

Table des matières

RÉSUMÉ	III
ABSTRACT	IV
LISTE DES TABLEAUX	VIII
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTES DES ABRÉVIATIONS	X
DÉDICACES	XII
REMERCIEMENTS	XIII
AVANT-PROPOS	XIV
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION	1
1. LE SYSTÈME CARDIOVASCULAIRE	2
1.1. <i>Circulation sanguine</i>	2
1.2. <i>Structure artérielle pulmonaire</i>	3
2. PRÉSENTATION CLINIQUE DE L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE	4
2.1 <i>Classification</i>	5
2.1.1 HTAP idiopathique	6
2.1.2 Prédispositions génétiques.....	6
2.2 <i>Diagnostic</i>	6
2.2.1 Symptômes	7
2.2.2 Échocardiographie Doppler	7
2.2.3 Cathétérisme droit.....	7
2.3 <i>Évaluation de la sévérité</i>	8
2.3.1 Classes fonctionnelles.....	8
2.3.2 Test de marche de 6 minutes (6MWT)	8
2.3.3 Biochimie et biomarqueurs sériques	9
2.4 <i>Thérapies actuelles</i>	10
2.4.1 Mesures générales.....	10
2.4.2 Traitements non spécifiques de soutien	10
2.4.3 Traitements spécifiques.....	10
2.4.2.1 Bloqueurs des canaux calciques.....	11
2.4.2.2 Analogues de la prostacycline	11
2.4.2.3 Inhibiteur de la phosphodiesterase-5.....	11
2.4.2.4 Antagonistes de l'endothéline.....	11
3. DÉTERMINANTS CELLULAIRES ET MOLÉCULAIRES DU REMODELAGE ARTÉRIEL PULMONAIRE	13
3.3 <i>Intima - Cellules endothéliales</i>	13
3.3.1 Dysfonction endothéliale.....	13
3.3.2 Inflammation	14
3.3.3 Lésions plexiformes	14
3.3.4 Transition endothélio-mésenchymale	14
3.4 <i>Adventia – Fibroblastes</i>	15
3.5 <i>Media - Cellules musculaires lisses</i>	15
3.5.1 Dysfonctions mitochondriales	15
3.5.1.1 Effet Warburg et <i>switch</i> métabolique	16

3.5.2 Prolifération et résistance à l'apoptose	17
3.5.2.1 Canaux ioniques	17
3.5.2.2 Facteurs de transcriptions	18
3.5.2.3 Oncogènes.....	19
3.5.2.3 Médiateurs circulants.....	19
3.5.2.4 Super famille TGF- β	20
3.5.3 Adaptations aux stress cellulaires.....	20
3.5.3.1 Dommages à l'ADN.....	21
3.5.3.2 Protéines mal repliées	21
2.5.4 Épigénétique	22
3.5.4.1 MicroARN	22
3.5.4.2 Méthylation de l'ADN	23
3.5.4.3 Modifications des histones	23
3.5.4 La migration cellulaire	24
4. ÉTUDE DE L'HTAP: LES DIFFÉRENTS MODÈLES ANIMAUX	25
4.1. Monocrotaline.....	25
4.2 Hypoxie chronique.....	25
4.3 Sugén 5416/hypoxie.....	26
5. L'HISTONE DÉACÉTYLASE 6	26
5.1 Structure et fonctions.....	26
5.2 Intérêts potentiels multiples en HTAP	27
5.2.1 HDAC6 et le cycle cellulaire	28
5.2.2 HDAC6 et les ROS.....	28
5.2.3 HDAC6 et Hif1- α	29
5.2.4 HDAC6 et HSP90	29
5.2.5 HDAC6 et l'autophagie	29
5.2.6 HDAC6 et la migration cellulaire.....	30
5.2.7 HDAC6 et le dommage à l'ADN.....	30
5.2.8 Interaction clé : HDAC6/KU70/Bax	31
HYPOTHÈSES	33
OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	33
CHAPITRE 2 : INSERTION D'ARTICLE.....	34
ABSTRACT	36
INTRODUCTION	37
RESULTS	38
<i>Increased expression of HDAC6 in human PAH and experimental models.</i>	<i>38</i>
<i>Heat Shock Protein 90 (HSP90) regulates HDAC6 expression in PAH-PASMCs.</i>	<i>38</i>
<i>HDAC6 inhibition recues the pro-proliferative, anti-apoptotic and pro-migratory phenotype of PAH-PASMCs.....</i>	<i>39</i>
<i>HDAC6 inhibition causes Bax-induced cell death by increasing acetylation of cytosolic Ku70.</i>	<i>39</i>
<i>Pharmacological inhibition of HDAC6 improves pulmonary hypertension in the Sugén/Hypoxia rat model and provides a therapeutic effect comparable to the combination of standard PAH therapies.....</i>	<i>40</i>
<i>Pharmacological inhibition of HDAC6 reverses pulmonary arterial hypertension in MCT rats.</i>	<i>41</i>
<i>Hdac6 loss of function in mice confers protection against chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension.</i>	<i>41</i>
DISCUSSION.....	42

METHODS.....	44
<i>Human tissue samples</i>	44
<i>Reagents and inhibitors</i>	45
<i>Cell culture and treatments</i>	45
<i>In vitro proliferation and apoptosis measurements</i>	45
<i>Cell migration assay</i>	45
<i>Quantitative RT-PCR and immunoblotting</i>	46
<i>Immunohistochemistry and immunofluorescence studies</i>	46
<i>Animal models</i>	47
<i>In vivo assessment of pulmonary hypertension, RV hypertrophy and pulmonary vascular remodeling</i>	47
<i>Statistical analysis</i>	48
REFERENCES:	48
AUTHOR CONTRIBUTIONS.....	52
SUPPLEMENTARY TABLE	64
SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS	75
CHAPITRE 3 : DISCUSSION ET CONCLUSION	78
DISCUSSION	79
CONCLUSION.....	83
BIBLIOGRAPHIE	85

Liste des tableaux

TABEAU 1-1 : CLASSIFICATION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE (4)	5
TABEAU 1-2 : CLASSES FONCTIONNELLES EN HYPERTENSION PULMONAIRE - ADAPTÉE DU ESC/ERS GUIDELINES WEB TABLE V (3)	9
TABEAU 1-3 : CLASSES DE THÉRAPIES ET MOLÉCULES PRÉSENTEMENT APPROUVÉES ET UTILISÉES POUR LE TRAITEMENT DE L'HTAP.	12
SUPPLEMENTARY TABLE 1. BASELINE CHARACTERISTICS OF CONTROL AND PAH PATIENTS. :	64

Liste des figures

FIGURE 1-1 : CIRCULATION SANGUINE PULMONAIRE ET SYSTÉMIQUE –ADAPTÉE DE PEARSON EDUCATION INC.	3
FIGURE 1-2 : STRUCTURE ARTÉRIELLE – ADAPTÉE DE KHUR (2).....	3
FIGURE 1-3 : MODIFICATION DU RÉSEAU VASCULAIRE ET DES STRUCTURES CARDIAQUES EN HTAP - ADAPTÉE DE RIGHT VENTRICULAR ADAPTATION AND FAILURE IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION (6)	4
FIGURE 1-4 : CATHÉTÉRISME CARDIAQUE DROIT - ADAPTÉE DE INFO-PAH.COM	8
FIGURE 1-5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA DIFFÉRENCE ENTRE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE, LA GLYCOLYSE ANAÉROBIQUE ET LA GLYCOLYSE AÉROBIQUE (EFFET WARBURG)- ADAPTÉE DE VANDER HEIDEN (93)	17
FIGURE 1-6 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE FONCTIONNELLE D’HDAC6 (169)	27
FIGURE 1-7: PUBLICATIONS RELIÉES AUX THÉRAPIES HTAP, PRONOSTIC GLOBAL DE L’HTAP ET FARDEAU FISCAL DE CELLES-CI - ADAPTÉE DE MICHELAKIS (201)	32
FIGURE 1	53
FIGURE 2	54
FIGURE 3	55
FIGURE 4	56
FIGURE 5	57
FIGURE 6	58
FIGURE 7	59
FIGURE 8	60
SUPPLEMENTARY FIGURE 1	65
SUPPLEMENTARY FIGURE 2	66
SUPPLEMENTARY FIGURE 3	67
SUPPLEMENTARY FIGURE 4	68
SUPPLEMENTARY FIGURE 5	69
SUPPLEMENTARY FIGURE 6	70
SUPPLEMENTARY FIGURE 7	71
SUPPLEMENTARY FIGURE 8	72
SUPPLEMENTARY FIGURE 9	73
SUPPLEMENTARY FIGURE 10	74

Listes des abréviations

5-HT : Sérotonine

6MWT: 6 minutes walk test, test de marche de 6 minutes

ALK1: activin receptor-like kinase 1

Bax: Bcl-2-associated X

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

BMPR2: Bone morphogenetic protein receptor type II

BRD4 : Bromodomain-containing protein 4

CAV : Caveolin

CE: Cellules endothéliales

CMLAP : Cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires

Cortactin : cortical actin binding protein

ENG: Endoglin

Et-1 : Endothelin-1

FAK : Focal adhesion kinase

HDAC6 : Histone désacétylase 6

HIF1 α : Hypoxia inducible factor 1 alpha

HSP90 : Heat shock protein 90kDa

HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire

KCNK3: Potassium channel subfamily K member 3

KU70: Lupus Ku autoantigen protein p70

Kv1.5: ou KCNA5, potassium voltage-gated channel subfamily A member 5

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

mPAP : Pression artérielle pulmonaire moyenne

MCT : Monocrotaline

mmHG : Millimètre de Mercure

NFAT : Nuclear factor of activated T-cells

P21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

P27: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27Kip1)

PARP-1: poly(ADP-ribose) polymérase 1

PDE-5: phosphodiesterase cGMP-spécifique de type 5

PIM-1: Provirus integration site for Moloney murine leukemia virus

RUNX2 : Runt-related transcription factor 2

STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3

Su/Hx : modèle Sugén 5416/hypoxie

TGF- β (1) : transforming growth factor-beta (1)

TubA: Tubastatine A

VEGFR2 : Vascular endothelial growth factor receptor 2

Rapport-Gratuit.com

Pour mon mari Pierre-Olivier, pour ma famille

En mémoire de Blanche Gauthier Chabot

« Fais de ta vie un rêve, et d'un rêve, une réalité. »

Antoine de Saint-Exupéry

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur, **Dr Steeve Provencher**, pour son appui, ses questions et ses bons mots. Merci aussi au **Dr Sébastien Bonnet**, mon directeur de cœur, pour les idées et la passion. Merci à vous deux de m'avoir donné ma première chance en recherche en m'accueillant dans le laboratoire avec autant de générosité dans ces trois dernières années. Vous m'aurez permis d'apprendre auprès d'une équipe formidable, de me mettre à l'épreuve et de repousser toujours plus mes limites. Ce fut une belle aventure professionnelle et personnelle.

Merci à **Dr David Marsolais** et **Dr Matieu Laplante** pour la révision et l'évaluation du mémoire. Vos commentaires ont apportés des yeux nouveaux à ce manuscrit.

Merci au **Dr Olivier Boucherat** d'avoir été mon guide, je n'aurais pu accomplir mes différents projets sans tes commentaires, tes idées et tes encouragements. J'ai appris énormément à te côtoyer. Merci.

Merci aux membres du groupe de recherche en hypertension artérielle pulmonaire, présent et passé : **Dr Grégoire Ruffenach** pour tes enseignements, **Jolyane Meloche** pour ta passion et ton sourire contagieux, **Marie-Claude Lampron** et **Alice Bourgeois** pour votre aide et votre amitié. Merci à **François Potus** pour ton aide parfois imprévue et ta disponibilité. Merci à **Dr Benoît Ranchoux** pour tes encouragements et ton écoute, ton amitié est précieuse. Finalement, merci à toutes les professionnelles et technicien de recherche, **Sandra Breuils-Bonnet**, **Valérie Nadeau**, **Eve Tremblay**, **Caroline Lambert**, **Renée Paradis**, **Alexandre Rousseau**. Je chéris votre aide dans un horaire déjà chargé et les moments de complicité et de partage dans les bons comme les moins bons moments. Merci à vous.

Merci finalement à ma famille pour leur support inconditionnel. Merci à mes amis pour leurs bons plans pour me changer les idées et les rires, surtout dans cette année pas toujours évidente. Merci à mon mari, meilleur ami et complice d'avoir été mon roc, surtout à des milliers de kilomètres. J'arrive.

Avant-propos

L'article inséré au chapitre 2 de ce mémoire est sous la forme dans laquelle il a été accepté pour publication au journal *Scientific Reports* après un processus de révision par les pairs. Ainsi, bien que mon jury ait pu avoir des propositions de modification à cet article, j'ai laissé ce dernier tel qu'il a été accepté par le processus de révision scientifique. J'ai été responsable de la production de plus de 90% des données et leur mise en forme finale. La conception de l'étude, la planification des manipulations ont été effectuées par Dr Olivier Boucherat et moi-même, et l'écriture et la révision du manuscrit ont été effectuées par les Dr Olivier Boucherat, Dr. Sébastien Bonnet, Dr Steeve Provencher, Dr Roxane Paulin. Les autres auteurs nommés dans l'étude, Isabelle Trinh, Alice Bourgeois, François Potus, Marie-Claude Lampron, Caroline Lambert, Sandra Breuils-Bonnet, Renée Paradis, Elena A Goncharova ont apporté un soutien technique dans les manipulations et des conseils dans l'orientation de l'étude.

Dans le cadre de ma maîtrise, j'ai touché également à plusieurs autres projets et ai contribué à la production de données qui ont mené à la publication de 2 articles. J'ai participé aux révisions de l'étude portant sur BRD4 en HTAP, ainsi qu'à l'étude et la révision du projet RunX2.

Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, **Chabot S**, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, Tremblay È, Nadeau V, Lambert C, Paradis R, Provencher S, Bonnet S. *Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension*. Circ Res. 2015

Ruffenach G*, **Chabot S***, Tanguay VF, Courboulain A, Boucherat O, Potus F, Meloche J, Pflieger A, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Tremblay E, Girerd B, Hautefort A, Montani D, Fadel E, Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Paulin R, Provencher S, Bonnet S. *Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension*. Am J Respir Crit Care Med. 2016

J'ai participé à la production de données *in vitro* (préliminaires ou définitives) pour les projets HSP90 mitochondrial/Gamitrinib, FOXM1 et YY1 cancer. J'ai pris en charge les protocoles *in vivo* pour le projet HSP90 mitochondrial/Gamitrinib et les résultats préliminaires *in vivo* du projet FOXM1. Ces résultats ont facilité l'obtention de différentes subventions et mèneront à la publication de plusieurs articles dans les prochains mois et années.

CHAPITRE 1 : Introduction

1. Le système cardiovasculaire

Le système cardiovasculaire des mammifères est une merveille d'ingénierie façonnée par des millions d'années d'évolution. L'apparition des premiers cœurs, probablement un tissu tubulaire pulsatile, permettait de forcer le liquide corporel à travers les interstices péricellulaires et ainsi distribuer l'oxygène et les nutriments à travers des organismes multicellulaires Bilatériens il y a quelques 700 à 600 millions d'années. Il a fallu l'apparition des Chordés, il y a près de 550 millions d'années, pour observer les premiers systèmes circulatoires complètement fermés, augmentant ainsi l'efficacité de l'oxygénation. Le cœur, central à ce système circulatoire encore bien primitif, ne possédait ni chambre ni valve et était constitué uniquement de cellules myocardiques. L'évolution subséquente des Vertébrés, jusqu'à il y a 300 millions d'années, a permis l'innovation de plusieurs fonctions et structures cardiaques, avec l'apparition entre autres de chambres, de valves et d'un système circulatoire double (la séparation du système sanguin systémique et pulmonaire). Le cœur à 4 chambres a évolué deux fois parmi les amniotes, soit une fois dans la lignée de l'ancêtre commun menant aux Archosauriens, dont les représentants actuels sont les oiseaux et les crocodiliens, et une seconde fois chez la lignée d'où originent les mammifères.

1.1. Circulation sanguine

Le transport du sang dans tout l'organisme s'effectue grâce à un réseau complexe de veines, d'artères et de capillaires, acheminant oxygène, nutriments, cellules sanguines et hormones à tous les organes. Le point central de la circulation est évidemment le cœur. Ainsi, le sang pauvre en oxygène provenant des différents organes périphériques arrive par les veines au cœur droit. Passant de l'oreillette droite au ventricule droit (VD), le sang est ensuite propulsé dans les artères pulmonaires (AP) constituées d'un réseau de vaisseaux de calibre de plus en plus petit, jusqu'aux capillaires. Les échanges gazeux s'effectuent à l'interface des capillaires et des alvéoles pulmonaires. Le sang maintenant réoxygéné passe des capillaires aux veinules, puis aux veines pulmonaires. De l'oreillette gauche au ventricule gauche (VG), le sang est ensuite distribué par l'aorte et le réseau d'artères systémiques aux organes (fig 1-1).

Les 5,6 litres de sang prennent 20 secondes pour effectuer ce cycle complet à travers les 96 560 kilomètres de vaisseaux à travers tout le corps. La force que doit déployer le cœur gauche pour que le sang soit distribué à tout le corps est grande et se traduit par une pression artérielle élevée au niveau systémique, variant entre 90 et 140 mmHg entre le moment où le VG se dilate (diastole) et se contracte (systole) respectivement. Le système circulatoire pulmonaire, quant à lui, opère à de relativement basses pressions, soit entre 8 et 20 mmHg au repos.

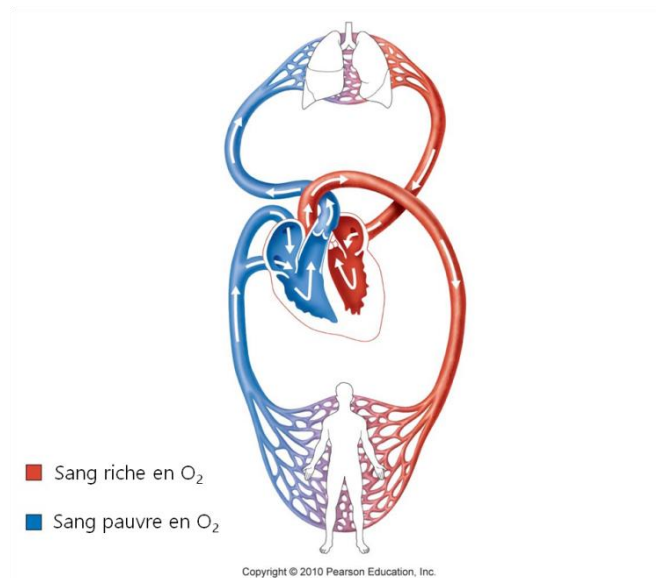


FIGURE 1-1 : CIRCULATION SANGUINE PULMONAIRE ET SYSTÉMIQUE —ADAPTÉE DE PEARSON EDUCATION INC.

1.2. Structure artérielle pulmonaire

Explorons à présent plus en détail les structures vasculaires pulmonaires. Partant du cœur, les artères pulmonaires principales se divisent dans chacun des lobes en artères, artérioles et finalement en capillaires. Du tronc de l'artère pulmonaire aux artères d'un calibre d'environ 1 mm, les artères sont élastiques. Les artérioles plus petites sont muscularisées (1). Les artères sont composées de trois différentes couches ou tuniques, chacune composée d'un type cellulaire particulier (Fig.1-2). La *tunica adventitia*, ou adventice, est la couche extérieure et est principalement composée de fibroblastes, de collagène et d'élastine. La *tunica media* est quant à elle composée d'une ou plusieurs couches de cellules musculaires lisses (CML) selon le calibre de l'artère.

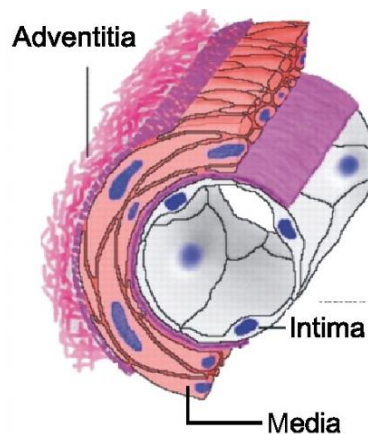


FIGURE 1-2 : STRUCTURE ARTÉRIELLE — ADAPTÉE DE KHUR (2)

Ainsi, une artère proximale sera fortement musclée, et les artères distales, ou artérioles, n'ont qu'une couche simple de CML autour de la dernière tunique. La *tunica intima* est la couche de cellule en contact direct avec le sang, composée de cellules endothéliales (CE). Les capillaires ne sont quant à eux qu'une couche de CE.

2. Présentation clinique de l'hypertension artérielle pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) se définit par une augmentation persistante de la pression moyenne dans l'artère pulmonaire au-delà du seuil de 25 mmHg (3) (4). L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) s'inscrit dans les hypertensions pulmonaires de groupe 1, tel que défini dans le tableau 1, et regroupe des patients ayant une hypertension pulmonaire pré-capillaire, définie hémodynamiquement par une pression pulmonaire capillaire ≤ 15 mmHg et une résistance vasculaire pulmonaire > 3 unités Wood. Cette augmentation des résistances est caractérisée par des changements structuraux au niveau des artères pulmonaires distales ($< 500 \mu\text{m}$) impliquant plusieurs types cellulaires tels que les CE, les CML et les fibroblastes (5). Celles-ci prolifèrent de manière incontrôlée, musclarisant les petites artérioles pulmonaires et réduisant la lumière voire oblitérant les artères pulmonaires (Fig.1-3).

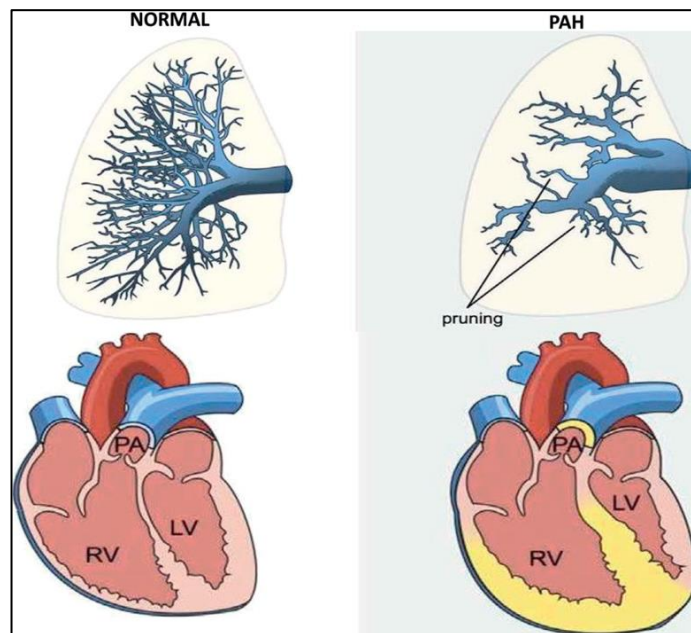


FIGURE 1-3 : MODIFICATION DU RÉSEAU VASCULAIRE ET DES STRUCTURES CARDIAQUES EN HTAP - ADAPTÉE DE RIGHT VENTRICULAR ADAPTATION AND FAILURE IN PULMONARY ARTERIAL HYPERTENSION (6)

Le ventricule droit des patients HTAP se modifie d'abord de manière adaptative en s'hypertrophiant (Fig.1-3), dans une tentative de contrer l'augmentation des pressions dans l'artère pulmonaire. Le cœur droit tendra cependant à décompenser, entraînant inévitablement le décès des patients par insuffisance cardiaque droite

(6). L'HTAP est une maladie progressive et fatale pour laquelle nous n'avons à l'heure actuelle aucun traitement curatif.

2.1 Classification

L'hypertension pulmonaire englobe un groupe hétérogène de patients se divisant en plusieurs catégories, le premier groupe étant l'HTAP (tableau 1) (4). L'HTAP est une maladie rare, ayant une prévalence rapportée se situant mondialement entre 40 à 50 cas par millions (7) (8). Près de 40% des cas seraient idiopathiques (catégorie 1.1), alors que la majorité des autres cas d'HTAP sont associés à diverses conditions (catégorie 1.4) (9).

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

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

TABLEAU 1-1 : CLASSIFICATION DE L'HYPERTENSION PULMONAIRE (4)

2.1.1 HTAP idiopathique

L'HTAP idiopathique (HTAPi) est probablement la forme la plus étudiée d'HTAP et pour laquelle nous avons le plus augmenté l'étendue des connaissances dans les dernières années. C'est également la forme d'HTAP dont il sera principalement question dans le présent mémoire. Cette classe regroupe des cas d'HTAP sporadiques sans mutation identifiée ni élément déclencheur expliquant la survenue de la maladie. Il est cependant probable qu'il s'agisse d'une classe d'individus hétérogènes, chez qui la pathologie a des origines différentes, puisque la progression des symptômes et la réponse aux différents traitements sont variables.

2.1.2 Prédispositions génétiques

Pour tenter de bien comprendre une pathologie, il est toujours intéressant de se pencher sur les prédispositions génétiques. Il avait été identifié depuis 1957 que l'HTAP pouvait être familiale et que certains cas apparemment idiopathiques pourraient être en fait des cas familiaux sans savoir nécessairement quel gène en particulier était en faute (10) (11). Depuis, plusieurs mutations de gènes ont été identifiées comme étant des facteurs de risques importants pour le développement de l'HTAP. Une mutation sur le gène codant pour le BMPR2 (Bone morphogenetic protein receptor type II) a été la première à être identifiée en 2000 (12). Des mutations sur les gènes Alk-1 (Activin Receptor-Like Kinase 1) et ENG (Endoglin), et plus récemment des mutations de gènes codants pour Smad 9 (SMAD Family Member 9) et CAV-1 (caveolin-1) ont été identifiées. Ces gènes codent tous pour des protéines de la voie de signalisation de la superfamille TGF- β . Des mutations sur le gène KCNK3 (Potassium Channel Subfamily K Member 3), un canal potassique, ont aussi été identifiées dans des cas d'HTAP héritable et idiopathique. La pénétrance de ces mutations est incomplète, c'est-à-dire qu'un porteur de la mutation ne développera pas automatiquement l'HTAP. Fait intéressant, des mutations germinales sont présentes aussi chez des patients HTAP idiopathiques (11 à 40% pour BMPR2 (13)), laissant penser que l'environnement pourrait avoir une importance dans l'initiation du phénotype en addition de l'aspect génétique (14).

2.2 Diagnostic

Le diagnostic consiste à éliminer d'autres types d'hypertension pulmonaire, tels que l'hypertension pulmonaire associée à une maladie cardiaque gauche (groupe 2), pulmonaire (groupe 3), une maladie thrombo-embolique (groupe 4) ou une autre maladie rare (groupe 5) (3). Puisque le diagnostic de l'HTAP, particulièrement de l'HTAPi, en est un d'exclusion, le diagnostic différentiel fait appel à l'interprétation des symptômes et à différents outils diagnostiques clés, particulièrement l'échocardiographie et le cathétérisme cardiaque droit, ce dernier étant nécessaire pour confirmer le diagnostic (3).

2.2.1 Symptômes

L'HTAP est une maladie ayant des symptômes aspécifiques et souvent liés à la progression de la défaillance ventriculaire droite (3), telle que la fatigue, l'intolérance à l'effort, l'angine, la faiblesse ou encore les syncopes (15). Les symptômes apparaissent d'abord lors de l'activité physique avant d'être perceptibles au repos dans les phases plus avancées de la maladie (16) (17).

2.2.2 Échocardiographie Doppler

L'échocardiographie Doppler est réalisée lorsque l'HTP est soupçonnée. Elle permet d'imager les effets de l'HTP sur la structure et la fonction du cœur comme l'index de performance du VD, la pression systolique du VD, l'effusion péricardique et l'étendue du mouvement du septum vers le VG en diastole (18). On peut aussi l'utiliser pour estimer la pression artérielle pulmonaire (PAP). La pression systolique du VD est mesurée à partir de la vitesse maximale de régurgitation tricuspiddienne (v), telle que décrite par l'équation simplifiée de Bernoulli : $4v^2$ (3). En ajoutant la pression de l'oreillette droite (POD), estimée à partir de l'affaissement de la veine cave, on obtient une estimation de la PAP systolique (PAPs) (19) selon l'équation $PAPs=4v^2+POD$. L'échocardiographie est fiable et non invasive, et bien qu'elle ne soit pas suffisante pour établir un diagnostic d'HTAP, c'est un outil important pour documenter les effets de celle-ci sur le cœur et savoir s'il faut référer un patient pour un cathétérisme droit.

