 30 mmHg, in arteries from control and hypoxic mice, respectively. After 60 min equilibration period under resting tone, viability of arteries was evaluated using Krebs containing 80 mM KCl. High potassium solutions were obtained by substituting an equimolar amount of KCl for NaCl from Krebs's solution. Arteries developing a wall tension below 0.5 mN/mm were discarded. Concentration-response curves to PGF₂α (0.01 to 300 μM) were then constructed. Relaxation was investigated by constructing concentration-response curves with carbamylcholine (as reference endothelial NO-dependent agent) (0.01 to 1000 μM) on arteries submaximally precontracted with PGF₂α (10 μM and 30 μM for normoxic and chronic hypoxic conditions respectively).

IL-6 measurements

Levels of IL-6 was measured in total lungs extracts using an ELISA kit according to the manufacturer (R&D Systems). For each test, the quantities were normalized on the total protein concentration.

Statistical Analysis

All quantitative data are reported as means \pm SEM. Differences were considered significant when $P < 0.05$. See Supplemental Methods for details.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from ANR and Fondation de France to JSH (grant N°2006005606) and by Fondation Leducq through the CAERUS network to AML (research agreement 05CVD03). YH was recipient of PhD fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR) and YS was supported by Fondation pour la Recherche Médicale. We thank Dr Chen Yan (University of Rochester Medical Center, NY) for providing the PDE3A antibody, Pr Pietr Borst and Koen Van Wetering (The Netherlands Cancer Institute-Amsterdam) for helpful discussions and advises on the biological function of MRP4. We finally thank Dr Martin Schwarz for his assistance during manuscript revision

REFERENCES

1. Rubin, L.J. 1997. Primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 336:111-117.
2. Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., Bertocchi, M., Habib, G., Gressin, V., Yaici, A., Weitzenblum, E., Cordier, J.F., Chabot, F., et al. 2010. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation* 122:156-163.
3. Humbert, M., Morrell, N.W., Archer, S.L., Stenmark, K.R., MacLean, M.R., Lang, I.M., Christman, B.W., Weir, E.K., Eickelberg, O., Voelkel, N.F., et al. 2004. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:13S-24S.
4. Pak, O., Aldashev, A., Welsh, D., and Peacock, A. 2007. The effects of hypoxia on the cells of the pulmonary vasculature. *Eur Respir J* 30:364-372.
5. Rabinovitch, M. 2008. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 118:2372-2379.
6. Wharton, J., Strange, J.W., Moller, G.M., Growcott, E.J., Ren, X., Franklyn, A.P., Phillips, S.C., and Wilkins, M.R. 2005. Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med* 172:105-113.
7. Zhao, L., Mason, N.A., Morrell, N.W., Kojonazarov, B., Sadykov, A., Maripov, A., Mirrakhimov, M.M., Aldashev, A., and Wilkins, M.R. 2001. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 104:424-428.
8. Galie, N., Ghofrani, H.A., Torbicki, A., Barst, R.J., Rubin, L.J., Badesch, D., Fleming, T., Parpia, T., Burgess, G., Branzi, A., et al. 2005. Sildenafil citrate therapy for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 353:2148-2157.
9. Galie, N., Brundage, B.H., Ghofrani, H.A., Oudiz, R.J., Simonneau, G., Safdar, Z., Shapiro, S., White, R.J., Chan, M., Beardsworth, A., et al. 2009. Tadalafil therapy for pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 119:2894-2903.
10. Humbert, M., Sitbon, O., and Simonneau, G. 2004. Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351:1425-1436.
11. Galie, N., Hoeper, M.M., Humbert, M., Torbicki, A., Vachiery, J.L., Barbera, J.A., Beghetti, M., Corris, P., Gaine, S., Gibbs, J.S., et al. 2009. Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J* 30:2493-2537.
12. Sebkhi, A., Strange, J.W., Phillips, S.C., Wharton, J., and Wilkins, M.R. 2003. Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Circulation* 107:3230-3235.
13. Schermuly, R.T., Pullamsetti, S.S., Kwapiszewska, G., Dumitrescu, R., Tian, X., Weissmann, N., Ghofrani, H.A., Kaulen, C., Dunkern, T., Schudt, C., et al. 2007. Phosphodiesterase 1 upregulation in pulmonary arterial hypertension: target for reverse-remodeling therapy. *Circulation* 115:2331-2339.
14. Murray, F., Patel, H.H., Suda, R.Y., Zhang, S., Thistlethwaite, P.A., Yuan, J.X., and Insel, P.A. 2007. Expression and activity of cAMP phosphodiesterase isoforms in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary hypertension: role for PDE1. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292:L294-303.

15. Hoepfer, M.M., Schwarze, M., Ehlerding, S., Adler-Schuermeier, A., Spiekerkoetter, E., Niedermeyer, J., Hamm, M., and Fabel, H. 2000. Long-term treatment of primary pulmonary hypertension with aerosolized iloprost, a prostacyclin analogue. *N Engl J Med* 342:1866-1870.
16. Wielinga, P.R., van der Heijden, I., Reid, G., Beijnen, J.H., Wijnholds, J., and Borst, P. 2003. Characterization of the MRP4- and MRP5-mediated transport of cyclic nucleotides from intact cells. *J Biol Chem* 278:17664-17671.
17. van Aubel, R.A., Smeets, P.H., Peters, J.G., Bindels, R.J., and Russel, F.G. 2002. The MRP4/ABCC4 gene encodes a novel apical organic anion transporter in human kidney proximal tubules: putative efflux pump for urinary cAMP and cGMP. *J Am Soc Nephrol* 13:595-603.
18. Sassi, Y., Lipskaia, L., Vandecasteele, G., Nikolaev, V.O., Hatem, S.N., Cohen Aubart, F., Russel, F.G., Mougnot, N., Vrignaud, C., Lechat, P., et al. 2008. Multidrug resistance-associated protein 4 regulates cAMP-dependent signaling pathways and controls human and rat SMC proliferation. *J Clin Invest* 118:2747-2757.
19. Sassi, Y., Hara, Y., Lompre, A.M., and Hulot, J.S. 2009. Multi-drug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) and cyclic nucleotides signaling pathways. *Cell Cycle* 8:962-963.
20. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., De Haas, M., Van Deemter, L., Wijnholds, J., Balzarini, J., and Borst, P. 2003. Characterization of the transport of nucleoside analog drugs by the human multidrug resistance proteins MRP4 and MRP5. *Mol Pharmacol* 63:1094-1103.
21. Borst, P., Evers, R., Kool, M., and Wijnholds, J. 2000. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. *J Natl Cancer Inst* 92:1295-1302.
22. Reid, G., Wielinga, P., Zelcer, N., van der Heijden, I., Kuil, A., de Haas, M., Wijnholds, J., and Borst, P. 2003. The human multidrug resistance protein MRP4 functions as a prostaglandin efflux transporter and is inhibited by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9244-9249.
23. Ghofrani, H.A., Barst, R.J., Benza, R.L., Champion, H.C., Fagan, K.A., Grimminger, F., Humbert, M., Simonneau, G., Stewart, D.J., Ventura, C., et al. 2009. Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54:S108-117.
24. Budhiraja, R., Tuder, R.M., and Hassoun, P.M. 2004. Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension. *Circulation* 109:159-165.
25. Morrell, N.W., Yang, X., Upton, P.D., Jourdan, K.B., Morgan, N., Sheares, K.K., and Trembath, R.C. 2001. Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* 104:790-795.
26. Zhang, S., Fantozzi, I., Tigno, D.D., Yi, E.S., Platoshyn, O., Thistlethwaite, P.A., Kriett, J.M., Yung, G., Rubin, L.J., and Yuan, J.X. 2003. Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285:L740-754.
27. Loirand, G., Guerin, P., and Pacaud, P. 2006. Rho kinases in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Circ Res* 98:322-334.
28. Maher, J.M., Dieter, M.Z., Aleksunes, L.M., Slitt, A.L., Guo, G., Tanaka, Y., Scheffer, G.L., Chan, J.Y., Manautou, J.E., Chen, Y., et al. 2007. Oxidative and electrophilic stress induces multidrug resistance-associated protein transporters via the nuclear factor-E2-related factor-2 transcriptional pathway. *Hepatology* 46:1597-1610.
29. Indolfi, C., Avvedimento, E.V., Di Lorenzo, E., Esposito, G., Rapacciuolo, A., Giuliano, P., Grieco, D., Cavuto, L., Stingone, A.M., Ciullo, I., et al. 1997. Activation of cAMP-PKA signaling in vivo inhibits smooth muscle cell proliferation induced by vascular injury. *Nat Med* 3:775-779.
30. Sinnaeve, P., Chiche, J.D., Gillijns, H., Van Pelt, N., Wirthlin, D., Van De Werf, F., Collen, D., Bloch, K.D., and Janssens, S. 2002. Overexpression of a constitutively active protein kinase G mutant reduces neointima formation and in-stent restenosis. *Circulation* 105:2911-2916.

31. Baliga, R.S., Zhao, L., Madhani, M., Lopez-Torondel, B., Visintin, C., Selwood, D., Wilkins, M.R., MacAllister, R.J., and Hobbs, A.J. 2008. Synergy between natriuretic peptides and phosphodiesterase 5 inhibitors ameliorates pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 178:861-869.
32. Ghofrani, H.A., and Hoeper, M.M. 2006. [Drug combination treatment for pulmonary arterial hypertension]. *Dtsch Med Wochenschr* 131:S330-333.
33. Ghofrani, H.A., Pepke-Zaba, J., Barbera, J.A., Channick, R., Keogh, A.M., Gomez-Sanchez, M.A., Kneussl, M., and Grimminger, F. 2004. Nitric oxide pathway and phosphodiesterase inhibitors in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43:68S-72S.
34. Ghofrani, H.A., Rose, F., Schermuly, R.T., Olschewski, H., Wiedemann, R., Kreckel, A., Weissmann, N., Ghofrani, S., Enke, B., Seeger, W., et al. 2003. Oral sildenafil as long-term adjunct therapy to inhaled iloprost in severe pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* 42:158-164.
35. Simonneau, G., Rubin, L.J., Galie, N., Barst, R.J., Fleming, T.R., Frost, A.E., Engel, P.J., Kramer, M.R., Burgess, G., Collings, L., et al. 2008. Addition of sildenafil to long-term intravenous epoprostenol therapy in patients with pulmonary arterial hypertension: a randomized trial. *Ann Intern Med* 149:521-530.
36. Zhao, L., Sebkhii, A., Ali, O., Wojciak-Stothard, B., Mamanova, L., Yang, Q., Wharton, J., and Wilkins, M.R. 2009. Simvastatin and sildenafil combine to attenuate pulmonary hypertension. *Eur Respir J* 34:948-957.
37. Dorfmueller, P., Zarka, V., Durand-Gasselino, I., Monti, G., Balabanian, K., Garcia, G., Capron, F., Coulomb-Lhermine, A., Marfaing-Koka, A., Simonneau, G., et al. 2002. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 165:534-539.
38. Hassoun, P.M., Mouthon, L., Barbera, J.A., Eddahibi, S., Flores, S.C., Grimminger, F., Jones, P.L., Maitland, M.L., Michelakis, E.D., Morrell, N.W., et al. 2009. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* 54:S10-19.
39. Tuder, R.M., Groves, B., Badesch, D.B., and Voelkel, N.F. 1994. Exuberant endothelial cell growth and elements of inflammation are present in plexiform lesions of pulmonary hypertension. *Am J Pathol* 144:275-285.
40. Steiner, M.K., Syrkina, O.L., Kolliputi, N., Mark, E.J., Hales, C.A., and Waxman, A.B. 2009. Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circ Res* 104:236-244, 228p following 244.
41. Humbert, M., Monti, G., Brenot, F., Sitbon, O., Portier, A., Grangeot-Keros, L., Duroux, P., Galanaud, P., Simonneau, G., and Emile, D. 1995. Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 151:1628-1631.
42. Oevermann, L., Scheitz, J., Starke, K., Kock, K., Kiefer, T., Dolken, G., Niessen, J., Greinacher, A., Siegmund, W., Zygmunt, M., et al. 2009. Hematopoietic stem cell differentiation affects expression and function of MRP4 (ABCC4), a transport protein for signaling molecules and drugs. *Int J Cancer* 124:2303-2311.
43. Nagendran, J., Archer, S.L., Soliman, D., Gurtu, V., Moudgil, R., Haromy, A., St Aubin, C., Webster, L., Rebeyka, I.M., Ross, D.B., et al. 2007. Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. *Circulation* 116:238-248.
44. Archer, S.L., and Michelakis, E.D. 2009. Phosphodiesterase type 5 inhibitors for pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 361:1864-1871.
45. Mueller, C.F., Wassmann, K., Widder, J.D., Wassmann, S., Chen, C.H., Keuler, B., Kudin, A., Kunz, W.S., and Nickenig, G. 2008. Multidrug resistance protein-1 affects oxidative stress, endothelial dysfunction, and atherogenesis via leukotriene C4 export. *Circulation* 117:2912-2918.
46. Panettieri, R.A., Tan, E.M., Ciocca, V., Luttmann, M.A., Leonard, T.B., and Hay, D.W. 1998. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and

- contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:453-461.
47. Chen, Z.S., Lee, K., and Kruh, G.D. 2001. Transport of cyclic nucleotides and estradiol 17-beta-D-glucuronide by multidrug resistance protein 4. Resistance to 6-mercaptopurine and 6-thioguanine. *J Biol Chem* 276:33747-33754.
 48. Deeley, R.G., Westlake, C., and Cole, S.P. 2006. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. *Physiol Rev* 86:849-899.
 49. Li, C., Krishnamurthy, P.C., Penmatsa, H., Marrs, K.L., Wang, X.Q., Zaccolo, M., Jalink, K., Li, M., Nelson, D.J., Schuetz, J.D., et al. 2007. Spatiotemporal coupling of cAMP transporter to CFTR chloride channel function in the gut epithelia. *Cell* 131:940-951.
 50. Huang, J.B., Liu, Y.L., Sun, P.W., Lv, X.D., Bo, K., and Fan, X.M. Novel strategy for treatment of pulmonary arterial hypertension: enhancement of apoptosis. *Lung* 188:179-189.
 51. McMurtry, M.S., Archer, S.L., Altieri, D.C., Bonnet, S., Haromy, A., Harry, G., Puttagunta, L., and Michelakis, E.D. 2005. Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* 115:1479-1491.
 52. Stenmark, K.R., and Rabinovitch, M. Emerging therapies for the treatment of pulmonary hypertension. *Pediatr Crit Care Med* 11:S85-90.
 53. Schermuly, R.T., Dony, E., Ghofrani, H.A., Pullamsetti, S., Savai, R., Roth, M., Sydykov, A., Lai, Y.J., Weissmann, N., Seeger, W., et al. 2005. Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest* 115:2811-2821.
 54. Nishimura, T., Vaszar, L.T., Faul, J.L., Zhao, G., Berry, G.J., Shi, L., Qiu, D., Benson, G., Pearl, R.G., and Kao, P.N. 2003. Simvastatin rescues rats from fatal pulmonary hypertension by inducing apoptosis of neointimal smooth muscle cells. *Circulation* 108:1640-1645.
 55. Chiche, J.D., Schlutsmeyer, S.M., Bloch, D.B., de la Monte, S.M., Roberts, J.D., Jr., Filippov, G., Janssens, S.P., Rosenzweig, A., and Bloch, K.D. 1998. Adenovirus-mediated gene transfer of cGMP-dependent protein kinase increases the sensitivity of cultured vascular smooth muscle cells to the antiproliferative and pro-apoptotic effects of nitric oxide/cGMP. *J Biol Chem* 273:34263-34271.
 56. Orlov, S.N., Thorin-Trescases, N., Dulin, N.O., Dam, T.V., Fortuno, M.A., Tremblay, J., and Hamet, P. 1999. Activation of cAMP signaling transiently inhibits apoptosis in vascular smooth muscle cells in a site upstream of caspase-3. *Cell Death Differ* 6:661-672.
 57. Delannoy, E., Courtois, A., Freund-Michel, V., Leblais, V., Marthan, R., and Muller, B. Hypoxia-induced hyperreactivity of pulmonary arteries: role of cyclooxygenase-2, isoprostanes, and thromboxane receptors. *Cardiovasc Res* 85:582-592.
 58. Rodat, L., Savineau, J.P., Marthan, R., and Guibert, C. 2007. Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch* 454:41-51.
 59. Eddahibi, S., Humbert, M., Fadel, E., Raffestin, B., Darmon, M., Capron, F., Simonneau, G., Dartevielle, P., Hamon, M., and Adnot, S. 2001. Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension. *J Clin Invest* 108:1141-1150.
 60. Fresquet, F., Pourageaud, F., Leblais, V., Brandes, R.P., Savineau, J.P., Marthan, R., and Muller, B. 2006. Role of reactive oxygen species and gp91phox in endothelial dysfunction of pulmonary arteries induced by chronic hypoxia. *Br J Pharmacol* 148:714-723.

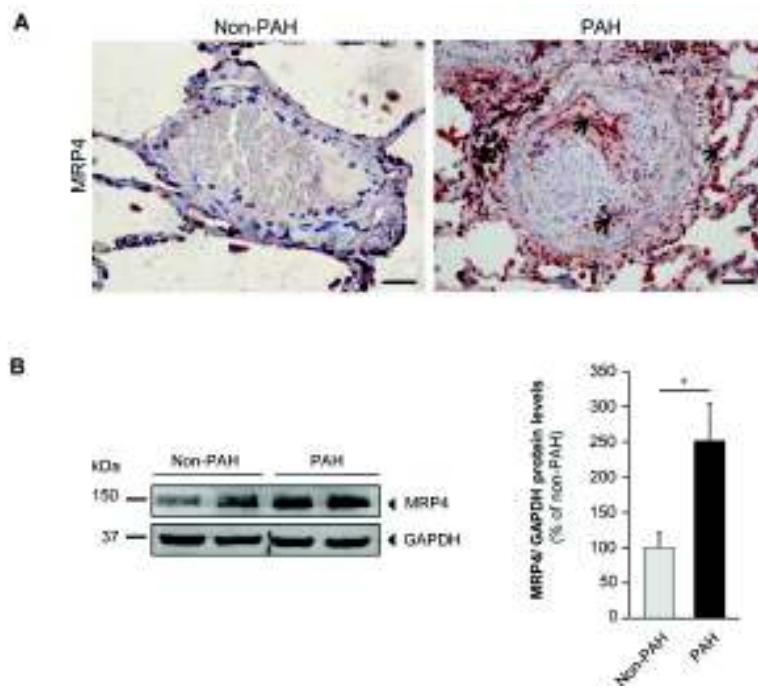


Figure 1: MRP4 expression in control and PAH patients lungs. (A). MRP4 localisation assessed by immunohistochemistry in human pulmonary arteries from control and PAH patients. Arrows indicate the localization of MRP4 proteins found in endothelial cells, smooth muscle cells and pneumocytes. (B) Western blot analysis of MRP4 in lung homogenates from patients with controls (n=4) and PAH (n=4) patients (* $P < 0.05$). Scale bar: 100 μ m.

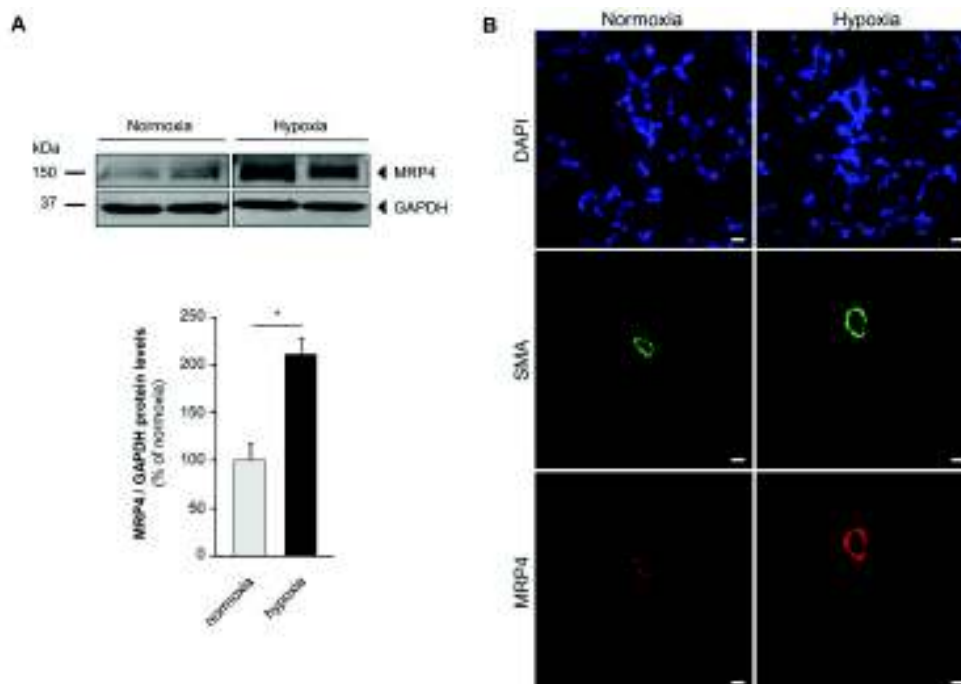


Figure 2: Increased MRP4 expression in hypoxia-induced PH in mice. (A) Western blot analysis of MRP4 in lung homogenates from mice. Immunoblots are representative of 4 individual lungs for each group. The lanes were run on the same gel but were not contiguous, (* $P < 0.05$). (B) MRP4 and smooth muscle cell actin (SMA) expression assessed by immunofluorescence staining in sections of small pulmonary arteries from lungs of WT and MRP4^{-/-} mice in normoxia and hypoxia conditions. Scale bar: 20 μ m.

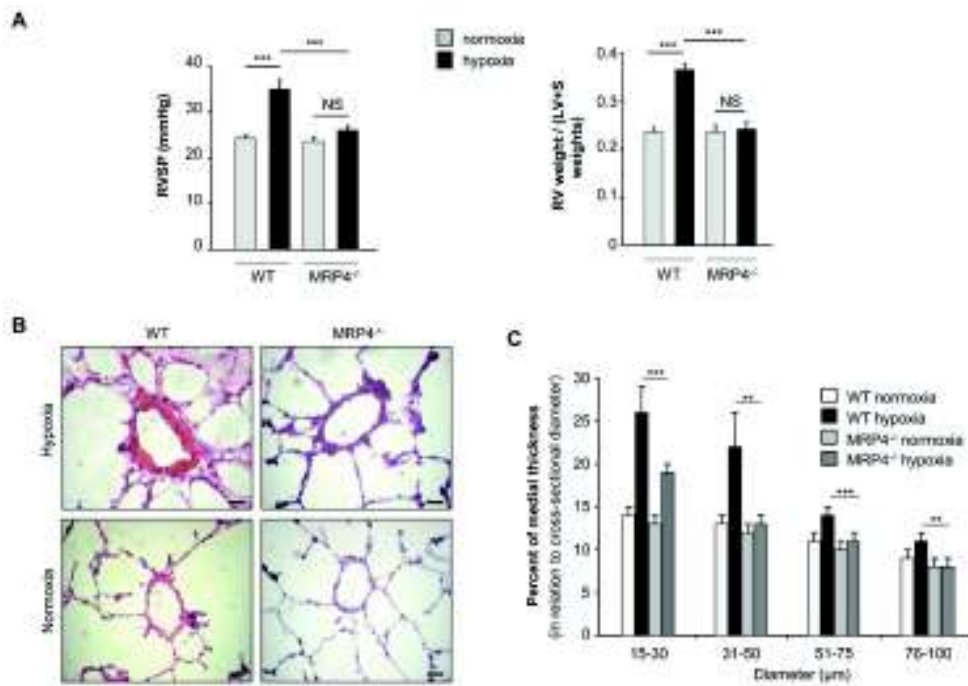


Figure 3: Prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension in MRP4^{-/-} mice. (A) Right ventricle systolic pressure (RVSP, mmHg) and right ventricle hypertrophy reflected by the right ventricle (RV) weight over left ventricle (50) + interventricular septum (S) weights ratio (RV/[LV + S] = Fulton index) in each group (n=15, ***P<0.001). (B) Representative H&E-stained sections of small pulmonary arteries from lungs of WT and MRP4^{-/-} mice in normoxia and hypoxia conditions. (C) Percentage of medial thickness of small arteries in relation to cross-sectional diameter (**P<0.01). Scale bar: 20μm.

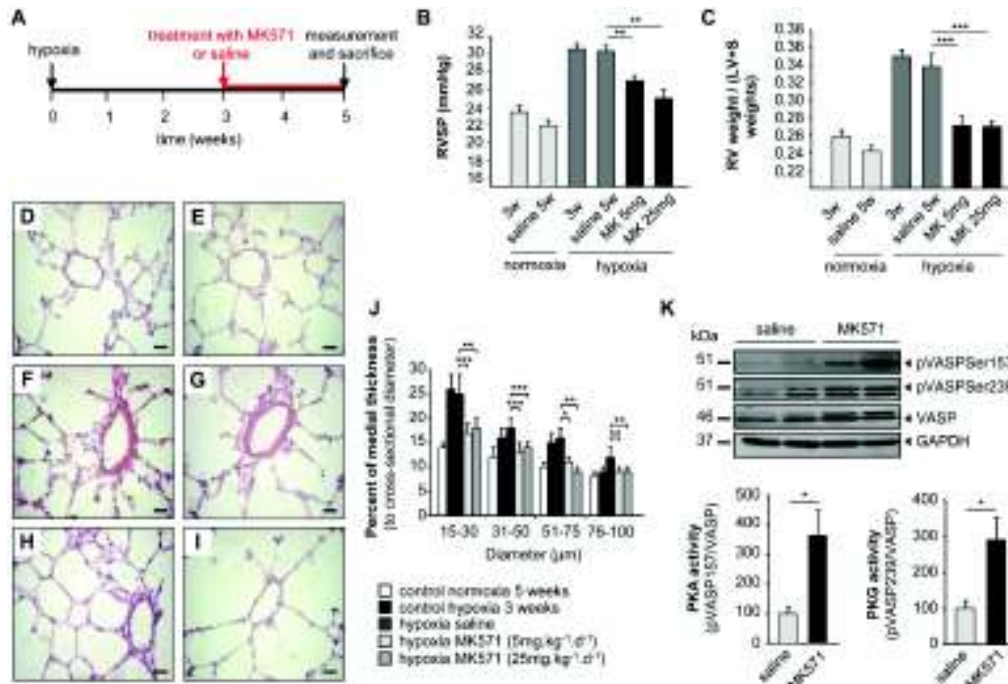


Figure 4: Reversal of hypoxia-induced pulmonary hypertension after MRP4 inhibition. (A) Schematic representation of PH-reversal experimental study design. (B) RVSP (mmHg) measured after 3 and 5 weeks of normoxia and hypoxia conditions, and in mice that were exposed for 5 weeks to hypoxia and treated with saline or 5mg.kg⁻¹.d⁻¹ or 25mg.kg⁻¹.d⁻¹ of MK571 (6 mice at least per group) during the last two weeks (***P*<0.001, ***P*<0.01). (C) Right ventricle hypertrophy reflected by the Fulton index for the same groups (6 mice at least per group). (D-I) Representative H&E-stained sections of small pulmonary arteries from the different groups: control normoxia vs hypoxia 3 weeks (D and F), control normoxia 5 weeks (E) vs hypoxia 5 weeks after 2 weeks of saline (G), MK571 5mg.kg⁻¹.d⁻¹ (H) and 25mg.kg⁻¹.d⁻¹ (I) treatments. (J) Percentage of medial thickness of small arteries in relation to cross-sectional diameter. (K) Western-Blot analysis of total lung extracts from mice, proteins were incubated with anti-MRP4, anti-pVASP-Ser157 to assess PKA activity, anti-pVASP-Ser239 to assess PKG activity, anti-VASP was used for normalization and anti-GAPDH as a loading control. Immunoblots are representative of 4 individual lungs for each groups (**P*<0.05).