2.2.3 Cathétérisme droit

Le cathétérisme cardiaque droit est le seul outil permettant d'établir définitivement le diagnostic et la sévérité de l'HTAP (3) (5) (13) (16) (20). Effectué dans les cliniques spécialisées en HTP, c'est une méthode invasive consistant à insérer un cathéter souple soit par la veine fémorale, brachiale ou encore la veine jugulaire et d'aller mesurer les pressions directement dans l'oreillette droite (fig.1-4, # 1), le VD (fig.1-4, # 2) et l'AP (fig.1-4, # 3). Le cathétérisme permet aussi de mesurer le débit cardiaque (DC). On obtient également des mesures de la pression artérielle pulmonaire d'occlusion (PAPo) en gonflant à l'extrémité du cathéter un ballonnet lorsque le cathéter est dans l'une des branches principales de l'AP (fig.1-4, # 4). Ces mesures permettent de calculer les résistances vasculaires pulmonaires (RVP) grâce à cette mesure, par la formule $RVP= (mPAP- PAPo)/DC$.

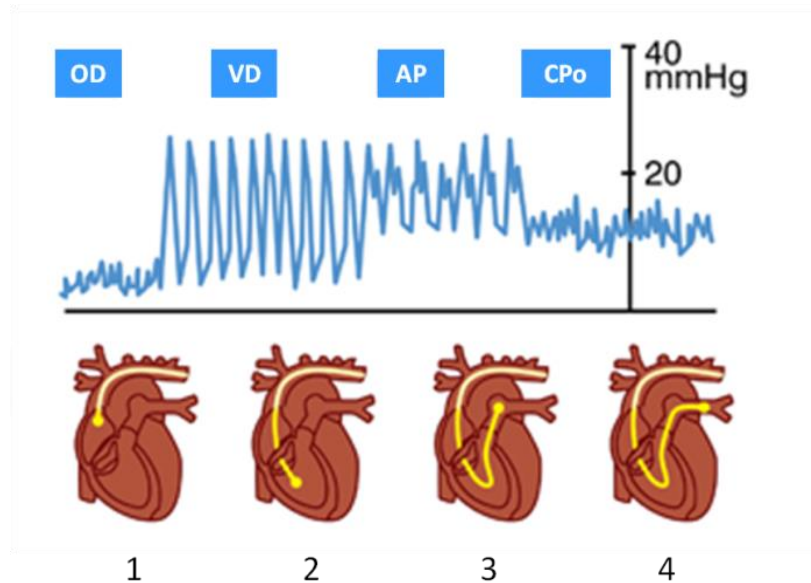


FIGURE 1-4 : CATHÉTÉRISME CARDIAQUE DROIT - ADAPTÉE DE INFO-PAH.COM

2.3 Évaluation de la sévérité

Le pronostic des patients HTAP est sombre, la maladie étant souvent progressive et fatale. Plusieurs indicateurs, ajoutés aux paramètres hémodynamiques, permettent de prédire avec une précision de plus en plus grande la survie des patients. Ainsi, l'évaluation des limitations physiques rapportées et testées, ainsi que des tests en laboratoire sont les outils principaux utilisés par les cliniciens.

2.3.1 Classes fonctionnelles

Le pronostic d'un patient HTAP est grandement dépendant de sa classe fonctionnelle au diagnostic et au suivi. L'Organisation mondiale de la Santé définit quatre classes fonctionnelles en HTAP ci-après détaillées (tableau 2) (20) (3), définies en fonction de l'importance de la dyspnée et des limitations dans les activités physiques et tâches quotidiennes rapportées par le patient. Les recommandations de traitements s'appuient sur la classe fonctionnelle au diagnostic et au suivi, le but des traitements étant d'éviter ou de retarder le plus possible le passage à une classe fonctionnelle supérieure, représentant une dégradation de l'état du patient.

2.3.2 Test de marche de 6 minutes (6MWT)

Le test de marche de 6 minutes (6MWT) mesure simplement la plus grande distance marchée par le patient en 6 minutes. Ce test sous-maximal a été montré comme corrélant avec la classe fonctionnelle et la survie

(21). Une distance normale au 6MWT est égale ou de plus de 600 à 700 mètres. Une distance de moins de 300 à 350 mètres prédit une issue plus sombre pour les patients, alors qu'une distance de moins de 165 mètres parcourus est le reflet de limitations extrêmement sévères (21) (22) (19).

Classe fonctionnelle	Profil des symptômes
I	Patients ayant de l'hypertension pulmonaire, sans limitation dans l'activité physique. L'activité physique ordinaire (ex. : monter et descendre des escaliers, aller à l'épicerie, etc.) ne cause pas de dyspnée ou de fatigue excessive, douleur à la poitrine ou présyncope.
II	Patients ayant de l'hypertension pulmonaire résultant en de légères limitations de l'activité physique. Ils sont confortables au repos. L'activité physique ordinaire cause de la dyspnée ou de la fatigue excessive, douleur à la poitrine ou présyncope.
III	Patients ayant de l'hypertension pulmonaire résultant en des limitations marquées de l'activité physique. Ils sont confortables au repos. De la dyspnée ou de la fatigue excessive, douleur à la poitrine ou présyncope sont causées par les activités d'intensité inférieures à l'activité physique ordinaire (ex. : marche).
IV	Patients ayant de l'hypertension pulmonaire ayant l'impossibilité de faire l'activité physique sans symptôme. Ces patients manifestent des signes de défaillance cardiaque droite. La dyspnée et/ou la fatigue peuvent même être présentes au repos. L'inconfort est augmenté par toute activité physique.

TABLEAU 1-2 : CLASSES FONCTIONNELLES EN HYPERTENSION PULMONAIRE - ADAPTÉE DU ESC/ERS GUIDELINES WEB TABLE V
(3).

Cette mesure a longtemps été le critère d'efficacité principal pour évaluer les bénéfices d'un traitement lors d'essais cliniques. Une récente méta-analyse de 22 essais cliniques n'a cependant montré aucune relation entre l'amélioration de la distance au 6MWT et la survenue d'événements de morbidité ou de mortalité (23). Il serait plus important de considérer l'atteinte de certaines distances dites seuils, plutôt que l'augmentation relative sous traitement, pour prédire le pronostic. Ainsi, la mortalité des patients parcourant moins de 250 mètres est plus élevée que leurs pairs parcourant une plus grande distance, et la mortalité est substantiellement diminuée chez les patients parcourant plus de 440 mètres (22) (19).

2.3.3 Biochimie et biomarqueurs sériques

Des tests en laboratoire complètent les outils nécessaires à l'établissement de la sévérité et le pronostic des patients. Le biomarqueur le plus universellement utilisé est le BNP (Brain natriuretic peptide) ou de sa forme clivée, NT-proBNP. Le BNP est une hormone sous sa forme biologiquement active sécrétée par les cardiomyocytes lors de stress d'étirement, et dont les niveaux sont augmentés en proportion avec la dysfonction cardiaque droite en HTAP (24) (25). Il est maintenant reconnu que les niveaux de BNP dans le sang des patients HTAP corrélaient inversement avec la distance au 6MWT et directement avec les paramètres

hémodynamiques (26). Le BNP a cependant une demi-vie courte dans le sang, alors que la forme clivée NT-proBNP, un sous-produit de BNP, nécessite d'être métabolisée par les reins. Il peut être plus aisé de mesurer le niveau de NT-proBNP, ce dernier étant un prédicteur de survie plus fort que le niveau de BNP (27). Au fil des ans, la recherche sur les biomarqueurs a évolué, mais reste d'une grande importance, car aucun ne s'est encore traduit en recommandation d'utilisation en clinique pour le diagnostic ou la pronostication de l'HTAP.

2.4 Thérapies actuelles

Le traitement de l'HTAP ne peut être froidement regardé comme une prescription. Il s'agit effectivement d'une stratégie complexe basée sur l'évaluation initiale de la sévérité tel que précédemment discuté. Les traitements sont réévalués fréquemment en fonction de la réponse à ce dernier et ce, jusqu'à stabilisation (3). Voyons plus en détail les classes de thérapies non spécifiques et spécifiques à l'HTAP offertes aux patients.

2.4.1 Mesures générales

Les patients diagnostiqués sont conseillés de demeurer actifs dans les limites de leurs symptômes afin d'éviter le déconditionnement. Il est préférable d'effectuer ces entraînements de manière supervisée dans des centres spécialisés et expérimentés avec la clientèle HTAP et en réadaptation (3). La grossesse n'est pas recommandée chez les patientes HTAP, le risque de complications mortelles pour la mère étant très élevé. Aussi, près de 7% des décès des patients sont la conséquence d'une pneumonie. Il est donc recommandé que tous reçoivent les vaccins annuels protégeant contre l'influenza, ainsi que contre le pneumocoque (3) (15).

2.4.2 Traitements non spécifiques de soutien

Suivant le processus de diagnostic, les patients peuvent recevoir plusieurs médicaments qui ne visent pas spécifiquement à corriger l'HTAP, mais plutôt à atténuer certains symptômes et éviter certaines complications. Des anticoagulants sont souvent prescrits, la survenue d'anormalités dans la voie de signalisation de la coagulation ayant été rapportée (28) et des thromboses ayant été observées lors d'inspection post-mortem chez des patients HTAPi (29). Les patients ayant des signes de défaillance cardiaque droite peuvent avoir de la rétention d'eau, de l'ascite et de l'œdème périphérique : des diurétiques leur seront alors proposés (30). Bien que peu d'évidence montre que cela soit bénéfique, les patients reçoivent une supplémentation en oxygène lorsque la pression d'O₂ du sang artérielle est inférieure à 8 kPa (3) (31).

2.4.3 Traitements spécifiques

La vasoconstriction est encore considérée par plusieurs comme un facteur important impliqué dans la physiopathologie de l'HTAP. Les thérapies spécifiques actuelles sont d'ailleurs essentiellement basées sur cet aspect. En effet, la vasoconstriction est associée à une diminution des canaux potassiques et à une

dysfonction endothéliale (32), ce qui entraîne une diminution de production de vasodilatateur tel que le l'oxyde nitrique et la prostacycline, et une augmentation de vasoconstricteurs comme l'endothéline-1 (33). Cette dernière stimule également la mitose des CML d'AP, participant ainsi au remodelage vasculaire (34). Un tableau récapitulant le nom des molécules fréquemment rencontrées suit la description de chacune des quatre grandes classes de traitements (tableau 3).

2.4.2.1 Bloqueurs des canaux calciques

Les bloqueurs des canaux calciques agissent en inhibant le flux de calcium dans les cellules vasculaires, entraînant une relaxation et une vasodilatation. Ils sont très peu utilisés en HTAP, car ils se sont révélés efficaces que sur une faible proportion des patients HTAP (entre 7 et 10%) (35). Il est documenté que les bloqueurs de canaux calciques peuvent être utilisés à long terme chez les patients ayant une réponse positive au test de vasoréactivité au diagnostic (36) (37) (38).

2.4.2.2 Analogues de la prostacycline

La prostacycline est un puissant vasodilatateur sécrété principalement par les CE ayant comme cible principale le récepteur situé entre autres à la surface des CML du réseau vasculaire pulmonaire. C'est aussi un inhibiteur de l'agrégation des plaquettes ayant des propriétés cytoprotectives et anti-proliférative (39). Il a été montré que la synthèse de la prostacycline ainsi que ses métabolites sont diminués en HTAP (40). Les molécules actuellement développées sont des analogues synthétiques de la prostacycline, conçues pour restaurer les niveaux endogènes diminués chez les patients HTAP.

2.4.2.3 Inhibiteur de la phosphodiesterase-5

L'oxyde nitrique est un puissant vasodilatateur endogène ayant un effet relaxant sur les CML vasculaires en stimulant la guanylate cyclase soluble et la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) intracellulaire (41). La phosphodiesterase-5 (PDE-5) est une enzyme exprimée dans les poumons faisant partie de la superfamille d'enzymes des phosphodiesterases ayant pour fonction d'inactiver l'AMPc et le GMPc (42). L'HTAP étant associée à des défauts de production de l'oxyde nitrique et une augmentation de l'expression de PDE-5 (43) (41) (44). Cette voie est ciblée par plusieurs molécules couramment utilisées. Les inhibiteurs de la PDE-5 restaurent des niveaux de GMPc en inhibant son métabolisme, favorisent les effets vasodilatateurs de l'oxyde nitrique endogène et diminuent la prolifération des CML (45).

2.4.2.4 Antagonistes de l'endothéline

L'endothéline-1 (ET-1) est une molécule endogène favorisant la vasoconstriction et la prolifération des cellules vasculaires. Deux récepteurs d'ET-1 sont présents à la surface des CML du système vasculaire pulmonaire, soit ET-A et ET-B, promouvant la vasoconstriction et la prolifération (46) (47). Le récepteur ET-B est quant à lui aussi présent à la surface des CE, promouvant cette fois la vasodilatation et la clairance de l'ET-1 (48).

L'expression de l'ARN messager et de la protéine ET-1 est augmentée dans le plasma et les poumons des patients HTAP et serait impliquée dans la pathogénèse de la maladie (49) (50). Certains inhibiteurs actuellement approuvés pour le traitement de l'HTAP bloquent les deux récepteurs (Bosentan et Macitentan), tandis que d'autres ne bloquent que le récepteur ET-A dans le but de conserver les effets potentiellement bénéfiques sur les CE du récepteur ET-B (Ambrisentan et Sitaxsentan, ce dernier ayant été retiré du marché pour cause de toxicité hépatique (51)).