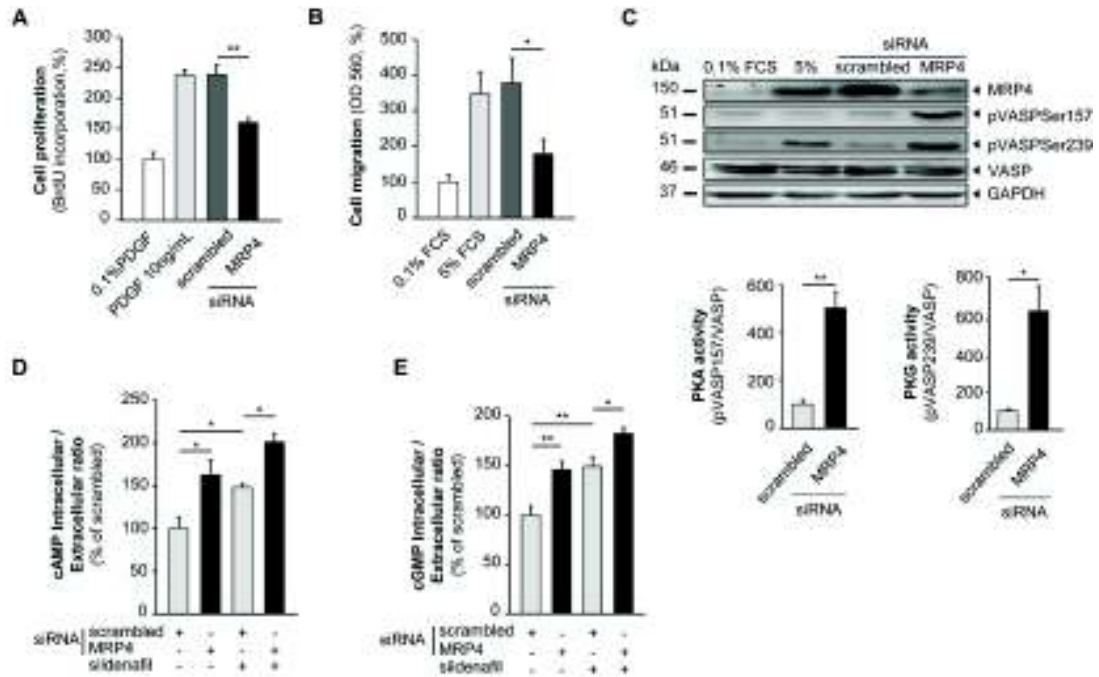


Figure 5: Inhibition of hPASC proliferation and migration after MRP4 silencing. (A) Effect of MRP4 siRNA on hPASC proliferation (assessed by BrdU incorporation) compared to scrambled siRNA. Proliferation was normalized to the value obtained in 0.1% PDGF. 4 experiments were done in triplicate (** $P < 0.01$). **(B)** Effect of MRP4 siRNA on hPASC migration (assessed by colorimetric assay OD at 560nm) compared to scrambled siRNA. 4 experiments were done in triplicate (* $P < 0.05$). **(C)** Western-Blot analysis of total lysates from hPASC transfected with scrambled or MRP4 siRNAs for 72 h. Proteins were incubated with anti-MRP4, anti-pVASP-Ser157 to assess PKA activity, anti-pVASP-Ser239 to assess PKG activity. Anti-VASP was used for normalization and anti-GAPDH as a loading control. 3 experiments were done. **(D&E)** Intracellular/extracellular ratios of cAMP and cGMP, measured with a specific competitive enzyme immunoassay, in isolated hPASCs transfected with scrambled or MRP4 siRNAs for 72 h, and treated or not with sildenafil (1 μ M, 48h). Four experiments were done in triplicate (* $P < 0.05$).

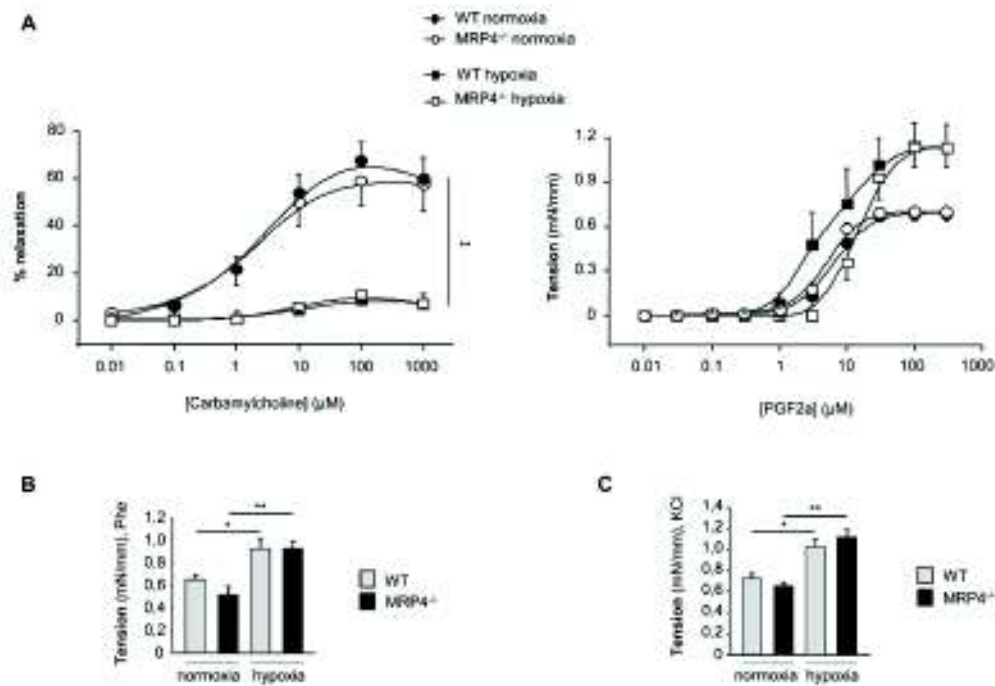


Figure 6: Relaxation and contraction of intrapulmonary arteries from wild type and MRP4^{-/-} mice in normoxic or hypoxic conditions. (A) Relaxation to carbamylcholine (0.01 to 1000 μM) in intrapulmonary arteries precontracted with either 10 μM or 30 μM of prostaglandin F₂ a (PGF₂a) in normoxic and chronic hypoxic mice respectively (n = 8 – 13 rings, 4 – 5 mice and n = 10 rings, 6 mice respectively). Relaxation is expressed as a percentage of the precontraction to PGF₂a. Dose-dependent contraction to PGF₂a (0.01 to 300 μM) (n = 8 rings, 3 mice in normoxia and n = 6 rings, 6 mice in chronic hypoxia) (**P<0.001). **(B)** Comparison of the contraction to phenylephrine (Phe) 10 μM (n = 9 – 13 rings, 4 – 5 mice in normoxia and n = 16 rings, 6 mice in chronic hypoxia). **(C)** Comparison of the contraction to high potassium solutions (KCl 80 mM) (n = 16 rings and 6 mice in normoxia and chronic hypoxia). (*P<0.05).

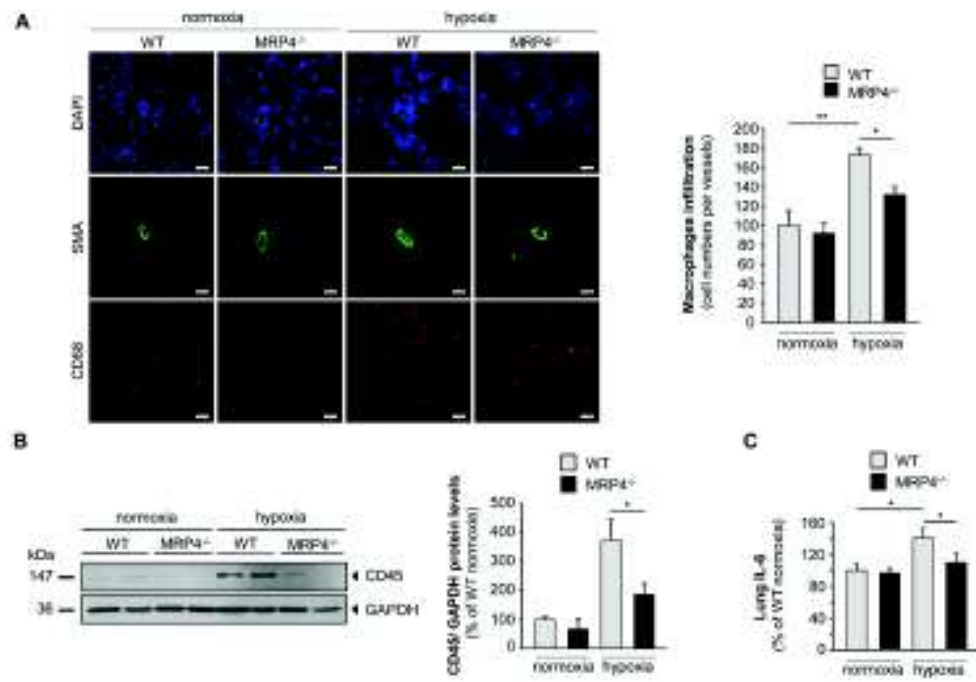


Figure 7: Reduction of hypoxia-induced inflammatory response in MRP4^{-/-} mice. (A) Lung macrophages recruitment under hypoxia condition in wild-type vs MRP4^{-/-} mice. CD68 was used as a macrophage marker. The photographs are representative of each condition. Scale bar: 40 μ m. **(B)** CD45 quantification in total lung extracts from wild-type vs MRP4^{-/-} mice. Anti-GAPDH was used as a loading control and immunoblots are representative of lungs from 4 individuals for each group. **(C)** Dosage of IL-6 in lung extracts determined by ELISA. The level was normalized on the protein total quantity (* P <0.05).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Aggarwal, S. and M. F. Pittenger (2005). "Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses." Blood **105**(4): 1815-22.
- Aicher, A., C. Heeschen, et al. (2003). "Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells." Nat Med **9**(11): 1370-6.
- Alcami, A. (2003). "Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors." Nat Rev Immunol **3**(1): 36-50.
- Alkhatib, G., C. Combadiere, et al. (1996). "CC CKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1." Science **272**(5270): 1955-8.
- Alvarez-Dolado, M., R. Pardal, et al. (2003). "Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes." Nature **425**(6961): 968-73.
- Alvarez, D. F., L. Huang, et al. (2008). "Lung microvascular endothelium is enriched with progenitor cells that exhibit vasculogenic capacity." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **294**(3): L419-30.
- Andersson-Sjoland, A., J. S. Erjefalt, et al. (2009). "Fibrocytes are associated with vascular and parenchymal remodelling in patients with obliterative bronchiolitis." Respir Res **10**: 103.
- Andreeva, E. R., I. M. Pugach, et al. (1997). "Subendothelial smooth muscle cells of human aorta express macrophage antigen in situ and in vitro." Atherosclerosis **135**(1): 19-27.
- Angelini, D. J., Q. Su, et al. (2010). "Hypoxia-induced mitogenic factor (HIMF/FIZZ1/RELM alpha) recruits bone marrow-derived cells to the murine pulmonary vasculature." PLoS One **5**(6): e11251.
- Antonitsis, P., E. Ioannidou-Papagiannaki, et al. (2008). "Cardiomyogenic potential of human adult bone marrow mesenchymal stem cells in