Classe de thérapie	Molécule
Bloqueur des canaux calciques	Nifedipine
	Diltiazem
	Nicardipine
	Amlodipine
Analogues de la prostacycline	Epoprostenol
	Iloprost
	Beraprost
	Treprostinil
	Selexipag
Antagoniste des récepteurs à l'endothéline	Bosentan
	Ambrisentan
	Macitentan
Inhibiteur de la phosphodiesterase-5	Sildenafil
	Tadalafil

TABLEAU 1-3 : CLASSES DE THÉRAPIES ET MOLÉCULES PRÉSENTEMENT APPROUVÉES ET UTILISÉES POUR LE TRAITEMENT DE L'HTAP.

Une méta-analyse récente a montré que la combinaison de deux thérapies était préférable à la monothérapie, car elle entraînait significativement moins de détérioration clinique (52). Une certaine proportion de patients réussit à être stabilisée suffisamment grâce à ces thérapies, permettant de retarder la recommandation des patients pour une transplantation (53). Le besoin de recourir à la transplantation pulmonaire est cependant la seule option pour les patients ne répondant pas bien aux traitements. Cependant, la transplantation en elle-même n'est pas aisée, et les listes d'attentes peuvent être longues (3). En effet, la survie post-transplantation

à 5 ans est estimée à 52–75% et à 45–66% sur 10 ans (54) (55). La nécessité d'identifier des cibles thérapeutiques spécifiques pouvant renverser l'HTAP, même établie et en stade avancé, est évidente.

3. Déterminants cellulaires et moléculaires du remodelage artériel pulmonaire

L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie multisystémique complexe. Malgré que nous soyons à l'heure des nanotechnologies, du développement de l'intelligence artificielle et de la conquête de Mars, aucun traitement actuellement offert aux patients HTAP ne permet de les guérir définitivement. Dans cette prochaine section, nous ferons le point sur les connaissances actuelles sur les déterminants cellulaires et moléculaires du remodelage artériel observé dans les artères pulmonaires distales des patients HTAP pertinentes à la compréhension de la suite de ce mémoire. Chacune des couches cellulaires composant les artères peut contribuer au remodelage et à l'oblitération vasculaire observée en HTAP, nous nous concentrerons plus loin sur la *media*.

3.3 *Intima* - Cellules endothéliales

Les hypothèses physiopathologiques actuelles stipulent que l'HTAP débute par les cellules de l'intima, les CE, qui subiraient une première blessure (*'first hit'*). Celles-ci sont constamment exposées au sang et sont donc les premières à ressentir les effets de l'hypoxie, de l'inflammation ou encore les changements de pression. En HTAP, elles deviennent dysfonctionnelles et peuvent proliférer de manière incontrôlable formant des lésions. Il est aussi maintenant reconnu qu'une proportion de ces cellules encourent un changement d'identité et migrent vers la *media* : c'est la transition endothélio-mésenchimale (56).

3.3.1 *Dysfonction endothéliale*

La nature des stimuli précédents la vasoconstriction et la prolifération des cellules vasculaires sont encore nébuleuses. Toutefois, les évidences actuelles pointent vers un rôle central des CE dans l'initiation de l'HTAP. En effet, une hypothèse actuellement répandue propose qu'une blessure à l'endothélium vasculaire mène à l'apoptose de cellules normalement quiescentes, déstabilisant la structure de l'intima, potentiellement aux points de bifurcations des artères, entraînant une prolifération subséquente incontrôlable des CE (57). Les conséquences ensuite observées en HTAP auraient pour origine la diminution de la lumière artérielle. Les blessures à l'endothélium pourraient encourager la fuite de certains facteurs de croissance, qui pourraient influencer les CML adjacentes, et ainsi encourager leur hypertrophie et prolifération (57) (58).

3.3.2 Inflammation

L'inflammation jouerait un rôle important dans l'initiation du remodelage vasculaire. En effet, de nombreuses cytokines et chimiokines sont surexprimées dans le sang des patients HTAP, incluant les interleukines (IL)-2, 6, 8, 10, 12p70, le *tumor necrosis factor alpha* (TNF α) et les chimiokines CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES et chemokine (C-X3-C motif) ligand 1(CX3CL1)/fractalkine (59) (60) (61) (62). Ces dernières jouent plusieurs rôles délétères pour les patients HTAP, l'expression élevée de plusieurs étant associée à une diminution de la survie (63) et une augmentation de la prolifération des CML (64) (61) (65) (66) (67).

Un déséquilibre entre l'immunité et la tolérance peut entraîner l'inflammation chronique et l'auto-immunité. Différents auto-anticorps dirigés contre les différents types cellulaires résidents de l'AP ont été trouvés en HTAP idiopathique et en HTAP associée à une sclérodermie. Ces auto-anticorps provoquent l'apoptose de CE (68) (69).

Les cellules T régulatrices (Treg) sont les cellules responsables du contrôle de la tolérance du soi. Or, leur fonction est altérée en HTAP, pouvant expliquer la présence d'auto-anticorps (70). On peut aussi observer en HTAP expérimentale et humaine de l'infiltration de macrophages au niveau de l'intima et l'adventia (71). Trois thérapies visant à réduire différentes composantes de l'inflammation sont présentement en essai clinique dans le traitement de l'HTAP idiopathique et de l'HTAP associée à une sclérodermie aux États-Unis (69). En effet, trois molécules agissant sur des modulateurs de l'inflammation sont testées : FK506, un inhibiteur de NFAT, et Anakinra, un antagoniste du récepteur de l'interleukine 1 chez une population HTAP, et un anticorps monoclonal dirigé contre les cellules B CD20+, Rituximab, chez une cohorte HTAP associée à une sclérodermie.

3.3.3 Lésions plexiformes

Les lésions plexiformes sont des anomalies structurelles des petites artères HTAP. Elles sont la marque d'une HTAP sévère et consistent principalement en une prolifération aberrante de CE. Toutefois, la composition cellulaire peut varier dépendamment de la 'maturation' de la lésion. Ainsi, elle peut abriter des CML et des fibroblastes, et mûrir pour devenir de plus en plus fibrotique, avec des tissus conjonctifs (72). Des cellules inflammatoires ont été observées au sein de ces lésions (71). Ces dernières semblent également évoluer dans un microenvironnement distinct des cellules vasculaires associées (73).

3.3.4 Transition endothélio-mésenchymale

Un processus récemment décrit en HTAP et participant au phénotype de remodelage vasculaire est la transition endothélio-mésenchymateuse ou endoMT. L'endoMT est un processus biologique par lequel des CE changent progressivement leur phénotype et acquièrent un phénotype mésenchymal ou myofibroblastique,

migrant de l'intima vers la media. L'endoMT fut observée chez l'humain et chez deux modèles animaux, et serait liée à une altération de la signalisation de BMPR2 (56). Cette découverte intéressante nous porte à la réflexion que plusieurs processus biologiques restent encore à être démystifiés pour comprendre la physiopathologie de l'HTAP.

3.4 *Adventia* – Fibroblastes

Les cellules résidentes de l'*adventia* participent activement au remodelage vasculaire observé en HTAP. En effet, une variété de cellules y effectuent des fonctions immuno-régulatrices telles que les fibroblastes, fibrocytes, macrophages, cellules dendritiques, cellules résidentes progénitrices (74). En réponse à un stress vasculaire ou une blessure, ces cellules adventielles peuvent être parmi les premières à être activées et à moduler le tonus vasculaire (74). Une fois activés, les fibroblastes sont capables d'un large éventail de comportements participant à la modification de la structure du mur artériel et son remodelage, incluant la prolifération, la différenciation en myofibroblastes et la migration (75). De plus en plus d'évidences suggèrent que les fibroblastes activés et différenciés sécrètent des facteurs inflammatoires - cytokines, chimiokines - affectant les CMLs et les CEs, perpétuant un environnement inflammatoire (74) (75) (76). La recherche sur le rôle des fibroblastes et l'*adventia* dans le remodelage vasculaire en HTAP est encore peu commune, mais gagnera à être étudiée pour avoir une compréhension globale et complète de la pathologie.

3.5 *Media* - Cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires (CMLAPs) sont parmi les cellules les plus caractérisées en HTAP, et présentent un phénotype prolifératif et anti-apoptotique. Les cellules cancéreuses et les CMLAPs HTAP partagent en ce sens plusieurs points communs. En effet, plusieurs voies de signalisation impliquant la prolifération, la résistance à l'apoptose ou le métabolisme du glucose sont dérégulées de manière semblable dans les deux pathologies (77). Nous verrons dans la section suivante qu'il est de plus en plus reconnu que les CMLAPs HTAP adoptent une réponse cytoprotective permettant de déjouer les stress, notamment en réponse aux dommages à l'ADN et à l'accumulation de protéines mal repliées. L'épigénôme est de plus en plus caractérisé et reconnu comme participant activement au phénotype HTAP des CMLAPs.

3.5.1 *Dysfonctions mitochondriales*

Le métabolisme des cellules CMLAPs est altéré à la manière de cellules cancéreuses, c'est-à-dire qu'il y a un 'switch' métabolique (78). Des changements mitochondriaux mènent à une suppression de la respiration et une augmentation de la glycolyse même en normoxie, à une hyperpolarisation des membranes mitochondriales (et donc une augmentation de la résistance à l'apoptose) (77).

3.5.1.1 Effet Warburg et *switch* métabolique

Il est cru que les mitochondries sont apparues suite à l'endosymbiose entre un prokaryote et son repas, probablement une alpha-protéobactérie, il y a 2 milliards d'années (79). La forme de vie alors formée aura alors étendu sa capacité de produire de l'énergie, un avantage compétitif évident. En effet, les mitochondries sont des organelles responsables de la production d'ATP nécessaire à la vie de la cellule. Dans une cellule saine en normoxie, le glucose est métabolisé en CO_2 dans la mitochondrie par l'oxydation du pyruvate dans le cycle de Krebs. La phosphorylation oxydative permet une production maximale d'ATP et minimale de lactate.

En absence d'oxygène, la cellule produit du lactate par glycolyse anaérobie du pyruvate en dehors de la mitochondrie et ne génère qu'une quantité minime d'ATP par mole de glucose. Une caractéristique des cellules cancéreuses, partagée par les cellules prolifératives en HTAP, est la glycolyse aérobie, aussi nommée effet Warburg. En effet, dans ces cellules, la majorité du glucose est converti en lactate et une production minime d'ATP est produite par mole de glucose, et ce, même en présence d'oxygène (Fig.1-5). Ces cellules utilisent cependant une quantité augmentée de glucose, la production nette d'ATP en est donc augmentée. Cette caractéristique importante des cellules prolifératives proviendrait principalement de dysfonctions mitochondriales (80).

Comme nous venons de le voir, les mitochondries utilisent l'oxygène comme dernier receveur d'électrons lors de la génération d'ATP par la phosphorylation oxydative. L'utilisation de l'oxygène n'est cependant pas sans risque et peut générer la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). Une quantité excessive de ROS réagit avec diverses macromolécules modifiant leurs fonctions par des altérations de leurs propriétés physiques et biochimiques pouvant entraîner des dysfonctions cellulaires et même la mort de la cellule (81). Lors d'un changement d'utilisation de phosphorylation oxydative vers glycolyse aérobie, comme en HTAP, il y a production de moins de ROS. Chez les fawn hooded rats (FHR), développant de manière spontanée l'hypertension pulmonaire en raison d'une dysfonction mitochondriale, il y a production de moins de ROS par les mitochondries. Ils ont aussi une incapacité à faire varier la production de ROS en fonction de la pression partielle d' O_2 (PO_2), créant ainsi un milieu redox de type hypoxique (82), augmentant ainsi la résistance à l'apoptose des cellules.

Cette suppression de l'oxydation du glucose pourrait être un point de départ du phénotype HTAP. Bien que produisant moins d'ATP, la glycolyse aérobie est avantageuse pour des cellules prolifératives en déclenchant plusieurs mécanismes facilitant la glycolyse et l'entrée du glucose. La glycogène synthase kinase 3β (GSK 3β) est activée en HTAP comme en cancer, transloquée à la membrane externe de la mitochondrie et inhibe les canaux à anion voltage dépendant (83) (84), augmentant ainsi le potentiel de membrane des

mitochondries. C'est l'hyperpolarisation des membranes mitochondriales qui augmente la résistance à l'apoptose des CMLAPs.

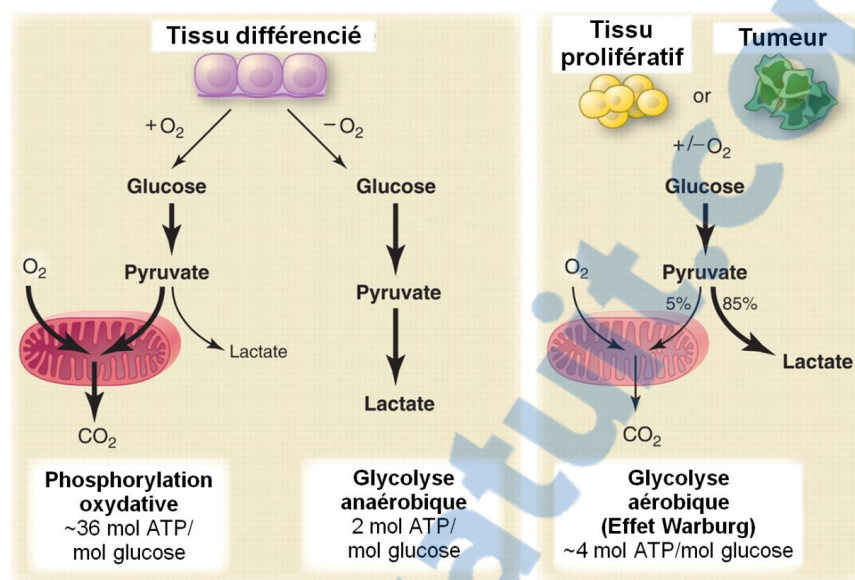


FIGURE 1-5 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA DIFFÉRENCE ENTRE LA PHOSPHORYLATION OXYDATIVE, LA GLYCOLYSE ANAÉROBIQUE ET LA GLYCOLYSE AÉROBIQUE (EFFET WARBURG)- ADAPTÉE DE VANDER HEIDEN (80)

3.5.2 Prolifération et résistance à l'apoptose

Il est largement établi maintenant que les CMLAPs des patients HTAP prolifèrent de manière incontrôlée et sont résistantes à l'apoptose. Ce phénotype persiste *in vitro*, en permettant l'étude détaillée. À ce jour, le rôle de plusieurs facteurs de transcription, d'oncogènes et de canaux ioniques a été identifié.

3.5.2.1 Canaux ioniques

Les canaux potassiques sont les principaux régulateurs du potentiel de membranes au repos des CMLAPs. Deux types de canaux potassiques ont été principalement identifiés en HTAP comme participant au remodelage vasculaire. D'abord, la suppression de la respiration mène à l'activation normoxique de l'*Hypoxia-inducible factor 1α* (HIF1α). Ce facteur de transcription activé entraîne l'internalisation et la diminution d'expression des canaux potassiques de type K_v1.5, provoquant une dépolarisation de la membrane cellulaire et une entrée massive de calcium dans la cellule via des canaux calciques voltages dépendants (principalement de type L) (85). L'augmentation du calcium cytosolique entraîne d'abord la vasoconstriction, et est associée, lorsque le signal est prolongé, à la prolifération, à l'activation de kinases Ca²⁺ dépendantes et à la stimulation de gènes et de *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) (86) (87). NFAT promeut la résistance

à l'apoptose en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique bcl-2 (86). Finalement, la diminution de l'efflux des ions K⁺ suivant la diminution de l'expression et de l'activité des canaux K_v participe à la résistance à l'apoptose en inhibant l'activité des caspases, protéines essentielles au déclenchement du processus d'apoptose (88) (89) (90).

Plus récemment, des mutations affectant le gène codant pour le canal KCNK3 et entraînant toutes une perte de fonction du gène ont été identifiées comme un facteur de risque de l'HTAP (91). Utilisant une technique de patch clamp, Antigny et al. ont montré que le courant ionique de KCNK3 diminuait avec la progression de la maladie dans le modèle expérimental monocrotaline, et que la restauration de l'activation du canal par voie pharmacologique renversait l'HTAP observée chez ces rats (92).

3.5.2.2 Facteurs de transcriptions

Les facteurs de transcriptions sont des protéines interagissant avec des séquences spécifiques de régions promotrices sur l'ADN, habituellement en complexe avec d'autres protéines, et régulant la transcription de l'ADN en ARN messager. Différents facteurs de transcriptions sont impliqués en HTAP, comme HIF1- α , RunX2 et STAT3.

L'*Hypoxia inducible factor 1 α* est activé en HTAP (82). Son activation mène à la transcription de gènes liés au métabolisme du glucose, à l'angiogénèse, à la survie cellulaire et bien plus (93). En plus du rôle précédemment traité sur l'activité des canaux potassiques K_v1.5, ce facteur de transcription interagit avec plusieurs protéines concernées en HTAP. En effet, il a été montré que son activation entraînait la diminution de l'expression du microARN 223, augmentant ainsi la capacité de réparation du dommage à l'ADN, un aspect adaptatif des CMLAPs qui sera traité plus loin. HIF1- α interagit aussi avec un facteur de transcription nouvellement identifié en HTAP, *Runt-related Transcription Factor 2* (RUNX2). Ensemble, ils contribuent non seulement au phénotype prolifératif et anti-apoptotique des CMLAPs HTAP, mais aussi par la promotion de la calcification des CMLAPs en HTAP humaine (*in vitro*) et expérimentale (*in vivo*) (94).

STAT3 est un facteur de transcription dérégulé dans plusieurs maladies cardiovasculaires, ainsi qu'en HTAP (95) (96). Son activation promeut l'expression de NFAT et l'activation de ce dernier via Pim-1, participant au phénotype prolifératif et anti-apoptotique des CMLAPs HTAP (97). STAT3 phosphoryle également le facteur de transcription FoxO1 suivant une stimulation à certains facteurs circulants surexprimés en HTAP. Cette phosphorylation séquestre FoxO1 hors du noyau, empêchant son activité transcriptionnelle sur des gènes d'arrêt du cycle cellulaire comme p27, et promouvant la transcription de gènes impliqués dans la prolifération (cyclin D1 et cyclin B1) (98).

3.5.2.3 Oncogènes

Beaucoup d'oncogènes ont été identifiés comme impliqués dans le développement du phénotype HTAP. En effet, ce sont entre autres des protéines intervenant dans la régulation du cycle cellulaire ou dans l'activation de gènes menant à la prolifération qui ont fait l'objet de beaucoup de publications dans la dernière décennie. Des protéines telles que p21 et p27, qui sont régulatrices du cycle cellulaire, sont sous-exprimées par divers mécanismes en HTAP (99) (100). BRD4, un lecteur épigénétique surexprimé en HTAP et dont l'inhibition corrige le phénotype HTAP *in vitro* et *in vivo*, régule l'expression de p21 et p27 (101) (102) (103). La protéine oncogénique Survivin est une protéine anti-apoptotique surexprimée dans la plupart des cancers comparés aux patients sains (104). Survivin est également surexprimée en HTAP autant chez l'humain que les modèles expérimentaux et la thérapie génique visant à réduire l'expression de Survivin permet de réduire le remodelage vasculaire chez ces derniers (105).

La voie des MAPK, grandement démontrée comme impliquée dans la prolifération de cellules cancéreuses (106), est aussi impliquée dans le phénotype prolifératif des CMLAPs HTAP. Notamment, JNK et p38 MAPK participent à la prolifération des CMLAP-HTAP, JNK interagissant directement avec Akt (107). Aussi, Notch-3, un récepteur transmembranaire pouvant contrôler la transcription de certains gènes par le largage de domaines suite à l'interaction à son ligand, est connu comme étant surexprimé en HTAP (108) (109). Notch-3 induit l'expression d'une protéine anti-apoptotique, c-FLIP, qui effectue son effet via l'interaction avec les MAPK (110).

3.5.2.3 Médiateurs circulants

Plusieurs médiateurs circulants agissent également sur la prolifération et la résistance à l'apoptose des CMLAPs. En effet, nous avons identifié précédemment l'endothéline-1 et la prostacycline, deux molécules endogènes impliquées dans la vasoconstriction ayant aussi des propriétés mitogènes. D'autres facteurs circulants n'ayant pas d'inhibiteurs connus ou approuvés participent cependant au remodelage. C'est le cas notamment du *platelet derived growth factor* ou PDGF. Cette molécule et son récepteur ont reçu l'attention d'énormément de chercheurs, montrant leur implication dans la prolifération et la migration des CML (111) (112) (113). Par marquage histologique, il a été possible de montrer que PDGF et son récepteur sont augmentés dans les artères remodelées de patients HTAPi, plus particulièrement dans les CMLAPs, mais également dans les cellules inflammatoires infiltrées et les CE (113). Un inhibiteur du récepteur, l'imatinib, a permis de réduire la prolifération des CMLAPs en culture et de renverser l'HTAP induite par la monocrotaline (114). Cette drogue, utilisée dans le traitement de cancer, a fait l'objet d'essais cliniques de phase II et III en HTAP de manière à vérifier l'efficacité et la sécurité de l'emploi chez une clientèle qui ne répond pas bien aux thérapies actuelles (115). L'étude principale, s'étalant sur 24 semaines, a démontré une augmentation significative de la distance parcourue au test de marche de 6 minutes et une amélioration hémodynamique

(115). L'extension de l'étude, allant jusqu'à 204 semaines, a cependant eu des limitations majeures (116). En effet, le taux de discontinuation de l'étude par les patients et le changement du groupe placebo au groupe imatinib pour certains patients entre l'étude originale et l'extension compliquent l'analyse. Les auteurs concluent que les effets secondaires sont plus importants que les effets bénéfiques pour les patients HTAP, et que l'utilisation de l'imatinib en HTAP n'est pas recommandée (116).

Le nombre de cas d'HTAP corrélées à l'exposition, même courte, à certains anorexigènes a mis en lumière la possible implication de la sérotonine et de son transporteur dans le développement de l'HTAP (117) (118) (119). En effet, ces anorexigènes peuvent agir comme analogue de la sérotonine, une molécule somme toute présente en de bas niveaux dans le sang d'une personne saine (120). D'une part, la production de sérotonine serait augmentée dans les CE HTAP et stimulerait les récepteurs à la surface des CML de manière paracrine, enclenchant une cascade signalétique qui implique l'augmentation de ROS, et l'activation de Rho kinase et MAPK et résulte en la contraction et la prolifération des CMLAPs (121) (122) (123). La sérotonine pourrait aussi inhiber les canaux $K_v1.5$ (124). Finalement, la sérotonine pourrait atténuer le signalement de BMPR2, augmentant ainsi le facteur de risque lié à la mutation de ce gène chez les patients (125).

3.5.2.4 Super famille TGF- β

Le *transforming growth factor beta* (TGF- β) englobe une super famille de récepteurs sérine-thréonine kinase de type I et de type II, ainsi qu'une variété de ligands impliqués dans plusieurs processus biologiques essentiels tels que la prolifération, l'inflammation et la différenciation cellulaire. Des mutations dans les gènes entraînant une perte de fonction de différents membres de cette superfamille ont été identifiées comme facteurs de risques au développement de l'HTAP. Le gène le plus étudié est un récepteur de type II, le *Bone morphogenetic protein receptor type II* ou BMPR2 (12). Une atténuation de sa signalisation provoquée par une mutation entraîne une diminution de l'apoptose et une augmentation de la prolifération de CE et des CMLAPs (126). Des mutations dans les gènes de SMAD9, ALK1 et Endoglin, qui font également partie de la super famille de la signalisation TGF- β , ont été identifiées dans des cas d'HTAP familiales (127) (128) (129). La voie de signalisation de TGF- β joue donc un rôle certain dans le remodelage artériel.

3.5.3 Adaptations aux stress cellulaires

Les CMLAPs HTAP sont soumises à différents stress cellulaires importants qui, en théorie, devraient suffire à faire déclencher l'apoptose. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, les différents types cellulaires artériels accumulent des changements moléculaires promouvant la prolifération et la résistance à l'apoptose. Ces cellules s'adaptent et développent des mécanismes permettant de conserver une certaine homéostasie malgré ces stress.

3.5.3.1 Dommages à l'ADN

Les cellules HTAP se répliquent à un rythme élevé, et des cassures simples ou doubles brins peuvent survenir. Les CMLAPs HTAP ont en effet plus de dommage à l'ADN que les CMLAPs contrôles. Il a été démontré que PARP-1, une composante de la machinerie de réparation des dommages, est surexprimée chez les patients et les modèles animaux HTAP. Ainsi, malgré la présence notable de plus de dommages, la cellule met en branle des mécanismes de réparation dans le but de maintenir sa survie (130) (131). La surexpression de PARP-1 est le résultat de la diminution du microARN 223 HIF1 α -dépendante (132). Lorsque l'on empêche la réparation de se produire, soit en inhibant PARP-1 ou en rétablissant les niveaux du microARN 223, on réussit à augmenter les niveaux d'apoptose à des niveaux normaux *in vitro* et *in vivo*. Bien que des inhibiteurs de PARP-1 existent, les essais cliniques sur des patients atteints d'HTAP n'ont pas encore eu lieu, mais peuvent être à anticiper.

3.5.3.2 Protéines mal repliées

Un autre stress important rencontré par les CMLAPs HTAP est engendré par l'accumulation de protéines mal repliées. De manière à prévenir l'apoptose pouvant survenir suivant l'accumulation toxique de ce genre de protéines, la cellule augmente le nombre de protéines chaperonnes et l'évacuation par autophagie.

Les protéines chaperonnes sont des protéines qui assurent le repliement tridimensionnel adéquat d'autres protéines, exerçant ainsi un contrôle de la qualité. Il est démontré qu'une réponse au stress de protéine mal repliée existe en HTAP, particulièrement dans les CMLAPs (133) (134). La heat shock protein 90 ou HSP90 est une chaperonne conservée chez les eukaryotes et impliquée dans de nombreuses fonctions normales des cellules telles que la régulation du cycle cellulaire, la survie, la signalisation hormonale en plus de la réponse au stress (135) (136). HSP90, abondante dans les cellules saines, interagit avec plus de 200 protéines partenaires dites clientes. Son expression est même corrélée à une espérance de vie diminuée chez les patients de plusieurs types de cancers (137) (138) (139) (140) (141). Les protéines chaperonnes jouent un rôle dans le remodelage vasculaire en HTAP, HSP90 ayant récemment été identifiée comme étant surexprimée dans le plasma et les artérioles de patients atteints d'HTAP et son inhibition diminue le remodelage dans un modèle animal (142).

Les protéines ne pouvant être adéquatement reconformées seront soit dégradées par le système ubiquitine-protéasome ou formeront des agrégats qui devront être évacués par la cellule par un processus appelé autophagie. Il a été montré dans une forme d'HTAP associé que le système ubiquitine-protéasome était dérégulé, la quantité de polyubiquitine détectée dans le plasma étant significativement augmentée par rapport à des contrôles sains (143). L'autophagie semble aussi être augmentée en HTAP (144) (145) (146), et son inhibition par la chloroquine diminue le remodelage vasculaire dans un modèle monocrotaline d'HTAP (145).

Ces adaptations sont bénéfiques au niveau cellulaire, mais peuvent être vues comme des maladaptations, puisqu'elles permettent de perpétuer un phénotype nuisible pour l'organisme.

2.5.4 Épigénétique

La présence ou absence d'un gène ne réussit pas toujours à expliquer complètement les phénotypes observés. L'épigénétique se définit comme les changements héréditaires dans l'expression des gènes ne pouvant être expliqués par la modification de la séquence d'ADN. L'épigénome peut être modulé par le mode de vie, l'environnement, l'âge et la maladie. Des modifications épigénétiques sont de plus en plus montrées comme participant au développement de plusieurs pathologies, incluant l'HTAP. Nous réviserons ici trois classes d'acteurs épigénétiques d'intérêt en HTAP, soit les microARNs, la méthylation de l'ADN et les modifications des histones.

3.5.4.1 MicroARN

Les microARNs sont des séquences d'ARN non codantes d'une grandeur de 21 à 24 nucléotides régulant l'expression de gènes chez presque tous les eukaryotes (plantes, champignons, animaux). Ils agissent en réprimant l'expression d'un ARN messager (ARNm) cible, avec lequel ils partagent une complémentarité de séquence particulière, empêchant sa traduction. Plusieurs microARNs ont été identifiés comme étant anormalement modulés en HTAP, nous n'en couvrirons que quelques-uns.