- vitro." Thorac Cardiovasc Surg **56**(2): 77-82.
- Antonitsis, P., E. Ioannidou-Papagiannaki, et al. (2007). "In vitro cardiomyogenic differentiation of adult human bone marrow mesenchymal stem cells. The role of 5-azacytidine." Interact Cardiovasc Thorac Surg **6**(5): 593-7.
- Apostolopoulos, J., P. Davenport, et al. (1996). "Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques." Arterioscler Thromb Vasc Biol **16**(8): 1007-12.
- Aragay, A. M., M. Mellado, et al. (1998). "Monocyte chemoattractant protein-1-induced CCR2B receptor desensitization mediated by the G protein-coupled receptor kinase 2." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(6): 2985-90.
- Arciniegas, E., M. G. Frid, et al. (2007). "Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L1-8.
- Arcot, S. S., J. A. Fagerland, et al. (1995). "Basic fibroblast growth factor alterations during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Growth Factors **12**(2): 121-30.
- Arends, S. J., J. Damoiseaux, et al. (2010). "Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Eur Respir J **35**(4): 923-5.
- Armstrong, R. and C. Svendsen (2000). "Neural stem cells: from cell biology to cell replacement." Cell Transplant **9**(2): 139-52.
- Armulik, A., A. Abramsson, et al. (2005). "Endothelial/pericyte interactions." Circ Res **97**(6): 512-23.
- Asahara, T., H. Masuda, et al. (1999). "Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization." Circ Res **85**(3): 221-8.
- Asahara, T., T. Murohara, et al. (1997). "Isolation of putative progenitor endothelial cells for

- angiogenesis." Science **275**(5302): 964-7.
- Asosingh, K., M. A. Aldred, et al. (2008). "Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Pathol **172**(3): 615-27.
- Atkinson, C., S. Stewart, et al. (2002). "Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor." Circulation **105**(14): 1672-8.
- Babcock, G. J., M. Farzan, et al. (2003). "Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor." J Biol Chem **278**(5): 3378-85.
- Baber, S. R., W. Deng, et al. (2007). "Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction." Am J Physiol Heart Circ Physiol **292**(2): H1120-8.
- Bach, S., A. Renahan, et al. (2000). "Stem cells: the intestinal stem cell as a paradigm." Carcinogenesis **21**(3): 469-76.
- Baggiolini, M., B. Dewald, et al. (1997). "Human chemokines: an update." Annu Rev Immunol **15**: 675-705.
- Balabanian, K., A. Foussat, et al. (2002). "CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **165**(10): 1419-25.
- Balmelli, C., N. Ruggli, et al. (2005). "Fibrocytes are potent stimulators of anti-virus cytotoxic T cells." J Leukoc Biol **77**(6): 923-33.
- Banasova, A., H. Maxova, et al. (2008). "Prevention of mast cell degranulation by disodium cromoglycate attenuates the development of hypoxic pulmonary hypertension in rats exposed to chronic hypoxia." Respiration **76**(1): 102-7.
- Bao, X., J. Wei, et al. "Transplantation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promotes behavioral recovery and endogenous neurogenesis after cerebral ischemia in rats." Brain Res.

- Barber, C. L. and M. L. Iruela-Arispe (2006). "The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications." *Pediatr Res* **59**(4 Pt 2): 26R-32R.
- Barile, L., I. Chimenti, et al. (2007). "Cardiac stem cells: isolation, expansion and experimental use for myocardial regeneration." *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* **4 Suppl 1**: S9-S14.
- Barlic, J., M. H. Khandaker, et al. (1999). "beta-arrestins regulate interleukin-8-induced CXCR₁ internalization." *J Biol Chem* **274**(23): 16287-94.
- Bartolovic, K., S. Balabanov, et al. (2004). "Inhibitory effect of imatinib on normal progenitor cells in vitro." *Blood* **103**(2): 523-9.
- Becker, A. J., C. E. Mc, et al. (1963). "Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells." *Nature* **197**: 452-4.
- Bellini, A. and S. Mattoli (2007). "The role of the fibrocyte, a bone marrow-derived mesenchymal progenitor, in reactive and reparative fibroses." *Lab Invest* **87**(9): 858-70.
- Beltrami, A. P., L. Barlucchi, et al. (2003). "Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration." *Cell* **114**(6): 763-76.
- Benezra, M., I. Vlodavsky, et al. (1993). "Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix." *Blood* **81**(12): 3324-31.
- Benisty, J. I., V. V. McLaughlin, et al. (2004). "Elevated basic fibroblast growth factor levels in patients with pulmonary arterial hypertension." *Chest* **126**(4): 1255-61.
- Bentzon, J. F. and E. Falk (2010). "Circulating smooth muscle progenitor cells in atherosclerosis and plaque rupture: current perspective and methods of analysis." *Vascul Pharmacol* **52**(1-2): 11-20.
- Berger, E. A. (1997). "HIV entry and tropism: the chemokine receptor connection." *Aids* **11 Suppl A**: S3-16.

- Biswas, A. and R. Hutchins (2007).
"Embryonic stem cells." Stem Cells Dev **16**(2): 213-22.
- Bjornson, C., R. Rietze, et al. (1999).
"Turning brain into blood: a hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo." Science **283**(5401): 534-7.
- Bjornsson, J. and W. D. Edwards (1985).
"Primary pulmonary hypertension: a histopathologic study of 80 cases." Mayo Clin Proc **60**(1): 16-25.
- Blancas, A., N. Lauer, et al. (2008).
"Endothelial differentiation of embryonic stem cells." Curr Protoc Stem Cell Biol **Chapter 1**: Unit 1F.5.
- Blumberg, F. C., C. Lorenz, et al. (2002).
"Increased pulmonary prostacyclin synthesis in rats with chronic hypoxic pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **55**(1): 171-7.
- Boring, L., J. Gosling, et al. (1998).
"Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis." Nature **394**(6696): 894-7.
- Broxmeyer, H. E., B. Sherry, et al. (1991).
"Macrophage inflammatory protein (MIP)-1 beta abrogates the capacity of MIP-1 alpha to suppress myeloid progenitor cell growth." J Immunol **147**(8): 2586-94.
- Bucala, R., L. Spiegel, et al. (1994).
"Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." Mol Med **1**(1): 71-81.
- Bucala, R., L. A. Spiegel, et al. (1994).
"Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair." Mol Med **1**(1): 71-81.
- Buczek-Thomas, J. A., E. C. Lucey, et al. (2004). "Elastase mediates the release of growth factors from lung in vivo." Am J Respir Cell Mol Biol **31**(3): 344-50.
- Budhiraja, R., R. M. Tuder, et al. (2004).
"Endothelial dysfunction in pulmonary hypertension." Circulation **109**(2): 159-65.
- Burnham, E. L., W. R. Taylor, et al. (2005). "Increased circulating endothelial progenitor cells are associated with survival in acute lung injury." Am J Respir Crit Care Med **172**(7): 854-60.
- Burns, J. M., B. C. Summers, et al. (2006). "A novel chemokine

- receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* **203**(9): 2201-13.
- Busillo, J. M., S. Armando, et al. (2010). "Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling." *J Biol Chem* **285**(10): 7805-17.
- Campagnolo, P., M. M. Wong, et al. (2010). "Progenitor Cells in Arteriosclerosis: Good or Bad Guys?" *Antioxid Redox Signal*.
- Campbell, G. and J. Campbell (1990). "Macrophage influence on smooth muscle phenotype in atherogenesis." *Adv Exp Med Biol*. **273**:147-59.
- Caplan, A. I. (1994). "The mesengenic process." *Clin Plast Surg* **21**(3): 429-35.
- Caplan, A. I. and J. E. Dennis (2006). "Mesenchymal stem cells as trophic mediators." *J Cell Biochem* **98**(5): 1076-84.
- Carpenter, M., E. Rosler, et al. (2003). "Characterization and differentiation of human embryonic stem cells." *Cloning Stem Cells* **5**(1): 79-88.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* **10**(8): 858-64.
- Chaouat, A., E. Weitzenblum, et al. (1996). "The role of thrombosis in severe pulmonary hypertension." *Eur Respir J* **9**(2): 356-63.
- Chaudhary, P. M., E. B. Mechetner, et al. (1992). "Expression and activity of the multidrug resistance P-glycoprotein in human peripheral blood lymphocytes." *Blood* **80**(11): 2735-9.
- Chen, L. B., X. B. Jiang, et al. (2004). "Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells." *World J Gastroenterol* **10**(20): 3016-20.
- Chen, M. H., R. Kerkela, et al. (2008). "Mechanisms of cardiac dysfunction associated with tyrosine kinase inhibitor cancer therapeutics." *Circulation* **118**(1): 84-95.

- Chizzolini, C., E. Raschi, et al. (2002). "Autoantibodies to fibroblasts induce a proadhesive and proinflammatory fibroblast phenotype in patients with systemic sclerosis." Arthritis Rheum **46**(6): 1602-13.
- Choe, H., M. Farzan, et al. (1996). "The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates." Cell **85**(7): 1135-48.
- Choi, Y., M. Ta, et al. (2004). "Adult pancreas generates multipotent stem cells and pancreatic and nonpancreatic progeny." Stem Cells **22**(6): 1070-84.
- Christman, B. W., C. D. McPherson, et al. (1992). "An imbalance between the excretion of thromboxane and prostacyclin metabolites in pulmonary hypertension." N Engl J Med **327**(2): 70-5.
- Civin, C. I. and S. D. Gore (1993). "Antigenic analysis of hematopoiesis: a review." J Hematother **2**(2): 137-44.
- Clavel, C. and C. M. Verfaillie (2008). "Bone-marrow-derived cells and heart repair." Curr Opin Organ Transplant **13**(1): 36-43.
- Combadiere, C., K. Salzwedel, et al. (1998). "Identification of CX₃CR₁. A chemotactic receptor for the human CX₃C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1." J Biol Chem **273**(37): 23799-804.
- Comerford, I. and R. J. Nibbs (2005). "Post-translational control of chemokines: a role for decoy receptors?" Immunol Lett **96**(2): 163-74.
- Crossno, J. T., Jr., C. V. Garat, et al. (2007). "Rosiglitazone attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **292**(4): L885-97.
- D'Amour, K., A. Bang, et al. (2006). "Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells." Nat Biotechnol **24**(11): 1392-401.
- Dahal, B. K., T. Cornitescu, et al. (2011). "Role of epidermal growth factor inhibition in experimental pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **181**(2): 158-67.
- Davie, N. J., J. T. Crossno, Jr., et al. (2004). "Hypoxia-induced

- pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **286**(4): L668-78.
- Davies, R. J. and N. W. Morrell (2008). "Molecular mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of mutations in the bone morphogenetic protein type II receptor." Chest **134**(6): 1271-7.
- Deng, H., R. Liu, et al. (1996). "Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1." Nature **381**(6584): 661-6.
- Di Nicola, M., C. Carlo-Stella, et al. (2002). "Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli." Blood **99**(10): 3838-43.
- Diller, G. P., S. van Eijl, et al. (2008). "Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **117**(23): 3020-30.
- Dimmeler, S., A. Aicher, et al. (2001). "HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway." J Clin Invest **108**(3): 391-7.
- Dimmeler, S. and A. M. Zeiher (2009). "Cell therapy of acute myocardial infarction: open questions." Cardiology **113**(3): 155-60.
- Dorai, H. and T. K. Sampath (2001). "Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture." J Bone Joint Surg Am **83-A Suppl 1**(Pt 1): S70-8.
- Dorfmueller, P., V. Zarka, et al. (2002). "Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **165**(4): 534-9.
- Dragic, T., V. Litwin, et al. (1996). "HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5." Nature **381**(6584): 667-73.
- Eaves, C. J., J. D. Cashman, et al. (1993). "Unresponsiveness of primitive chronic myeloid leukemia cells to macrophage inflammatory protein 1 alpha, an inhibitor of primitive normal hematopoietic

- cells." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 12015-9.
- Ebisawa, T., K. Tada, et al. (1999).
"Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation." J Cell Sci **112** (Pt **20**): 3519-27.
- Eddahibi, S., V. Fabre, et al. (1999).
"Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin." Circ Res **84**(3): 329-36.
- Eglitis, M. A. and E. Mezey (1997).
"Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(8): 4080-5.
- Eickelberg, O. and R. E. Morty (2007).
"Transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein signaling in pulmonary arterial hypertension: remodeling revisited." Trends Cardiovasc Med **17**(8): 263-9.
- Ergun, S., D. Tilki, et al. "Vascular Wall as a Reservoir for Different Types of Stem and Progenitor Cells." Antioxid Redox Signal.
- Fadini, G. P., C. Agostini, et al. (2009).
"Autologous stem cell therapy for peripheral arterial disease meta-analysis and systematic review of the literature." Atherosclerosis **209**(1): 10-7.
- Fadini, G. P., C. Agostini, et al. (2007).
"Endothelial progenitor cells in the natural history of atherosclerosis." Atherosclerosis **194**(1): 46-54.
- Fadini, G. P., A. Avogaro, et al.
"Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications." Eur Respir J **35**(2): 418-25.
- Fadini, G. P., A. Avogaro, et al. (2010).
"Endothelial progenitors in pulmonary hypertension: new pathophysiology and therapeutic implications." Eur Respir J **35**(2): 418-25.
- Fadini, G. P., M. Schiavon, et al. (2007).
"Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **176**(7): 724-5; author reply 725.