Le microARN 204 est grandement sous exprimé dans les tissus pulmonaires HTAP, ayant pour conséquences de lever la répression d'une foule d'acteurs moléculaires telles que RunX2, BRD4, PARP-1, Hif1 α et NFAT discutés précédemment (94) (101) (130) (147). L'activation du facteur de transcription STAT3 serait responsable de la diminution de l'expression de ce microARN (147). La diminution de l'expression du microARN 126 a quant à elle été étudiée dans le muscle squelettique et les tissus cardiaques droits de patients HTAP (148) (149). La déficience en microARN 126 entraîne une diminution de la capacité à former de nouveaux vaisseaux sanguins, dit angiogénèse, dans ces deux types de tissus musculaires. Le rétablissement des niveaux du microARN 126 par l'intermédiaire d'un mimic synthétique permettait d'augmenter la capacité angiogénique de CE HTAP humaines lors d'essais matrigel et d'améliorer la fonction cardiaque et la tolérance à l'effort dans un modèle d'HTAP expérimentale (148) (149). L'équipe du Dr Chan a procédé à des analyses de réseau *in silico* permettant d'identifier la famille des microARN 130/131 comme étant des maîtres régulateurs potentiels des dérégulations observés en HTAP et en a validé plusieurs cibles prédites (150). Cette famille de microARN est surexprimée par plusieurs éléments déclencheurs connus en HTAP, comme l'hypoxie et l'inflammation, et jouerait un rôle central dans la plupart des voies déjà identifiées comme participant à la prolifération des CMLAPs et de CE HTAP.

3.5.4.2 Méthylation de l'ADN

L'ajout d'un groupement méthyle (CH_3) directement sur la séquence d'ADN est un autre mécanisme épigénétique pouvant réprimer l'expression d'un gène. Ce groupement méthyle se lie de manière covalente principalement à la base cytosine de l'ADN grâce à l'action d'un groupe de protéines catalytiques appelées méthyltransférases ADN (DNMT). À ce jour, un seul défaut de méthylation a été identifié comme participant au phénotype de l'HTAP. En effet, une hyperméthylation du gène *SOD2*, codant pour la protéine superoxyde dismutase 2, a été identifié comme une cible thérapeutique potentielle, car son inactivation provoquerait la prolifération et la résistance à l'apoptose de CMLAPs dans un modèle animal et chez l'humain (82). *SOD2* est une protéine qui régule les niveaux de peroxyde d'hydrogène dans les cellules, interagit avec $\text{Hif1}\alpha$, et a un rôle de gène suppresseur de tumeur (151). Une déficience en *SOD2* avait aussi été observée dans les lésions plexiformes de patients HTAPi (82). L'administration d'un inhibiteur de DNMT dans un modèle animal d'HTAP a permis de montrer que la diminution de méthylation du gène *SOD2* entraînait une amélioration des paramètres hémodynamiques et une diminution du remodelage artériel (152).

3.5.4.3 Modifications des histones

La modification des histones entraîne la promotion ou l'inhibition de l'expression de certains gènes via des marqueurs acétylé (CH_3CO). Ces modifications sont réversibles. Trois types de protéines lisent, écrivent et effacent ces modifications épigénétiques, soit respectivement les BETs (bromodomain and extra terminal domain family), les HATs (histone acétyl transférases) et les HDACs (histone désacétylase).

Les BETs détectent puis se lient aux queues acétylées des histones et facilitent la transcription des gènes. L'inhibition des BETs et plus spécifiquement de BRD4 permet de réduire la prolifération des CMLAPs isolées de patients HTAP, et améliore les paramètres hémodynamiques et le remodelage dans un modèle d'HTAP expérimentale (101). En effet, BRD4, dont l'expression augmentée en HTAP est la conséquence de la diminution du microARN 204, joue un rôle central dans l'expression de gènes participant à la mitose et à l'inhibition de l'apoptose (153). Son inhibition entraîne donc une diminution d'expression d'une quantité de protéines identifiées en HTAP précédemment discutées, telles que NFAT, survivin et p21 (101).

Les HATs (sont des enzymes ajoutant des groupements acétylés aux résidus lysines des histones, entraînant la relaxation de la chromatine et promouvant le recrutement de la machinerie de transcription des gènes. Aucune dérégulation des HATs n'a été observée à ce jour en HTAP.

Les HDACs sont des enzymes retirant des groupements acétylés des résidus lysines des histones. Certaines HDACs peuvent également avoir pour cible des protéines du cytosol; c'est le cas notamment d'HDAC6, qui sera traité plus en profondeur à la section 5 ci-après et qui est le sujet principal de la recherche présentée

dans ce mémoire. La désacétylation a généralement pour conséquence de modifier la structure de la chromatine, empêchant l'accès aux gènes par la machinerie de transcription. Onze HDACs ont été découvertes à l'heure actuelle, se divisant en quatre classes en fonction de leur structure, fonction et localisation dans la cellule: Classe I, II (a et b), III et IV. Plusieurs équipes ont rapporté une surexpression des différentes HDACs chez les patients HTAP comparativement à des donneurs sains dans différents tissus. Cependant, l'inhibition des HDACs avec des inhibiteurs non spécifiques (dits pan-HDAC) soulève des résultats mitigés et contradictoires. En effet, certains ont observé dans un modèle expérimental d'HTP une amélioration du remodelage et de l'hypertrophie cardiaque droite suivant une inhibition des HDACs de classe I (154) (155). Toutefois, ces résultats vont à l'encontre de ceux ne montrant aucun effet bénéfique des pan-HDAC sur des rats Su/Hx ou encore ceux montrant une détérioration de la fonction du ventricule droit dans un modèle d'hypertrophie cardiaque droite (156) (157). Ces contradictions soulèvent l'importance de ne pas négliger les effets secondaires potentiels de l'inhibition des processus épigénétiques. Il est raisonnable de penser que l'identification de cibles pour lesquels il existe des inhibiteurs spécifiques permettrait de pallier à ce problème.

3.5.4 La migration cellulaire

FAK (Focal adhesion kinase) est une protéine dont l'ARNm est augmenté dans plusieurs cancers et tumeurs malignes, particulièrement ovarien (158) et du sein (159), dont l'expression corrèle avec une diminution de la survie des patients (160). Cet oncogène est une tyrosine kinase cytoplasmique non réceptrice stimulant la migration cellulaire en réarrangeant le cytosquelette d'actine via sa coopération avec des protéines telles que la cortactine et la taline (161) (162). Cette protéine a été identifiée comme étant surexprimée dans les CMLAPs-HTAP, mettant de l'avant que la migration cellulaire pouvait contribuer au remodelage artériel. L'inhibition de FAK permet d'observer une diminution de la migration des CMLAPs-HTAP lors du test in vitro de fermeture de plaie et une diminution du remodelage dans le modèle monocrotaline.

Ainsi, le remodelage artériel observé en HTAP est un processus complexe impliquant chacune des couches cellulaires constitutives. Les CEs, directement exposées au sang, peuvent être sensibles à des changements d'oxygénation, de pression ou encore à des cellules inflammatoires circulantes. Elles peuvent devenir dysfonctionnelles et créer des lésions plexiformes, ou encore changer complètement de phénotype pour devenir mésenchymateuses et participer à l'épaississement de la media. Les fibroblastes, dans la couche externe des artères, peuvent s'activer et contribuer à la production d'un environnement inflammatoire perpétuel pour les cellules avoisinantes. Finalement, les CMLs adoptent un phénotype prolifératif et anti-apoptotique, régit par des changements métaboliques (hyperpolarisation des mitochondries, métabolisme du glucose), des changements ioniques (plusieurs canaux ioniques dérégulés), des changements moléculaires (facteurs de transcriptions, oncogènes, médiateurs circulants) et des changements épigénétiques

(méthylation, microARN, acétylation). Ce sont des cellules ayant un dommage à l'ADN et une augmentation de protéines mal repliées qui devraient suffire à provoquer l'apoptose, mais qui sont à ce point dérégées et adaptées au stress cellulaire qu'elles ne lisent plus le signal de leur environnement intra ou extra cellulaire.

4. Étude de l'HTAP: les différents modèles animaux

Plusieurs modèles sont utilisés pour l'étude de l'HTAP. Bien qu'aucun modèle préclinique actuellement disponible ne soit parfait, plusieurs d'entre eux permettent de mimer différents points phénotypiques clés de l'HTAP humaine, et ainsi d'explorer différentes avenues thérapeutiques ciblant ces caractéristiques. Je présente ci-après un résumé des modèles qui seront utilisés dans la partie *in vivo* de l'étude présentée au chapitre 2.

4.1. Monocrotaline

Le modèle murin Monocrotaline (MCT) est généralement étudié chez le rat. Un alcaloïde appelé crotaline, extrait de la plante *Crotalaria spectabilis*, est donné par injection unique sous-cutanée ou intra péritonéale le plus souvent à raison de 60mg/kg (163). La MCT entraîne une toxicité hépatique et cardio-pulmonaire tant chez l'animal que l'humain. Deux semaines suivant l'injection, la pression artérielle pulmonaire moyenne est augmentée, menant à une hypertrophie du cœur droit vers la troisième semaine (164). Ce modèle peu coûteux et reproductible permet d'obtenir des paramètres hémodynamiques et histopathologiques ainsi qu'une mortalité s'apparentant à l'HTAP humaine en peu de temps (164) (165). Cependant, l'initiation du phénotype diffère de l'HTAP humaine. En effet, avant l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (mPAP), il y a une augmentation de la perméabilité vasculaire pulmonaire, une perte de l'intégrité de la barrière endothéliale vasculaire et une infiltration massive de cellules inflammatoires dans l'adventice des artères pulmonaires (165), des caractéristiques qui ne sont pas observées chez l'humain. Enfin, ce modèle est souvent critiqué comme étant une approximation de la pathologie humaine, car une panoplie d'approches thérapeutiques semble prévenir ou renverser l'HTAP provoquée chez l'animal (166). Il est en revanche important de mentionner que le modèle MCT a permis l'introduction de trois classes de traitements utilisés en clinique, soit les inhibiteurs de la phosphodiesterase de type 5, les antagonistes des récepteurs de l'endothéline et les analogues de la prostacycline (163).

4.2 Hypoxie chronique

Le modèle d'hypoxie chronique a longtemps été le plus utilisé pour l'étude de l'HTAP sur différentes espèces, plus fréquemment sur les rats et les souris. Il s'agit d'exposer les animaux 3 à 4 semaines à une concentration d'oxygène diminuée ou en chambre hypobarique pour créer l'hypoxie (167). Il en résulte une élévation de la mPAP, une muscularisation des petites artères habituellement non muscularisées, ainsi qu'une hypertrophie

et prolifération augmentée des CMLAPs (167) (168) (169). Les animaux développent une certaine hypertrophie cardiaque droite, sans pour autant avoir de signe de défaillance cardiaque (170). Cependant, le modèle possède plusieurs limitations : le phénotype peut être renversé lors d'un retour à une concentration d'oxygène normale, et le remodelage vasculaire ne forme pas de lésions plexiformes complexes pertinentes à l'étude de l'HTAP humaine (170) (171).

4.3 Sugén 5416/hypoxie

Comme le modèle monocrotaline, le modèle sugén 5416/hypoxie (Su/Hx) est principalement étudié chez le rat. Il s'apparente au modèle d'hypoxie chronique, qui consistait à mettre les animaux en basse concentration d'oxygène (10%) pour une période de 3 semaines. Le modèle Su/Hx combine l'injection d'un inhibiteur du récepteur 2 du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR2) par le composé sugén 5416 (sémazanib) et une hypoxie de trois semaines (172). Une période de retour en normoxie, habituellement de quatre semaines, mais pouvant se prolonger jusqu'à 14 semaines, permet d'obtenir un remodelage néointimal des artérioles, une élévation de la mPAP et une hypertrophie cardiaque droite (172) (173). Contrairement aux animaux du modèle d'hypoxie chronique qui avaient un phénotype réversible, les animaux Su/Hx ont un développement progressif et soutenu dans le temps de l'hypertension pulmonaire (174). Les mécanismes de ce modèle sont encore grandement incompris. Nous savons toutefois que le composé sugén 5416 inhibe différentes tyrosines kinases en plus du VEGFR2 (175) (176), dont certaines identifiées comme étant impliquées en HTAP humaine. Lorsque les rats sont laissés pour une période prolongée en normoxie, ils viennent à développer des lésions néointimales complexes s'apparentant grandement aux lésions plexiformes observées chez l'humain (174). Ce modèle est d'ailleurs le seul à récapituler cette caractéristique, l'amenant à être considéré comme le modèle préclinique murin le plus pertinent actuellement disponible.

5. L'histone désacétylase 6

L'identification d'un facteur permettant d'intégrer une ou plusieurs des voies de signalisations précédemment abordées et dérégulées en HTAP est nécessaire pour élaborer une stratégie thérapeutique efficace. Plusieurs raisons portent à croire que l'histone désacétylase 6 (HDAC6) pourrait être une cible d'intérêt.

5.1 Structure et fonctions

HDAC6 est une histone désacétylase de classe IIb. Les détails des structures fonctionnelles de cette protéine sont schématisés à la figure 1-6. Elle est principalement cytoplasmique en raison des domaines fonctionnels d'exclusion nucléaire (NES) et d'ancrage au cytoplasme (motif SE14). Elle contient également un domaine de liaison pour la protéine motrice dynéine, permettant à la protéine de se déplacer sur les microtubules. HDAC6

possède aussi un domaine de liaison à l'ubiquitine et a la particularité d'inclure deux domaines catalytiques de désacétylation (fig.1-6) (177). Avec ses 1215 acides aminés, c'est l'histone désacétylase la plus grande et la seule à avoir deux domaines catalytiques (177).

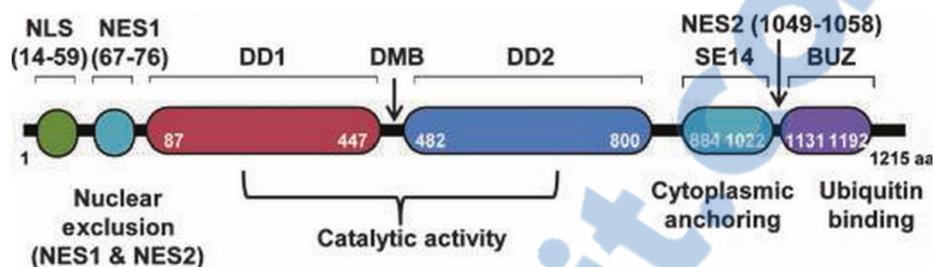


FIGURE 1-6 : REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DE LA STRUCTURE FONCTIONNELLE D'HDAC6 (177)

Les modèles murins d'inactivation génique d'HDAC6 (KO) sont étonnamment viables et sans phénotype apparent en conditions normales, hormis l'hyperacétylation de l' α -tubuline, le substrat principal d'HDAC6 (178). Cette information nous laisse penser qu'HDAC6 ne joue pas de rôle indispensable au maintien des fonctions cellulaires normales, mais agirait dans le « *fine tuning* » de différentes voies de signalisation et en réaction à des situations de stress cellulaire. Là est tout l'intérêt d'étudier son impact potentiel en HTAP, car son inhibition pourrait cibler les cellules malades, en état de stress, et ne pas affecter les cellules saines.

5.2 Intérêts potentiels multiples en HTAP

Les premières observations des rôles d'HDAC6 montraient son association aux microtubules, ayant comme substrat principal l'acétyl- α -tubuline (179). Depuis, il a été découvert qu'HDAC6 peut cependant interagir et activer une quantité diverse de protéines par leur désacétylation et ce, dans plusieurs processus cellulaires tels que l'angiogénèse, l'inflammation, la survie cellulaire, la dégradation des protéines par autophagie ou encore la migration (177), toutes des fonctions dérégulées en HTAP précédemment discutées. Surexprimée dans une quantité de cancers, HDAC6 est nécessaire à la transformation oncogénique (180) et est associée à l'augmentation de la prolifération cellulaire et la résistance à l'apoptose (181) (182).

HDAC6 a été identifié comme réagissant avec différentes voies principales en HTAP, telle que celles impliquant PDGF, les ROS, Hif1- α et RunX2 (82) (94) (114) (132). Aussi, HDAC6 est un facteur de surveillance des stress impliquée dans une quantité appréciable de voies dérégulées précédemment abordées, pour contrer l'accumulation de protéines mal repliées via l'interaction avec HSP90 et l'autophagie (183) (184) (185) (136) (186) (187), ou encore via la réparation des dommages à l'ADN et l'évasion de l'apoptose en collaborant avec les protéines KU70 et Bax (188) (189).

5.2.1 HDAC6 et le cycle cellulaire

HDAC6 joue également un rôle dans la prolifération et la croissance cellulaire. En effet, dans des cellules de glioblastome multiforme, il a été montré que l'inhibition spécifique d'HDAC6 par l'ACY-1215 réduisait la croissance et la survie cellulaire mesurée par essai MTT en induisant la phosphorylation de SMAD2 (190). En effet, la translocation nucléaire de SMAD2 suivant sa phosphorylation mène à l'induction de l'expression de p21, un inhibiteur du cycle cellulaire. TGF- β 1 étant également capable de phosphoryler fortement SMAD2, le groupe de Li et al (190) ont exposé les cellules à un recombinant TGF- β 1 et observé une nette augmentation de la phosphorylation de SMAD2 et l'expression de p21, sans effet sur l'expression d'HDAC6. Ils en ont conclu qu'HDAC6 promeut la croissance et la survie cellulaire en atténuant le signal de TGF- β 1, c'est-à-dire en inhibant la phosphorylation de SMAD2, empêchant l'expression subséquente de p21.

Aussi, le facteur de transcription RUNX2, discuté précédemment, interagit avec HDAC6 en le recrutant au noyau (191). Dans des ostéoblastes (cellules des os), ils assurent ensemble la répression du gène p21 directement sur son promoteur, une étape nécessaire à la différenciation des cellules ostéoblastiques (192). Comme nous avons identifié que RUNX2 est impliqué dans la pathogénèse de l'HTAP (94), et particulièrement dans un phénomène de différenciation des CMLAPs en un phénotype de type ostéoblastique, nous pouvons supposer qu'HDAC6 pourrait aussi être impliquée.

5.2.2 HDAC6 et les ROS

L'inhibition d'HDAC6 par siARN chez des cellules de mélanome a provoqué un arrêt du cycle cellulaire et une augmentation de l'apoptose (193). D'un point de vue mécanistique, l'inhibition d'HDAC6 par interférence à l'ARN augmente la production de ROS, menant à différentes dysfonctions mitochondriales incluant la perte de potentiel de membrane mitochondriale ($\downarrow \Delta \Psi_{mt}$) et une réduction du nombre de copies d'ADN mitochondrial. Ils ont de plus montré de manière élégante qu'un prétraitement au N-acétyl-L-cystéine (NAC), un antioxydant inhibiteur de ROS, empêchait la perte de $\Delta \Psi_{mt}$, l'inhibition de la prolifération et l'apoptose provoquée par le siHDAC6. Ces résultats mènent donc à penser que l'inhibition d'HDAC6 inhibe la croissance et augmente l'apoptose de manière ROS dépendante dans des cellules cancéreuses de type mélanome.

Deux nouveaux substrats d'HDAC6 ont récemment été identifiés, venant confirmer l'implication d'HDAC6 dans le contrôle des ROS. En effet, les peroxiredoxines (Prx) I et II interagissent directement avec HDAC6 et l'inhibition de ce dernier par siARN ou par la tubacin entraîne l'accumulation des formes acétylées de Prx I et II. Les Prx agissent comme antioxydant, et la forme acétylée des Prx a une activité plus grande que la forme non acétylée (194). Or, une étude du remodelage vasculaire dans un modèle d'angioplastie de la carotide a

montré que des souris Prx II (-/-) avaient un remodelage vasculaire plus important via une modulation de la phosphorylation du récepteur PDGF que les souris sauvages Prx II(+/+) (195). En effet, l'étude identifie Prx II comme régulateur négatif de la signalisation PDGF, très étudiées pour son implication dans la prolifération et la migration de CML lors d'un remodelage vasculaire, entre autres en HTAP. Mis ensemble, il est tentant de supposer qu'une expression augmentée d'HDAC6 entraînerait une accumulation de Prx II désacétylée moins active, et favoriserait la signalisation PDGF. Inversement, l'inhibition d'HDAC6 résulterait en une diminution de la signalisation PDGF.

5.2.3 HDAC6 et Hif1- α

Des inhibiteurs d'HDAC6 permettaient d'induire la dégradation d'HIF-1 α par le protéasome dans des conditions normoxiques et de réduire son activité transcriptionnelle (196) (197). L'équipe de Chen et al. dans une étude portant sur l'angiogénèse hypoxique, a quant à elle montré que l'inhibition d'HDAC6 par interférence à l'ARN bloque l'activation d'Akt et réduit l'expression d'Hif-1 α et de VEGF (198). De plus amples investigations sont nécessaires à une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels HDAC6 interagit avec Hif1- α , ce dernier étant un régulateur principal de plusieurs changements moléculaires observés en HTAP.

5.2.4 HDAC6 et HSP90

Un autre substrat notable d'HDAC6 est le heat shock protein 90 (HSP90). Comme précédemment mentionné, HSP90 est surexprimée dans les artérioles de patients HTAP et serait impliquée dans le remodelage artériel observé (142). L'acétylation d'HSP90, comme plusieurs protéines, entraîne une diminution de l'activité de celle-ci. HDAC6 a été identifié comme activateur d'HSP90 via sa désacétylation (136). L'inhibition d'HDAC6 a été associée à une diminution du métabolisme mitochondrial via la désacétylation d'HSP90 présent dans la mitochondrie de cellules cancéreuses (199). Elle est aussi associée à une diminution de la capacité d'HSP90 à lier l'ATP et à effectuer ses fonctions de protéine chaperonne (200). Aussi, fait intéressant, HDAC6 est elle-même une protéine cliente d'HSP90, indiquant qu'HSP90 peut assurer sa propre activité via une boucle de rétrocontrôle impliquant HDAC6 (201).

5.2.5 HDAC6 et l'autophagie

L'autophagie est un vaste domaine d'étude en biologie cellulaire dont la voie de signalisation est de plus en plus étudiée en lien avec différentes pathologies neurologiques, cancéreuses et cardiovasculaires. Comme mentionné précédemment, ce mécanisme prosurvie pourrait être impliqué dans le développement d'un phénotype HTAP des cellules artérielles pulmonaires en empêchant les amas de protéines mal repliées d'entraîner la cytotoxicité. HDAC6 jouerait un rôle central dans différentes étapes de l'autophagie et sa déplétion empêcherait le processus d'être complété de manière appropriée, entraînant l'accumulation

d'agrégats de protéines. En effet, HDAC6 est nécessaire d'abord pour la reconnaissance des amas de protéines mal repliés grâce à son domaine de liaison à l'ubiquitine (184). Ensuite, le domaine de liaison à la dynéine d'HDAC6 permet le transport rétrograde du cargo en direction du noyau de la cellule sur les microtubules (183). Ces amas s'accumuleront donc en périphérie du noyau. Pour que l'autophagie soit complète, il y a formation d'une membrane autour du cargo pour le séquestrer du cytoplasme. L'endosome ou autophagosome ainsi formé devra finalement être fusionné à un lysosome, processus nommé maturation, pour permettre la dégradation de son contenu. Hors l'inhibition de l'expression d'HDAC6 empêche la maturation des autophagosome (186). Dans la maladie de Parkinson, lorsqu'il y a translocation de la protéine parkin, HDAC6 s'agglomère autour de mitochondries et facilite leur dégradation autophagique, un processus appelé mitophagie (202) (203). HDAC6 occupe un rôle central dans l'homéostasie d'une cellule via l'autophagie et ce dans le contexte de plusieurs maladies.

5.2.6 HDAC6 et la migration cellulaire

La cortactine (cortical actin binding protein) est une protéine se liant à la F-actine, localisée au cortex cellulaire (près de la membrane interne), là où la principale activité de remodelage du cytosquelette d'actine s'effectue pour la migration. Lorsqu'elle est acétylée, la cortactine aura plutôt tendance à se situer dans le noyau, où elle n'a pas d'effet sur la migration cellulaire (204). La cortactine a aussi été identifiée comme une cible de la désacétylation d'HDAC6 (205). Ainsi, on peut supposer qu'une surexpression d'HDAC6 aura pour effet de promouvoir une localisation cytoplasmique de la cortactine, et ainsi favoriser la migration cellulaire. De plus, l'inhibition d'HDAC6 a été montrée comme permettant de diminuer la migration cellulaire, potentiellement par l'augmentation du niveau d'acétylation de la tubuline (206). Il a été proposé que l'acétylation de l' α -tubuline ait une corrélation avec la dynamique des microtubules. En effet, lorsqu'exposés à des agents dépolymérisant, les microtubules ont un rythme de désassemblage plus faible lorsque l' α -tubuline est acétylée lors de l'inhibition d'HDAC6 (207). En collaborant avec deux protéines importantes du cytosquelette, la cortactine et la tubuline, HDAC6 est impliquée dans les processus de migration cellulaire.

5.2.7 HDAC6 et le dommage à l'ADN

Dans plusieurs types de cancer, il a été montré *in vitro* que l'ajout d'inhibiteur d'HDAC6 à une chimiothérapie (cisplatine, étoposide, doxorubicin) permettait d'en améliorer l'effet (188) (208). En effet, ces agents chimiothérapeutiques visent à tuer les cellules cancéreuses en augmentant les dommages à l'ADN. Lorsqu'on les combine à l'inhibition d'HDAC6, on peut observer *in vitro* une augmentation du dommage à l'ADN par rapport à la chimiothérapie seule, c'est-à-dire une augmentation de γ -H2AX, un marqueur précoce de cassures double brin de l'ADN. Le mécanisme par lequel HDAC6 protégerait les cellules du dommage à l'ADN est peu compris, mais pourrait impliquer la protéine KU70. C'est une protéine pouvant exercer plusieurs fonctions dans la cellule selon sa localisation. Dans le noyau, KU70 forme un hétérodimère avec KU80.

Ensemble, elles s'occupent de la réparation des dommages à l'ADN double brin (209). Chaudhary et ses collaborateurs ont montré qu'HDAC6 désacétyle KU70 sous la supervision de la protéine SMAR1 lors de la survenue de dommages à l'ADN par irradiation (210). La forme désacétylée de KU70 peut alors être recrutée aux sites de dommages, interaction impossible sous sa forme acétylée. La forme désacétylée de KU70 peut aussi séquestrer Bax, interaction qui fera l'objet de la prochaine section.

De plus, en réponse au dommage à l'ADN provoqué par l'adriamycine, RUNX2 aide à éluder l'apoptose p53-dépendante avec l'aide d'HDAC6 (211). En effet, HDAC6 fait partie d'un complexe avec RUNX2 et p53 se liant au promoteur de p53 en réponse au dommage à l'ADN. Ensemble, ils empêchent la transcription de gène cible de p53.

5.2.8 Interaction clé : HDAC6/KU70/Bax

La protéine KU70 joue différents rôles selon sa localisation cellulaire et son état d'acétylation. Lorsque présente dans le cytosol, la protéine KU70 désacétylée par HDAC6 séquestre la protéine Bax dans le cytosol (210). Bax fait partie de la famille BCL-2 ayant la capacité de provoquer l'apoptose en transloquant à la mitochondrie. Lorsque KU70 est sous sa forme acétylée, le complexe formé avec Bax se dissocie, initiant l'apoptose. De manière très intéressante, les souris mutées déficientes en KU70 exhibent une diminution du temps d'accélération du flux de l'artère pulmonaire, des occlusions vasculaires et une hypertrophie cardiaque droite par rapport aux souris de génotype sauvage, des signes de développement d'hypertension pulmonaire (212).