- Falcetti, E., S. M. Hall, et al. (2010). "Smooth muscle proliferation and role of the prostacyclin (IP) receptor in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **182**(9): 1161-70.
- Fantozzi, I., W. Huang, et al. (2005). "Divergent effects of BMP-2 on gene expression in pulmonary artery smooth muscle cells from normal subjects and patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Exp Lung Res **31**(8): 783-806.
- Fartoukh, M., D. Emilie, et al. (1998). "Chemokine macrophage inflammatory protein-1alpha mRNA expression in lung biopsy specimens of primary pulmonary hypertension." Chest **114**(1 Suppl): 50S-51S.
- Feng, Y., C. C. Broder, et al. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science **272**(5263): 872-7.
- Ferrara, N. (2000). "Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis." Recent Prog Horm Res **55**: 15-35; discussion 35-6.
- Firth, A. L., W. Yao, et al. (2010). "Multipotent mesenchymal progenitor cells are present in endarterectomized tissues from patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Am J Physiol Cell Physiol **298**(5): C1217-25.
- Flomenberg, N., S. M. Devine, et al. (2005). "The use of AMD3100 plus G-CSF for autologous hematopoietic progenitor cell mobilization is superior to G-CSF alone." Blood **106**(5): 1867-74.
- Folkman, J. (1995). "Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis." N Engl J Med **333**(26): 1757-63.
- Foresta, C., L. De Toni, et al. (2009). "The PDE5 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression." J Sex Med **6**(2): 369-72.
- Frederick, M. J. and G. L. Clayman (2001). "Chemokines in cancer." Expert Rev Mol Med **3**(19): 1-18.

- Frid, M., M. Li, et al. (2009). "Sustained hypoxia leads to the emergence of cells with enhanced growth, migratory, and promitogenic potentials within the distal pulmonary artery wall." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1059-72.
- Frid, M. G., J. A. Brunetti, et al. (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling requires recruitment of circulating mesenchymal precursors of a monocyte/macrophage lineage." Am J Pathol **168**(2): 659-69.
- Frid, M. G., V. A. Kale, et al. (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." Circ Res **90**(11): 1189-96.
- Friedenstein, A. J., R. K. Chailakhjan, et al. (1970). "The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells." Cell Tissue Kinet **3**(4): 393-403.
- Friedenstein, A. J., S. Piatetzky, II, et al. (1966). "Osteogenesis in transplants of bone marrow cells." J Embryol Exp Morphol **16**(3): 381-90.
- Fukuda, T., T. Kamishima, et al. (1995). "Expression of the c-kit gene product in normal and neoplastic mast cells but not in neoplastic basophil/mast cell precursors from chronic myelogenous leukaemia." J Pathol **177**(2): 139-46.
- Fukushima, N. and H. Ohkawa (1995). "Hematopoietic stem cells and microenvironment: the proliferation and differentiation of stromal cells." Crit Rev Oncol Hematol **20**(3): 255-70.
- Galligan, C. L., K. A. Siminovitch, et al. "Fibrocyte activation in rheumatoid arthritis." Rheumatology (Oxford) **49**(4): 640-51.
- Ganju, R. K., S. A. Brubaker, et al. (1998). "The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways." J Biol Chem **273**(36): 23169-75.
- Garton, K. J., P. J. Gough, et al. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-

- converting enzyme (ADAM₁₇) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX₃CL₁)." J Biol Chem **276**(41): 37993-8001.
- Ghofrani, H. A., R. J. Barst, et al. (2009). "Future perspectives for the treatment of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S108-17.
- Giaid, A. and D. Saleh (1995). "Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **333**(4): 214-21.
- Giaid, A., M. Yanagisawa, et al. (1993). "Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension." N Engl J Med **328**(24): 1732-9.
- Gimble, J. M., A. J. Katz, et al. (2007). "Adipose-derived stem cells for regenerative medicine." Circ Res **100**(9): 1249-60.
- Gnecchi, M., Z. Zhang, et al. (2008). "Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy." Circ Res **103**(11): 1204-19.
- Gong, Z., G. Calkins, et al. (2009). "Influence of culture medium on smooth muscle cell differentiation from human bone marrow-derived mesenchymal stem cells." Tissue Eng Part A **15**(2): 319-30.
- Gortz, A., R. J. Nibbs, et al. (2002). "The chemokine ESkin/CCL27 displays novel modes of intracrine and paracrine function." J Immunol **169**(3): 1387-94.
- Gough, P. J., K. J. Garton, et al. (2004). "A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16." J Immunol **172**(6): 3678-85.
- Grant, M. B., W. S. May, et al. (2002). "Adult hematopoietic stem cells provide functional hemangioblast activity during retinal neovascularization." Nat Med **8**(6): 607-12.
- Greaves, D. R., T. Hakkinen, et al. (2001). "Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions."

- Arterioscler Thromb Vasc Biol
21(6): 923-9.
- Greenwald, J., J. Groppe, et al. (2003).
"The BMP7/ActRII extracellular
domain complex provides new
insights into the cooperative
nature of receptor assembly."
Mol Cell **11**(3): 605-17.
- Gronthos, S., M. Mankani, et al. (2000).
"Postnatal human dental pulp
stem cells (DPSCs) in vitro and
in vivo." Proc Natl Acad Sci U S
A **97**(25): 13625-30.
- Grover, W., McMurtry, Reeves (1983).
Pulmonary Circulation. Bethesda
MD, Am Physiol Soc.
- Gu, L., Y. Okada, et al. (1998). "Absence
of monocyte chemoattractant
protein-1 reduces atherosclerosis
in low density lipoprotein
receptor-deficient mice." Mol
Cell **2**(2): 275-81.
- Guan, K., J. Rohwedel, et al. (1999).
"Embryonic stem cell
differentiation models:
cardiogenesis, myogenesis,
neurogenesis, epithelial and
vascular smooth muscle cell
differentiation in vitro."
Cytotechnology **30**(1-3): 211-26.
- Guignabert, C., M. Izikki, et al. (2006).
"Transgenic mice overexpressing
the 5-hydroxytryptamine
transporter gene in smooth
muscle develop pulmonary
hypertension." Circ Res **98**(10):
1323-30.
- Gussoni, E., Y. Soneoka, et al. (1999).
"Dystrophin expression in the
mdx mouse restored by stem cell
transplantation." Nature
401(6751): 390-4.
- Hall, P. and F. Watt (1989). "Stem cells:
the generation and maintenance
of cellular diversity."
Development **106**(4): 619-33.
- Hamada, H., M. Terai, et al. (1999).
"Increased expression of mast
cell chymase in the lungs of
patients with congenital heart
disease associated with early
pulmonary vascular disease." Am
J Respir Crit Care Med **160**(4):
1303-8.
- Hartlapp, I., R. Abe, et al. (2001).
"Fibrocytes induce an angiogenic
phenotype in cultured
endothelial cells and promote
angiogenesis in vivo." Faseb J
15(12): 2215-24.
- Haudek, S. B., Y. Xia, et al. (2006).
"Bone marrow-derived fibroblast
precursors mediate ischemic
cardiomyopathy in mice." Proc

- Natl Acad Sci U S A **103**(48): 18284-9.
- Hayashida, K., J. Fujita, et al. (2005). "Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension." Chest **127**(5): 1793-8.
- He, J., Y. Chen, et al. (1997). "CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia." Nature **385**(6617): 645-9.
- Heath, D. and M. Yacoub (1991). "Lung mast cells in plexogenic pulmonary arteriopathy." J Clin Pathol **44**(12): 1003-6.
- Heeschen, C., R. Lehmann, et al. (2004). "Profoundly reduced neovascularization capacity of bone marrow mononuclear cells derived from patients with chronic ischemic heart disease." Circulation **109**(13): 1615-22.
- Heinrich, M. C., C. D. Blanke, et al. (2002). "Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies." J Clin Oncol **20**(6): 1692-703.
- Heresi, G. A., M. AYTEKIN, et al. (2010). "CXC-chemokine ligand 10 in idiopathic pulmonary arterial hypertension: marker of improved survival." Lung **188**(3): 191-7.
- Herve, P., J. M. Launay, et al. (1995). "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension." Am J Med **99**(3): 249-54.
- Herzog, E. L. and R. Bucala "Fibrocytes in health and disease." Exp Hematol **38**(7): 548-56.
- Hesselgesser, J. and R. Horuk (1999). "Chemokine and chemokine receptor expression in the central nervous system." J Neurovirol **5**(1): 13-26.
- Hill, J. M., G. Zalos, et al. (2003). "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." N Engl J Med **348**(7): 593-600.
- Hinz, B., S. H. Phan, et al. (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." Am J Pathol **170**(6): 1807-16.
- Hirose, S., Y. Hosoda, et al. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor and its

- receptors correlates closely with formation of the plexiform lesion in human pulmonary hypertension." Pathol Int **50**(6): 472-9.
- Hislop, A. and L. Reid (1976). "New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension." Br J Exp Pathol **57**(5): 542-54.
- Hogg, N. and B. Leitinger (2001). "Shape and shift changes related to the function of leukocyte integrins LFA-1 and Mac-1." J Leukoc Biol **69**(6): 893-8.
- Hoogewerf, A. J., G. S. Kuschert, et al. (1997). "Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines." Biochemistry **36**(44): 13570-8.
- Hopkins, N. and P. McLoughlin (2002). "The structural basis of pulmonary hypertension in chronic lung disease: remodelling, rarefaction or angiogenesis?" J Anat **201**(4): 335-48.
- Horuk, R., C. E. Chitnis, et al. (1993). "A receptor for the malarial parasite *Plasmodium vivax*: the erythrocyte chemokine receptor." Science **261**(5125): 1182-4.
- Hristov, M., A. Zerneck, et al. (2007). "Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury." Circ Res **100**(4): 590-7.
- Hu, Y., F. Davison, et al. (2003). "Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells." Circulation **108**(25): 3122-7.
- Huertas, A., U. Testa, et al. (2010). "Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI." Respir Physiol Neurobiol **170**(1): 23-31.
- Humbert, M., G. Monti, et al. (1998). "Platelet-derived growth factor expression in primary pulmonary hypertension: comparison of HIV seropositive and HIV seronegative patients." Eur Respir J **11**(3): 554-9.
- Ianus, A., G. G. Holz, et al. (2003). "In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine

- cells from bone marrow without evidence of cell fusion." J Clin Invest **111**(6): 843-50.
- Imasawa, T., Y. Utsunomiya, et al. (2001). "The potential of bone marrow-derived cells to differentiate to glomerular mesangial cells." J Am Soc Nephrol **12**(7): 1401-9.
- Inoue, Y., T. E. King, Jr., et al. (2002). "Basic fibroblast growth factor and its receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and lymphangiomyomatosis." Am J Respir Crit Care Med **166**(5): 765-73.
- Ishii, K., Y. Yoshida, et al. (2008). "Hepatic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by tetracycline-regulated hepatocyte nuclear factor 3beta." Hepatology **48**(2): 597-606.
- Issafras, H., S. Angers, et al. (2002). "Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors." J Biol Chem **277**(38): 34666-73.
- Izikki, M., C. Guignabert, et al. (2009). "Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents." J Clin Invest **119**(3): 512-23.
- Janicki, J. S., G. L. Brower, et al. (2006). "Cardiac mast cell regulation of matrix metalloproteinase-related ventricular remodeling in chronic pressure or volume overload." Cardiovasc Res **69**(3): 657-65.
- Jeong, J. A., S. H. Hong, et al. (2005). "Differential gene expression profiling of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells by DNA microarray." Stem Cells **23**(4): 584-93.
- Ji, T. H., M. Grossmann, et al. (1998). "G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions." J Biol Chem **273**(28): 17299-302.
- Jones, P. L., K. N. Cowan, et al. (1997). "Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease." Am J Pathol **150**(4): 1349-60.
- Joost, P. and A. Methner (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled

- receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." Genome Biol **3**(11): RESEARCH0063.
- Junhui, Z., W. Xingxiang, et al. (2008). "Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Respir Med **102**(7): 1073-9.
- Kalatskaya, I., Y. A. Berchiche, et al. (2009). "AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties." Mol Pharmacol **75**(5): 1240-7.
- Kale, S., A. Karihaloo, et al. (2003). "Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule." J Clin Invest **112**(1): 42-9.
- Kaplan, R. N., R. D. Riba, et al. (2005). "VEGFR₁-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche." Nature **438**(7069): 820-7.
- Karmochkine, M., P. Cacoub, et al. (1996). "High prevalence of antiphospholipid antibodies in precapillary pulmonary hypertension." J Rheumatol **23**(2): 286-90.
- Keegan, A., I. Morecroft, et al. (2001). "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 **89**(12): 1231-9.
- Keeley, E. C., B. Mehrad, et al. (2010). "Fibrocytes: bringing new insights into mechanisms of inflammation and fibrosis." Int J Biochem Cell Biol **42**(4): 535-42.
- Kelner, G. S., J. Kennedy, et al. (1994). "Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine." Science **266**(5189): 1395-9.
- Kerkela, R., L. Grazette, et al. (2006). "Cardiotoxicity of the cancer therapeutic agent imatinib mesylate." Nat Med **12**(8): 908-16.
- Khakoo, A. Y. and T. Finkel (2005). "Endothelial progenitor cells." Annu Rev Med **56**: 79-101.
- Khoo, M. L., B. Shen, et al. (2008). "Long-term serial passage and neuronal differentiation

- capability of human bone marrow mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(5): 883-96.
- Kinnaird, T., E. Stabile, et al. (2004). "Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms." Circulation **109**(12): 1543-9.
- Klein, M., R. T. Schermuly, et al. (2008). "Combined tyrosine and serine/threonine kinase inhibition by sorafenib prevents progression of experimental pulmonary hypertension and myocardial remodeling." Circulation **118**(20): 2081-90.
- Klemke, R. L., S. Cai, et al. (1997). "Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase." J Cell Biol **137**(2): 481-92.
- Knaus, P. and W. Sebald (2001). "Cooperativity of binding epitopes and receptor chains in the BMP/TGFbeta superfamily." Biol Chem **382**(8): 1189-95.
- Koch, A. E., P. J. Polverini, et al. (1992). "Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis." Science **258**(5089): 1798-801.
- Kopen, G., D. Prockop, et al. (1999). "Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(19): 10711-6.
- Krause, D. S., N. D. Theise, et al. (2001). "Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell." Cell **105**(3): 369-77.
- Kryczek, I., A. Lange, et al. (2005). "CXCL12 and vascular endothelial growth factor synergistically induce neoangiogenesis in human ovarian cancers." Cancer Res **65**(2): 465-72.
- Kuznetsov, S., A. Friedenstein, et al. (1997). "Factors required for bone marrow stromal fibroblast colony formation in vitro." Br J Haematol **97**(3): 561-70.
- Ladoux, A. and C. Frelin (2000). "Coordinated Up-regulation by hypoxia of adrenomedullin and one of its putative receptors (RDC-1) in cells of the rat blood-brain barrier." J Biol Chem **275**(51): 39914-9.

- Lagasse, E., H. Connors, et al. (2000). "Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo." Nat Med **6**(11): 1229-34.
- Lagna, G., M. M. Ku, et al. (2007). "Control of phenotypic plasticity of smooth muscle cells by bone morphogenetic protein signaling through the myocardin-related transcription factors." J Biol Chem **282**(51): 37244-55.
- Lama, V. N., L. Smith, et al. (2007). "Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts." J Clin Invest **117**(4): 989-96.
- Lansdorp, P. (1995). "Developmental changes in the function of hematopoietic stem cells." Exp Hematol **23**(3): 187-91.
- Launay, J. M., P. Herve, et al. (2002). "Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension." Nat Med **8**(10): 1129-35.
- Lee, O. K., T. K. Kuo, et al. (2004). "Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood." Blood **103**(5): 1669-75.
- Lee, S. D., K. R. Shroyer, et al. (1998). "Monoclonal endothelial cell proliferation is present in primary but not secondary pulmonary hypertension." J Clin Invest **101**(5): 927-34.
- Levenberg, S., J. Zoldan, et al. (2007). "Endothelial potential of human embryonic stem cells." Blood **110**(3): 806-14.
- Li, C. L. and G. R. Johnson (1992). "Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin-, Sca-1+ hemopoietic stem cells." J Exp Med **175**(6): 1443-7.
- Li, H., S. J. Chen, et al. (1994). "Enhanced endothelin-1 and endothelin receptor gene expression in chronic hypoxia." J Appl Physiol **77**(3): 1451-9.
- Li, M. T., J. Ai, et al. (2010). "Prevalence of anti-endothelial cell antibodies in patients with pulmonary arterial hypertension associated with connective tissue diseases." Chin Med Sci J **25**(1): 27-31.
- Li, X., X. Yu, et al. (2007). "Bone marrow mesenchymal stem cells differentiate into functional cardiac phenotypes by cardiac

- microenvironment." J Mol Cell Cardiol **42**(2): 295-303.
- Liang, O. D., S. A. Mitsialis, et al. (2010). "Mesenchymal Stromal Cells Expressing Heme Oxygenase-1 Reverse Pulmonary Hypertension." Stem Cells.
- Ling, L., Z. Wu, et al. (2010). Activation stem cell factor/c-kit signalling pathway in pulmonary fibrosis., Am J Respir Crit Care Med **181**: A3536.
- Lipinski, M. J., G. G. Biondi-Zoccai, et al. (2007). "Impact of intracoronary cell therapy on left ventricular function in the setting of acute myocardial infarction: a collaborative systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials." J Am Coll Cardiol **50**(18): 1761-7.
- Liu, C., K. A. Nath, et al. (2004). "Smooth muscle progenitor cells in vascular disease." Trends Cardiovasc Med **14**(7): 288-93.
- Loetscher, P., A. Pellegrino, et al. (2001). "The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3." J Biol Chem **276**(5): 2986-91.
- Long, L., M. R. MacLean, et al. (2006). "Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice." Circ Res **98**(6): 818-27.
- Lord, B. I., T. M. Dexter, et al. (1992). "Macrophage-inflammatory protein protects multipotent hematopoietic cells from the cytotoxic effects of hydroxyurea in vivo." Blood **79**(10): 2605-9.
- Lowell, S., P. Jones, et al. (2000). "Stimulation of human epidermal differentiation by delta-notch signalling at the boundaries of stem-cell clusters." Curr Biol **10**(9): 491-500.
- Lu, S., Q. Feng, et al. (2007). "Generation of functional hemangioblasts from human embryonic stem cells." Nat Methods **4**(6): 501-9.
- Luster, A. D. (1998). "Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation." N Engl J Med **338**(7): 436-45.
- Lyden, D., K. Hattori, et al. (2001). "Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells

- blocks tumor angiogenesis and growth." Nat Med 7(11): 1194-201.
- Machado, R. D., M. A. Aldred, et al. (2006). "Mutations of the TGF-beta type II receptor BMPR2 in pulmonary arterial hypertension." Hum Mutat 27(2): 121-32.
- Machado, R. D., O. Eickelberg, et al. (2009). "Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol 54(1 Suppl): S32-42.
- Macias-Silva, M., P. A. Hoodless, et al. (1998). "Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2." J Biol Chem 273(40): 25628-36.
- Maione, T. E., G. S. Gray, et al. (1990). "Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides." Science 247(4938): 77-9.
- Majka, S. M., M. Skokan, et al. (2008). "Evidence for cell fusion is absent in vascular lesions associated with pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 295(6): L1028-39.
- Marcos, E., S. Adnot, et al. (2003). "Serotonin transporter inhibitors protect against hypoxic pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med 168(4): 487-93.
- Mareschi, K., M. Novara, et al. (2006). "Neural differentiation of human mesenchymal stem cells: Evidence for expression of neural markers and eag K+ channel types." Exp Hematol 34(11): 1563-72.
- Marsboom, G., P. Pokreisz, et al. (2008). "Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension." Stem Cells 26(4): 1017-26.
- Martin, G. (1981). "Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A 78(12): 7634-8.
- Masri, F. A., W. Xu, et al. (2007). "Hyperproliferative apoptosis-resistant endothelial cells in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 293(3): L548-54.

- Massague, J., J. Seoane, et al. (2005). "Smad transcription factors." Genes Dev **19**(23): 2783-810.
- Masuya, M., C. J. Drake, et al. (2003). "Hematopoietic origin of glomerular mesangial cells." Blood **101**(6): 2215-8.
- Maxova, H., M. Vasilkova, et al. (2010). "Prevention of Mast Cell Degranulation by Disodium Cromoglycate Delayed the Regression of Hypoxic Pulmonary Hypertension in Rats." Respiration.
- Mazhari, R. and J. M. Hare (2007). "Mechanisms of action of mesenchymal stem cells in cardiac repair: potential influences on the cardiac stem cell niche." Nat Clin Pract Cardiovasc Med **4 Suppl 1**: S21-6.
- Mazzeinghi, B., E. Ronconi, et al. (2008). "Essential but differential role for CXCR4 and CXCR7 in the therapeutic homing of human renal progenitor cells." J Exp Med **205**(2): 479-90.
- McCulloch, E. A. and J. E. Till (1960). "The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice." Radiat Res **13**: 115-25.
- McDermott, D. H., Q. Yang, et al. (2005). "CCL2 polymorphisms are associated with serum monocyte chemoattractant protein-1 levels and myocardial infarction in the Framingham Heart Study." Circulation **112**(8): 1113-20.
- McKay, R. (1997). "Stem cells in the central nervous system." Science **276**(5309): 66-71.
- McLaren, A. (2001). "Ethical and social considerations of stem cell research." Nature **414**(6859): 129-31.
- Medbury, H. J., S. L. Tarran, et al. (2008). "Monocytes contribute to the atherosclerotic cap by transformation into fibrocytes." Int Angiol **27**(2): 114-23.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (1999). "Chemokine control of HIV-1 infection." Nature **400**(6746): 723-4.
- Mellado, M., J. M. Rodriguez-Frade, et al. (2001). "Chemokine receptor homo- or heterodimerization activates distinct signaling pathways." Embo J **20**(10): 2497-507.

- Merklinger, S. L., P. L. Jones, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor blockade mediates smooth muscle cell apoptosis and improves survival in rats with pulmonary hypertension." Circulation **112**(3): 423-31.
- Metz, M., M. A. Grimbaldston, et al. (2007). "Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation." Immunol Rev **217**: 304-28.
- Meyrick, B. and L. Reid (1980). "Ultrastructural findings in lung biopsy material from children with congenital heart defects." Am J Pathol **101**(3): 527-42.
- Mitani, Y., M. Ueda, et al. (1999). "Mast cell chymase in pulmonary hypertension." Thorax **54**(1): 88-90.
- Montani, D., R. Souza, et al. (2007). "Endothelin-1/endothelin-3 ratio: a potential prognostic factor of pulmonary arterial hypertension." Chest **131**(1): 101-8.
- Montecarlo, F. S., H. Arai, et al. (1997). "Molecular approaches to identifying ligand binding and signaling domains of C-C chemokine receptors." Methods Enzymol **288**: 70-84.
- Moore, K. A. (2004). "Recent advances in defining the hematopoietic stem cell niche." Curr Opin Hematol **11**(2): 107-11.
- Morrell, N. W. (2006). "Pulmonary hypertension due to BMPR2 mutation: a new paradigm for tissue remodeling?" Proc Am Thorac Soc **3**(8): 680-6.
- Moulton, K. S., K. Vakili, et al. (2003). "Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4736-41.
- Mouthon, L., L. Guillevin, et al. (2005). "Pulmonary arterial hypertension: an autoimmune disease?" Eur Respir J **26**(6): 986-8.
- Mueller, S. G., J. R. White, et al. (1997). "Ligand-induced desensitization of the human CXC chemokine receptor-2 is modulated by multiple serine residues in the carboxyl-terminal domain of the receptor." J Biol Chem **272**(13): 8207-14.
- Muller, A., B. Homey, et al. (2001). "Involvement of chemokine receptors in breast cancer

- metastasis." Nature **410**(6824): 50-6.
- Murasawa, S. and T. Asahara (2005). "Endothelial progenitor cells for vasculogenesis." Physiology (Bethesda) **20**: 36-42.
- Murphy, M., K. Reid, et al. (1997). "Neural stem cells." J Investig Dermatol Symp Proc **2**(1): 8-13.
- Murphy, M., K. Reid, et al. (1997). "Neural stem cells." J Investig Dermatol Symp Proc **2**(1): 8-13.
- Nagasawa, T., S. Hirota, et al. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature **382**(6592): 635-8.
- Nagaya, N., K. Kangawa, et al. (2005). "Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy." Circulation **112**(8): 1128-35.
- Nagaya, N., K. Kangawa, et al. (2003). "Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells." Circulation **108**(7): 889-95.
- Nakagawa, N., S. Osanai, et al. (2003). "Severe pulmonary hypertension associated with primary Sjogren's syndrome." Intern Med **42**(12): 1248-52.
- Nakamura, K., S. Akagi, et al. (2011). "Pro-apoptotic effects of imatinib on PDGF-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension." Int J Cardiol.
- Neote, K., D. DiGregorio, et al. (1993). "Molecular cloning, functional expression, and signaling characteristics of a C-C chemokine receptor." Cell **72**(3): 415-25.
- Nicaud, V., O. Poirier, et al. (1999). "Polymorphisms of the endothelin-A and -B receptor genes in relation to blood pressure and myocardial infarction: the Etude Cas-Temoins sur l'Infarctus du Myocarde (ECTIM) Study." Am J Hypertens **12**(3): 304-10.
- Nicolls, M. R., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2005). "Autoimmunity and pulmonary hypertension: a perspective." Eur Respir J **26**(6): 1110-8.

- Nikam, V. S., R. T. Schermuly, et al. (2010). "Treprostinil inhibits the recruitment of bone marrow-derived circulating fibrocytes in chronic hypoxic pulmonary hypertension." Eur Respir J **36**(6): 1302-14.
- Nohe, A., S. Hassel, et al. (2002). "The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways." J Biol Chem **277**(7): 5330-8.
- Nury, D., T. Neri, et al. (2009). "Human embryonic stem cells and cardiac cell fate." J Cell Physiol **218**(3): 455-9.
- O'Donoghue, K. and N. Fisk (2004). "Fetal stem cells." Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol **18**(6): 853-75.
- Ogawa, M., Y. Matsuzaki, et al. (1991). "Expression and function of c-kit in hemopoietic progenitor cells." J Exp Med **174**(1): 63-71.
- Ogilvie, P., G. Bardi, et al. (2001). "Eotaxin is a natural antagonist for CCR2 and an agonist for CCR5." Blood **97**(7): 1920-4.
- Oh, H., S. B. Bradfute, et al. (2003). "Cardiac progenitor cells from adult myocardium: homing, differentiation, and fusion after infarction." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(21): 12313-8.
- Ohnishi, S., H. Sumiyoshi, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells attenuate cardiac fibroblast proliferation and collagen synthesis through paracrine actions." FEBS Lett **581**(21): 3961-6.
- Okayama, Y., C. Ra, et al. (2007). "Role of mast cells in airway remodeling." Curr Opin Immunol **19**(6): 687-93.
- Onuffer, J. J. and R. Horuk (2002). "Chemokines, chemokine receptors and small-molecule antagonists: recent developments." Trends Pharmacol Sci **23**(10): 459-67.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2003). "Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium." Pediatr Transplant **7 Suppl 3**: 86-8.
- Orlic, D., J. Kajstura, et al. (2001). "Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(18): 10344-9.

- Owen, M. (1988). "Marrow stromal stem cells." J Cell Sci Suppl **10**: 63-76.
- Owens, G. K., M. S. Kumar, et al. (2004). "Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease." Physiol Rev **84**(3): 767-801.
- Palczewski, K., T. Kumasaka, et al. (2000). "Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor." Science **289**(5480): 739-45.
- Paolini, J. F., D. Willard, et al. (1994). "The chemokines IL-8, monocyte chemoattractant protein-1, and I-309 are monomers at physiologically relevant concentrations." J Immunol **153**(6): 2704-17.
- Partovian, C., S. Adnot, et al. (2000). "Adenovirus-mediated lung vascular endothelial growth factor overexpression protects against hypoxic pulmonary hypertension in rats." Am J Respir Cell Mol Biol **23**(6): 762-71.
- Patel, K. M., P. Crisostomo, et al. (2007). "Mesenchymal stem cells attenuate hypoxic pulmonary vasoconstriction by a paracrine mechanism." J Surg Res **143**(2): 281-5.
- Paterlini, M. G. (2002). "Structure modeling of the chemokine receptor CCR5: implications for ligand binding and selectivity." Biophys J **83**(6): 3012-31.
- Pattison, J. M., P. J. Nelson, et al. (1996). "RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis." J Heart Lung Transplant **15**(12): 1194-9.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, et al. (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-8.
- Peinado, V. I., J. Ramirez, et al. (2006). "Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease." Am J Respir Cell Mol Biol **34**(3): 257-63.
- Perros, F., P. Dorfmueller, et al. (2007). "Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension." Eur Respir J **29**(5): 937-43.

- Perros, F., D. Montani, et al. (2008). "Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **178**(1): 81-8.
- Petersen, B., W. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.
- Petersen, B. E., W. C. Bowen, et al. (1999). "Bone marrow as a potential source of hepatic oval cells." Science **284**(5417): 1168-70.
- Phillips, R. J., M. D. Burdick, et al. (2004). "Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis." J Clin Invest **114**(3): 438-46.
- Pilling, D., C. D. Buckley, et al. (2003). "Inhibition of fibrocyte differentiation by serum amyloid P." J Immunol **171**(10): 5537-46.
- Pittenger, M. F., A. M. Mackay, et al. (1999). "Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells." Science **284**(5411): 143-7.
- Placencio, V. R., X. Li, et al. (2010). "Bone marrow derived mesenchymal stem cells incorporate into the prostate during regrowth." PLoS One **5**(9): e12920.
- Potgens, A. J., H. R. Westphal, et al. (1995). "The role of vascular permeability factor and basic fibroblast growth factor in tumor angiogenesis." Biol Chem Hoppe Seyler **376**(2): 57-70.
- Prat-Vidal, C., S. Roura, et al. (2007). "Umbilical cord blood-derived stem cells spontaneously express cardiomyogenic traits." Transplant Proc **39**(7): 2434-7.
- Priller, J., D. A. Persons, et al. (2001). "Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo." J Cell Biol **155**(5): 733-8.
- Proudfoot, A. E., T. M. Handel, et al. (2003). "Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(4): 1885-90.
- Puc at, M. and A. Ballis (2007). "Embryonic stem cells: from bench to bedside." Clin Pharmacol Ther **82**(3): 337-9.
- Qing, X., J. Svaren, et al. (2001). "mRNA expression of novel CGRP1 receptors and their activity-

- modifying proteins in hypoxic rat lung." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **280**(3): L547-54.
- Quismorio, F. P., Jr., O. Sharma, et al. (1984). "Immunopathologic and clinical studies in pulmonary hypertension associated with systemic lupus erythematosus." Semin Arthritis Rheum **13**(4): 349-59.
- Rabinovitch, M., W. Gamble, et al. (1979). "Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features." Am J Physiol **236**(6): H818-27.
- Ramirez-Bergeron, D. L. and M. C. Simon (2001). "Hypoxia-inducible factor and the development of stem cells of the cardiovascular system." Stem Cells **19**(4): 279-86.
- Raoul, W., O. Wagner-Ballon, et al. (2007). "Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." Respir Res **8**: 8.
- Ray, P., N. Krishnamoorthy, et al. (2008). "Emerging functions of c-kit and its ligand stem cell factor in dendritic cells: regulators of T cell differentiation." Cell Cycle **7**(18): 2826-32.
- Reape, T. J., K. Rayner, et al. (1999). "Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques." Am J Pathol **154**(2): 365-74.
- Renaudineau, Y., C. Dugue, et al. (2002). "Antiendothelial cell antibodies in systemic lupus erythematosus." Autoimmun Rev **1**(6): 365-72.
- Rhodes, C. J., A. Davidson, et al. (2009). "Therapeutic targets in pulmonary arterial hypertension." Pharmacol Ther **121**(1): 69-88.
- Ribatti, D., F. Levi-Schaffer, et al. (2008). "Inflammatory angiogenesis in atherogenesis--a double-edged sword." Ann Med **40**(8): 606-21.
- Richmond, A. and H. G. Thomas (1988). "Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution." J Cell Biochem **36**(2): 185-98.
- Rodriguez-Frade, J. M., M. Mellado, et al. (2001). "Chemokine receptor

- dimerization: two are better than one." Trends Immunol **22**(11): 612-7.
- Rodriguez-Frade, J. M., A. J. Vila-Coro, et al. (1999). "The chemokine monocyte chemoattractant protein-1 induces functional responses through dimerization of its receptor CCR2." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(7): 3628-33.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood **90**(3): 909-28.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis - an inflammatory disease." N Engl J Med **340**:115-26
- Rossi, D. and A. Zlotnik (2000). "The biology of chemokines and their receptors." Annu Rev Immunol **18**: 217-42.
- Roy, N., C. Cleren, et al. (2006). "Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes." Nat Med **12**(11): 1259-68.
- Rubens, C., R. Ewert, et al. (2001). "Big endothelin-1 and endothelin-1 plasma levels are correlated with the severity of primary pulmonary hypertension." Chest **120**(5): 1562-9.
- Rubin, L. J. (1997). "Primary pulmonary hypertension." N Engl J Med **336**(2): 111-7.
- Rucker, J., A. L. Edinger, et al. (1997). "Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses." J Virol **71**(12): 8999-9007.
- Rudarakanchana, N., J. A. Flanagan, et al. (2002). "Functional analysis of bone morphogenetic protein type II receptor mutations underlying primary pulmonary hypertension." Hum Mol Genet **11**(13): 1517-25.
- Sabatini, F., L. Petecchia, et al. (2005). "Human bronchial fibroblasts exhibit a mesenchymal stem cell phenotype and multilineage differentiating potentialities." Lab Invest **85**(8): 962-71.
- Sadat, S., S. Gehmert, et al. (2007). "The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF." Biochem Biophys Res Commun **363**(3): 674-9.

- Sagrinati, C., G. S. Netti, et al. (2006). "Isolation and characterization of multipotent progenitor cells from the Bowman's capsule of adult human kidneys." J Am Soc Nephrol **17**(9): 2443-56.
- Sakao, S., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2007). "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 **21**(13): 3640-52.
- Sakao, S., L. Taraseviciene-Stewart, et al. (2005). "Initial apoptosis is followed by increased proliferation of apoptosis-resistant endothelial cells." Faseb J **19**(9): 1178-80.
- Sakao, S., K. Tatsumi, et al. (2009). "Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation." Respir Res **10**: 95.
- Sallusto, F., D. Lenig, et al. (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-12.
- Samson, M., F. Libert, et al. (1996). "Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene." Nature **382**(6593): 722-5.
- Sanchez, O., E. Marcos, et al. (2007). "Role of endothelium-derived CC chemokine ligand 2 in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **176**(10): 1041-7.
- Sata, M. (2006). "Role of circulating vascular progenitors in angiogenesis, vascular healing, and pulmonary hypertension: lessons from animal models." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(5): 1008-14.
- Sata, M., A. Saiura, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis." Nat Med **8**(4): 403-9.
- Sato, K., M. Oka, et al. (1995). "Effects of separate and combined ETA and ETB blockade on ET-1-induced constriction in perfused rat lungs." Am J Physiol **269**(5 Pt 1): L668-72.

- Satoh, K., Y. Fukumoto, et al. (2009). "Statin ameliorates hypoxia-induced pulmonary hypertension associated with down-regulated stromal cell-derived factor-1." Cardiovasc Res **81**(1): 226-34.
- Satoh, K., Y. Kagaya, et al. (2006). "Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice." Circulation **113**(11): 1442-50.
- Schermuly, R. T., E. Dony, et al. (2005). "Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition." J Clin Invest **115**(10): 2811-21.
- Schinkothe, T., W. Bloch, et al. (2008). "In vitro secreting profile of human mesenchymal stem cells." Stem Cells Dev **17**(1): 199-206.
- Schioppa, T., B. Uranchimeg, et al. (2003). "Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia." J Exp Med **198**(9): 1391-402.
- Schluger, N. W. and W. N. Rom (1997). "Early responses to infection: chemokines as mediators of inflammation." Curr Opin Immunol **9**(4): 504-8.
- Schmidt-Lucke, C., L. Rossig, et al. (2005). "Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair." Circulation **111**(22): 2981-7.
- Schmidt, M., G. Sun, et al. (2003). "Identification of circulating fibrocytes as precursors of bronchial myofibroblasts in asthma." J Immunol **171**(1): 380-9.
- Sebkhii, A., J. W. Strange, et al. (2003). "Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circulation **107**(25): 3230-5.
- Sengenès, C., K. Lolmede, et al. (2005). "Preadipocytes in the human subcutaneous adipose tissue display distinct features from the adult mesenchymal and hematopoietic stem cells." J Cell Physiol **205**(1): 114-22.
- Serakinci, N. and W. Keith (2006). "Therapeutic potential of adult

- stem cells." Eur J Cancer **42**(9): 1243-6.
- Shake, J. G., P. J. Gruber, et al. (2002). "Mesenchymal stem cell implantation in a swine myocardial infarct model: engraftment and functional effects." Ann Thorac Surg **73**(6): 1919-25; discussion 1926.
- Shi, Q., S. Rafii, et al. (1998). "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." Blood **92**(2): 362-7.
- Shu, S. N., L. Wei, et al. (2004). "Hepatic differentiation capability of rat bone marrow-derived mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells." World J Gastroenterol **10**(19): 2818-22.
- Siciliano, S. J., T. E. Rollins, et al. (1994). "Two-site binding of C5a by its receptor: an alternative binding paradigm for G protein-coupled receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(4): 1214-8.
- Sierro, F., C. Biben, et al. (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(37): 14759-64.
- Simonneau, G., I. M. Robbins, et al. (2009). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol **54**(1 Suppl): S43-54.
- Simper, D., P. G. Stalboerger, et al. (2002). "Smooth muscle progenitor cells in human blood." Circulation **106**(10): 1199-204.
- Sirker, A. A., Z. M. Astroukakis, et al. (2009). "Vascular progenitor cells and translational research: the role of endothelial and smooth muscle progenitor cells in endogenous arterial remodelling in the adult." Clin Sci (Lond) **116**(4): 283-99.
- Sitbon, O., M. Humbert, et al. (2005). "Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension." Circulation **111**(23): 3105-11.
- Smadja, D. M., P. Gaussem, et al. (2009). "Circulating endothelial cells: a new candidate biomarker of irreversible pulmonary hypertension secondary to

- congenital heart disease."
Circulation **119**(3): 374-81.
- Smadja, D. M., L. Mauge, et al. (2011).
"Treprostinil increases the number and angiogenic potential of endothelial progenitor cells in children with pulmonary hypertension."
Angiogenesis **14**(1): 17-27.
- Smadja, D. M., L. Mauge, et al. (2010).
"Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension." Eur Respir J **36**(6): 1284-93.
- Smith, A. G. (2006). A glossary for stem-cell biology. *Nature*. **441**: 1060.
- Smith, D. R., P. J. Polverini, et al. (1994).
"Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma." J Exp Med **179**(5): 1409-15.
- Smith, K., S. B. Fox, et al. (1999).
"Upregulation of basic fibroblast growth factor in breast carcinoma and its relationship to vascular density, oestrogen receptor, epidermal growth factor receptor and survival." Ann Oncol **10**(6): 707-13.
- Soma, S., H. Takahashi, et al. (1999).
"Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats." Am J Respir Cell Mol Biol **20**(4): 620-30.
- Souza, R., O. Sitbon, et al. (2006). "Long term imatinib treatment in pulmonary arterial hypertension." Thorax **61**(8): 736.
- Spangrude, G. J. and G. R. Johnson (1990). "Resting and activated subsets of mouse multipotent hematopoietic stem cells." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(19): 7433-7.
- Spees, J. L., M. J. Whitney, et al. (2008).
"Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension." Faseb J **22**(4): 1226-36.
- Stenmark, K. R., N. Davie, et al. (2006).
"Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling." Physiology (Bethesda) **21**: 134-45.
- Stenmark, K. R., B. Meyrick, et al. (2009). "Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure." Am J

- Physiol Lung Cell Mol Physiol **297**(6): L1013-32.
- Strieter, R. M., E. C. Keeley, et al. (2009). "The role of circulating mesenchymal progenitor cells (fibrocytes) in the pathogenesis of pulmonary fibrosis." J Leukoc Biol **86**(5): 1111-8.
- Strieter, R. M., P. J. Polverini, et al. (1995). "The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis." J Biol Chem **270**(45): 27348-57.
- Sugiyama, S., K. Kugiyama, et al. (2006). "Characterization of smooth muscle-like cells in circulating human peripheral blood." Atherosclerosis **187**(2): 351-62.
- Sun, X. and D. D. Ku (2008). "Rosuvastatin provides pleiotropic protection against pulmonary hypertension, right ventricular hypertrophy, and coronary endothelial dysfunction in rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol **294**(2): H801-9.
- Sutherland, H. J., P. M. Lansdorp, et al. (1990). "Functional characterization of individual human hematopoietic stem cells cultured at limiting dilution on supportive marrow stromal layers." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(9): 3584-8.
- Szabo, M. C., K. S. Soo, et al. (1995). "Chemokine class differences in binding to the Duffy antigen-erythrocyte chemokine receptor." J Biol Chem **270**(43): 25348-51.
- Szilvassy, S. J. (2003). "The biology of hematopoietic stem cells." Arch Med Res **34**(6): 446-60.
- Szilvassy, S. J. and R. Hoffman (1995). "Enriched hematopoietic stem cells: basic biology and clinical utility." Biol Blood Marrow Transplant **1**(1): 3-17.
- Tachibana, K., S. Hirota, et al. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature **393**(6685): 591-4.
- Tacke, F. and G. J. Randolph (2006). "Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets." Immunobiology **211**(6-8): 609-18.
- Takahashi, H., N. Goto, et al. (2006). "Downregulation of type II bone morphogenetic protein receptor in hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol

- Lung Cell Mol Physiol **290**(3): L450-8.
- Takahashi, T., C. Kalka, et al. (1999). "Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization." Nat Med **5**(4): 434-8.
- Tamby, M. C., Y. Chanseaud, et al. (2005). "Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension." Thorax **60**(9): 765-72.
- Tamby, M. C., M. Humbert, et al. (2006). "Antibodies to fibroblasts in idiopathic and scleroderma-associated pulmonary hypertension." Eur Respir J **28**(4): 799-807.
- Tanaka, K. and M. Sata (2008). "Contribution of circulating vascular progenitors in lesion formation and vascular healing: lessons from animal models." Curr Opin Lipidol **19**(5): 498-504.
- Tanaka, K., M. Sata, et al. (2003). "Diverse contribution of bone marrow cells to neointimal hyperplasia after mechanical vascular injuries." Circ Res **93**(8): 783-90.
- Tang, J., Q. Xie, et al. (2006). "Mesenchymal stem cells participate in angiogenesis and improve heart function in rat model of myocardial ischemia with reperfusion." Eur J Cardiothorac Surg **30**(2): 353-61.
- Taraseviciene-Stewart, L., Y. Kasahara, et al. (2001). "Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension." Faseb J **15**(2): 427-38.
- Tasso, R. and G. Pennesi (2009). "When stem cells meet immunoregulation." Int Immunopharmacol **9**(5): 596-8.
- Teichert-Kuliszewska, K., M. J. Kutryk, et al. (2006). "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 **98**(2): 209-17.
- ten Dijke, P., H. Yamashita, et al. (1994). "Identification of type I

- receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4." J Biol Chem **269**(25): 16985-8.
- Thelen, M. and S. Thelen (2008). "CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio?" J Neuroimmunol **198**(1-2): 9-13.
- Thompson, K. and M. Rabinovitch (1996). "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 **166**(3): 495-505.
- Thomson, J., J. Itskovitz-Eldor, et al. (1998). "Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts." Science **282**(5391): 1145-7.
- Togel, F., Z. Hu, et al. (2005). "Administered mesenchymal stem cells protect against ischemic acute renal failure through differentiation-independent mechanisms." Am J Physiol Renal Physiol **289**(1): F31-42.
- Togel, F., K. Weiss, et al. (2007). "Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury." Am J Physiol Renal Physiol **292**(5): F1626-35.
- Toma, C., M. F. Pittenger, et al. (2002). "Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart." Circulation **105**(1): 93-8.
- Torsney, E. and Q. Xu (2011). "Resident vascular progenitor cells." J Mol Cell Cardiol **50**(2): 304-11.
- Toshner, M., R. Voswinckel, et al. (2009). "Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med **180**(8): 780-7.
- Tropepe, V., B. L. Coles, et al. (2000). "Retinal stem cells in the adult mammalian eye." Science **287**(5460): 2032-6.
- Tse, W. T., J. D. Pendleton, et al. (2003). "Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation." Transplantation **75**(3): 389-97.
- Tuder, R. M., M. Chacon, et al. (2001). "Expression of angiogenesis-related molecules in plexiform

- lesions in severe pulmonary hypertension: evidence for a process of disordered angiogenesis." J Pathol **195**(3): 367-74.
- Tuder, R. M., C. D. Cool, et al. (1999). "Prostacyclin synthase expression is decreased in lungs from patients with severe pulmonary hypertension." Am J Respir Crit Care Med **159**(6): 1925-32.
- Tyler, R. C., M. Muramatsu, et al. (1999). "Variable expression of endothelial NO synthase in three forms of rat pulmonary hypertension." Am J Physiol **276**(2 Pt 1): L297-303.
- Uchida, N., W. H. Fleming, et al. (1993). "Heterogeneity of hematopoietic stem cells." Curr Opin Immunol **5**(2): 177-84.
- Udomsakdi, C., C. J. Eaves, et al. (1991). "Separation of functionally distinct subpopulations of primitive human hematopoietic cells using rhodamine-123." Exp Hematol **19**(5): 338-42.
- Upton, P. D. and N. W. Morrell (2009). "TGF-beta and BMPR-II pharmacology--implications for pulmonary vascular diseases." Curr Opin Pharmacol **9**(3): 274-80.
- Urbich, C. and S. Dimmeler (2004). "Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology." Circ Res **95**(4): 343-53.
- Valdimarsdottir, G., M. J. Goumans, et al. (2002). "Stimulation of Id1 expression by bone morphogenetic protein is sufficient and necessary for bone morphogenetic protein-induced activation of endothelial cells." Circulation **106**(17): 2263-70.
- Van Dorp, A., M. Verhoeven, et al. (1999). "A modified culture system for epidermal cells for grafting purposes: an in vitro and in vivo study." Wound Repair Regen **7**(4): 214-25.
- Varcoe, R. L., M. Mikhail, et al. (2006). "The role of the fibrocyte in intimal hyperplasia." J Thromb Haemost **4**(5): 1125-33.
- Vassilopoulos, G., P. R. Wang, et al. (2003). "Transplanted bone marrow regenerates liver by cell fusion." Nature **422**(6934): 901-4.
- Venneri, M. A., M. De Palma, et al. (2007). "Identification of proangiogenic TIE2-expressing

- monocytes (TEMs) in human peripheral blood and cancer." Blood **109**(12): 5276-85.
- Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. (2005). "Atherosclerotic plaque progression and vulnerability to rupture: angiogenesis as a source of intraplaque hemorrhage." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(10): 2054-61.
- Wagers, A. J., R. I. Sherwood, et al. (2002). "Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells." Science **297**(5590): 2256-9.
- Walkup, M. H. and D. A. Gerber (2006). "Hepatic stem cells: in search of." Stem Cells **24**(8): 1833-40.
- Wang, J. F., H. Jiao, et al. (2007). "Fibrocytes from burn patients regulate the activities of fibroblasts." Wound Repair Regen **15**(1): 113-21.
- Wang, T., Z. Xu, et al. (2006). "Cell-to-cell contact induces mesenchymal stem cell to differentiate into cardiomyocyte and smooth muscle cell." Int J Cardiol **109**(1): 74-81.
- Wang, X., H. Willenbring, et al. (2003). "Cell fusion is the principal source of bone-marrow-derived hepatocytes." Nature **422**(6934): 897-901.
- Wanstall, J. C., A. Gambino, et al. (2002). "Vascular endothelial growth factor-B-deficient mice show impaired development of hypoxic pulmonary hypertension." Cardiovasc Res **55**(2): 361-8.
- Weir, E. K. and A. Olschewski (2006). "Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia." Cardiovasc Res **71**(4): 630-41.
- Weir, E. K., H. L. Reeve, et al. (1996). "Anorexic agents aminorex, fenfluramine, and dexfenfluramine inhibit potassium current in rat pulmonary vascular smooth muscle and cause pulmonary vasoconstriction." Circulation **94**(9): 2216-20.
- Weir, E. K., H. L. Reeve, et al. (1998). "Pulmonary vasoconstriction, oxygen sensing, and the role of ion channels: Thomas A. Neff lecture." Chest **114**(1 Suppl): 17S-22S.
- Welsh, C. H., K. L. Hassell, et al. (1996). "Coagulation and fibrinolytic

- profiles in patients with severe pulmonary hypertension." Chest **110**(3): 710-7.
- Westergren-Thorsson, G., K. Larsen, et al. "Pathological airway remodelling in inflammation." Clin Respir J **4 Suppl 1**: 1-8.
- Westerweel, P. E. and M. C. Verhaar (2008). "Directing myogenic mesenchymal stem cell differentiation." Circ Res **103**(6): 560-1.
- Wilcox, J. N., N. A. Nelken, et al. (1994). "Local expression of inflammatory cytokines in human atherosclerotic plaques." J Atheroscler Thromb **1 Suppl 1**: S10-3.
- Wright, N. (2000). "Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer." Int J Exp Pathol **81**(2): 117-43.
- Yamamoto, M., L. Cui, et al. (2006). "Branching ducts similar to mesonephric ducts or ureteric buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells." Am J Physiol Renal Physiol **290**(1): F52-60.
- Yamashita, H., P. ten Dijke, et al. (1995). "Osteogenic protein-1 binds to activin type II receptors and induces certain activin-like effects." J Cell Biol **130**(1): 217-26.
- Yang, X., L. Long, et al. (2005). "Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension." Circ Res **96**(10): 1053-63.
- Yao, W., A. L. Firth, et al. (2009). "Identification of putative endothelial progenitor cells (CD34+CD133+Flk-1+) in endarterectomized tissue of patients with chronic thromboembolic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **296**(6): L870-8.
- Ye, Z., Y. Wang, et al. (2008). "Immunosuppressive effects of rat mesenchymal stem cells: involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells." Hepatobiliary Pancreat Dis Int **7**(6): 608-14.
- Yeager, M. E., G. R. Halley, et al. (2001). "Microsatellite instability of endothelial cell growth and apoptosis genes within plexiform lesions in primary pulmonary

- hypertension." Circ Res **88**(1): E2-E11.
- Yoder, M. C. and D. A. Ingram (2009). "The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth: is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process?" Biochim Biophys Acta **1796**(1): 50-4.
- Yoo, S. W., S. S. Kim, et al. (2008). "Mesenchymal stem cells promote proliferation of endogenous neural stem cells and survival of newborn cells in a rat stroke model." Exp Mol Med **40**(4): 387-97.
- Yoshida, S., S. Shimmura, et al. (2006). "Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea." Stem Cells **24**(12): 2714-22.
- Young, K. C., E. Torres, et al. (2009). "Inhibition of the SDF-1/CXCR4 axis attenuates neonatal hypoxia-induced pulmonary hypertension." Circ Res **104**(11): 1293-301.
- Yuan, X. J., J. Wang, et al. (1998). "Attenuated K⁺ channel gene transcription in primary pulmonary hypertension." Lancet **351**(9104): 726-7.
- Zengin, E., F. Chalajour, et al. (2006). "Vascular wall resident progenitor cells: a source for postnatal vasculogenesis." Development **133**(8): 1543-51.
- Zerneck, A., A. Schober, et al. (2005). "SDF-1 α /CXCR4 axis is instrumental in neointimal hyperplasia and recruitment of smooth muscle progenitor cells." Circ Res **96**(7): 784-91.
- Zhang, S., I. Fantozzi, et al. (2003). "Bone morphogenetic proteins induce apoptosis in human pulmonary vascular smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **285**(3): L740-54.
- Zhao, Y. D., D. W. Courtman, et al. (2005). "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 **96**(4): 442-50.

Zhu, J. H., X. X. Wang, et al. (2008).

"Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study." Pediatr Transplant **12**(6): 650-5.

Zlotnik, A. and O. Yoshie (2000).

"Chemokines: a new classification system and their role in immunity." Immunity **12**(2): 121-7.

Zoffmann, S., A. Chollet, et al. (2002).

"Identification of the extracellular loop 2 as the point of interaction between the N terminus of the chemokine MIP-1alpha and its CCR1 receptor." Mol Pharmacol **62**(3): 729-36.