Cette interaction HDAC6/KU70/Bax pourrait donc être cruciale dans le maintien d'un phénotype anti-apoptotique observé en HTAP. La disruption de cette interaction pourrait être une stratégie intéressante pour provoquer l'apoptose mitochondriale dépendante des CMLAPs HTAP, une approche attrayante pour diminuer la quantité de cellules dans les artères pulmonaires.

Problématique

L'hypertension artérielle pulmonaire est une maladie rare qui présente un taux de survie équivalent à des patients atteints de cancer du sein avancé (Fig.1-7). La recherche de nouvelles thérapies pour l'HTAP fait donc l'objet d'une recherche intensive et grandissante, ayant explosé dans les 20 dernières années (fig.1-7). Malgré toute l'attention portée, l'HTAP demeure une maladie multi-systémique complexe à la pathogénèse incomplètement comprise. C'est probablement en partie pourquoi les thérapies actuellement approuvées en cliniques et fréquemment utilisées (les inhibiteurs de la phosphodiesterase 5, les antagonistes des récepteurs à l'endothéline et les analogues de la prostacycline) réussissent au mieux à stabiliser les patients, mais ne renversent pas l'HTAP. Ces thérapies incomplètement efficaces représentent un fardeau fiscal important pour les patients (particulièrement aux États-Unis où l'assurance maladie n'est pas universelle) et les gouvernements. Le besoin pour de nouvelles thérapies qui ciblent le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des cellules artérielles pulmonaires malades sans causer de dommage aux cellules saines est criant.

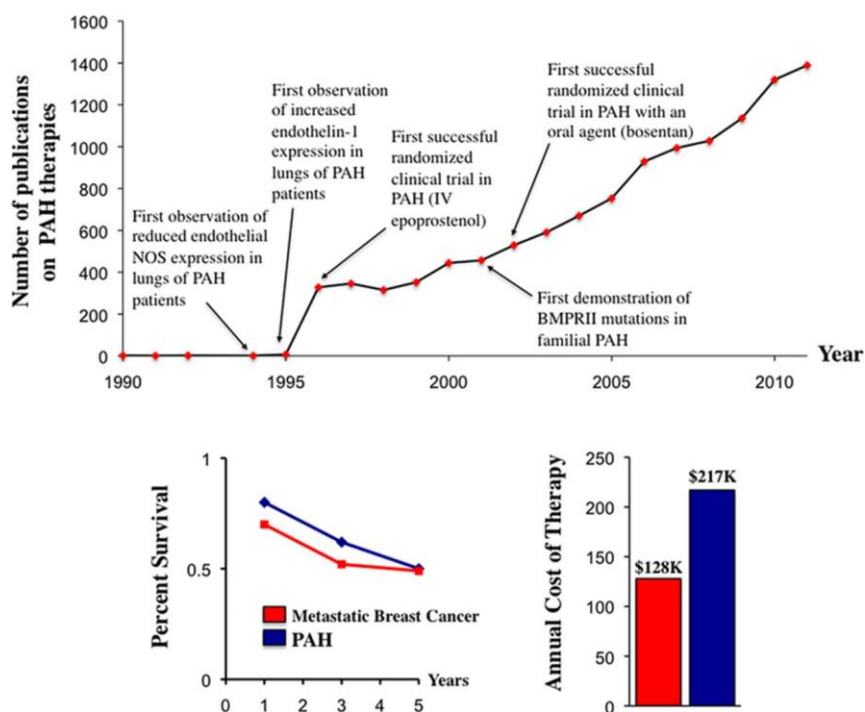


FIGURE 1-7: PUBLICATIONS RELIÉES AUX THÉRAPIES HTAP, PRONOSTIC GLOBAL DE L'HTAP ET FARDEAU FISCAL DE CELLES-CI -

ADAPTÉE DE MICHELAKIS (213)

Hypothèses

Nous avons émis l'hypothèse que le niveau d'expression d'HDAC6 serait augmenté dans les tissus et cellules isolées de patients atteints d'HTAP comparativement aux sujets sains et contribuerait au phénotype anormal des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires.

Nous avons aussi émis l'hypothèse qu'HDAC6 représente une cible thérapeutique permettant de diminuer le remodelage artériel pulmonaire dans deux modèles précliniques in vivo, et qu'alternativement, les souris knockout pour HDAC6 seraient protégées contre le développement de l'HTAP.

Objectifs de travail

L'objectif élargi de ma maîtrise fut de déterminer le rôle de l'histone désacétylase 6 dans le développement de l'hypertension artérielle pulmonaire, et plus particulièrement son implication dans le remodelage des artères pulmonaires distales. Les objectifs spécifiques ont été de:

- 1- Déterminer les niveaux d'expression d'HDAC6 en HTAP humaine et expérimentale;
- 2- Vérifier l'effet de l'inhibition d'HDAC6 sur les cellules musculaires lisses en culture en ce qui a trait au débalancement prolifération/apoptose et au niveau d'acétylation de KU70;
- 3- Tester l'inhibition d'HDAC6 in vivo sur deux modèles précliniques d'HTAP expérimental (MCT et Su/Hx) et vérifier si le remodelage artériel en est diminué;
- 4- Évaluer la susceptibilité des souris mutantes HDAC6 au développement de l'HTAP dans un modèle expérimental d'hypoxie chronique.

CHAPITRE 2 : Insertion d'article

HDAC6: A Novel Histone Deacetylase Implicated in Pulmonary Arterial Hypertension

Olivier Boucherat, PhD^{*1}, Sophie Chabot, BSc^{*1}, Roxane Paulin, PhD¹, Isabelle Trinh, MSc¹, Alice Bourgeois, BSc¹, François Potus, MSc¹, Marie-Claude Lampron, BSc¹, Caroline Lambert, MSc¹, Sandra Breuils-Bonnet, MSc¹, Valérie Nadeau, PhD¹, Renée Paradis, BSc¹, Elena A Goncharova, PhD², Steeve Provencher, MD, MSc¹, and Sébastien Bonnet, PhD¹

*O. Boucherat and S. Chabot have equally contributed to the study

¹ Pulmonary Hypertension and Vascular Biology Research Group, Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec, Université Laval, Department of Medicine, Québec, Canada.

² Pittsburgh Heart, Lung, Blood and Vascular Medicine Institute, University of Pittsburgh, Pittsburgh, PA

Corresponding author: Olivier Boucherat
2725, chemin Sainte-Foy, office A2138
Québec (QC) G1V 4G5
Phone: 418-656-8711 ext 1487
e-mail: olivier.boucherat@criucpq.ulaval.ca

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a vascular remodeling disease with limited therapeutic options. Although exposed to stressful conditions, pulmonary artery (PA) smooth muscle cells (PASMCs) exhibit a “cancer-like” pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype. HDAC6 is a cytoplasmic histone deacetylase implicated in the regulation of multiple pro-survival mechanisms and overexpressed in response to stress in cancer cells. Due to the similarities between cancer and PAH, we hypothesized that HDAC6 expression is increased in PAH-PASMCs to face stress allowing them to survive and proliferate, thus contributing to vascular remodeling in PAH. We found that HDAC6 is significantly up-regulated in lungs, distal PAs, and isolated PASMCs from PAH patients and animal models. Inhibition of HDAC6 reduced PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis *in vitro* sparing control cells. Mechanistically, we demonstrated that HDAC6 deacetylates Ku70, blocking the translocation of Bax to mitochondria and preventing apoptosis. *In vivo*, pharmacological inhibition of HDAC6 improved established PAH in two experimental models and can be safely given in combination with currently approved PAH therapies. Moreover, *Hdac6* deficient mice were partially protected against chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. Our study shows for the first time that HDAC6 is implicated in PAH development and represents a new promising target to improve PAH.

INTRODUCTION

Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a complex and multifactorial disease characterized by a progressive elevation of pulmonary vascular resistance, due to a cancer-like proliferative and apoptosis resistant phenotype of pulmonary artery (PA) cells including smooth muscle cells (PASMCs) and endothelial cells (PAECs)¹. This ultimately leads to right ventricular (RV) failure and premature death. Despite recent advances in molecular pathogenesis and treatment, none of the current treatment strategies cures this devastating condition². Therefore, the identification and characterization of new targets specifically implicated in this pathological state and simultaneously disabling more than one mechanism of disease development and progression is a pressing need³. Interestingly, the documentation of numerous similarities shared by PAH and cancer cells⁴⁻⁷, brings an emerging paradigm in PAH pathology, opening to the possibility of exploiting therapeutic strategies used in cancer to treat PAH.

It is now established that PAH cells react to a hostile environment with adaptive and cytoprotective responses, allowing them to survive and proliferate and leading to intense remodeling of distal PAs. Central to these strategies are the over-activation of the DNA repair machinery⁸⁻¹⁰, the metabolic switch associated with resistance to mitochondrial-mediated cell death^{11,12}, the overexpression of molecular chaperones coping with the increasing number of misfolded proteins¹³, and the promotion of their clearance by autophagy¹⁴. Conversely, if stress stimuli go beyond a certain threshold, a variety of proapoptotic pathways culminating in cell death ensue, prevailing over the cytoprotective arms of the stress response. Thus, inhibiting these “over-efficient” stress coping mechanisms offers the opportunity to selectively induce stress overload and reverse the proliferative and anti-apoptotic phenotype in PAH cells.

Accumulated evidence pointed to histone deacetylase 6 (HDAC6) as an important druggable stress surveillance factor through its implication in multiple adaptive mechanisms aiming to prevent or cope with stress¹⁵⁻¹⁷. Contrary to nuclear HDACs implicated in epigenetic regulation of transcription, HDAC6 is a mainly localized cytoplasmic deacetylase involved in “non-histone” functions¹⁸. HDAC6 is overexpressed in many cancers and HDAC6 inhibitors display beneficial effects in various experimental models of cancer that shares several features with PAH^{19,20}. Importantly, HDAC6 does not deacetylate histones, and accordingly, the anticancer effects of the HDAC6-specific inhibitors are not associated with disrupted epigenetic control of gene transcription²¹. In directly influencing the acetylation status of several key cytosolic proteins^{16-18,22}, HDAC6 was reported to control numerous processes, impacting cell migration, proliferation and survival, all of which are important features of PAH^{1,23}. Indeed, HDAC6 promotes DNA repair and depletion or inhibition of HDAC6 sensitizes transformed cells to DNA damaging agents such as etoposide and doxorubicin²⁴⁻²⁶. Moreover, HDAC6 was reported to exert a protective role when cells are faced to stress in coordinating the clearance of misfolded protein aggregates prior to their engulfment in autophagosomes^{27,28} and by preventing the translocation of apoptotic signaling proteins from the cytosol to the mitochondria^{16,25}. As a consequence,

HDAC6 has emerged as a regulator of cell response to cytotoxic assaults. We therefore hypothesized that, as observed in many cancers, HDAC6 is overexpressed in PAH contributing to proliferation and resistance to apoptosis of PSMCs and that selective HDAC6 inhibition may represent a promising novel approach for the treatment of PAH.

RESULTS

Increased expression of HDAC6 in human PAH and experimental models.

Expression level of HDAC6 was measured by Western blot in lungs (n=7-12) and distal PAs (n=4-5) from control and PAH patients (Fig. 1A). As shown, HDAC6 was either not detected or barely detectable in lung tissues and distal PAs from control subjects, but was readily visualized in lung tissues from PAH patients. To confirm our results and identify the cell type responsible for augmented HDAC6 expression in human PAH lungs, we performed dual-immunofluorescence staining for alpha-smooth muscle actin (α SMA) and HDAC6. We noted that immunoreactivity for HDAC6 was considerably stronger in the lungs from PAH patients compared to the control lungs with a marked increase in PSMCs from the remodeled distal PA, as observed by the high degree of overlap between these two staining patterns (Fig. 1B). Similar findings were observed in the MCT and Su/Hx models (Fig. 1C and 1D). To further substantiate our findings, we analyzed the expression level of HDAC6 in primary cultured human PAH-PSMCs. In agreement with the above results, HDAC6 protein expression but not mRNA was robustly increased in PAH-PSMCs compared to control cells (Fig. 1A and Supplementary Figure S1). Interestingly, the acetylation level of α -Tubulin, a substrate of HDAC6¹⁸, was not changed between control and PAH-PSMCs (Supplementary Figure S1) suggesting that the increased activity of HDAC6 in these cells is counterbalanced by histone acetyltransferases as previously observed in other diseases²⁹. In addition to PAH-PSMCs, HDAC6 was overexpressed in PAH-PAECs and PAH-RV as well as in the RV of rats exposed to Su/Hx and MCT (Supplementary Figure S1 and S2).

Heat Shock Protein 90 (HSP90) regulates HDAC6 expression in PAH-PSMCs.

To identify the mechanism responsible for HDAC6 overexpression in PAH-PSMCs, we focused our attention on HSP90. HSP90 is a central coordinator of an extensive array of cellular pathways upon stress through the stabilization of a wide range of proteins, which allows cells to survive and efficiently adapt to harmful conditions³⁰. Given that HSP90 was recently found to be up-regulated in PAH¹³ and stabilizes HDAC6 in cancer cells^{13,22}, we thus hypothesized that the same mechanisms operate in PAH-PSMCs. We first measured HSP90 expression in isolated PSMCs from control and PAH patients. As observed for HDAC6, HSP90 was markedly overexpressed in human PAH (Fig.2A). To determine whether the upregulation of

HSP90 accounts for HDAC6 stabilization and thus its overexpression in PAH-PASMCs, pharmacological inhibition of HSP90 activity with AT13387 or 17-AAG or siRNA-mediated knockdown of HSP90 was performed. AT13387 (Fig. 2B) or 17-AAG (Supplementary Figure S3) treatments dose-dependently reduced HDAC6 protein abundance, correlating with a progressive acetylation of α -Tubulin. Similarly, HSP90 silencing resulted in a significant decrease in HDAC6 protein expression in PAHPASMCs when compared with scrambled siRNA (Fig. 2C). Taken together, these findings support our hypothesis that increased expression of HSP90 in PAH-PASMCs maintains HDAC6 protein abundance and activity.

HDAC6 inhibition rescues the pro-proliferative, anti-apoptotic and pro-migratory phenotype of PAH-PASMCs.

The exaggerated migration, proliferation and survival of PASMCs is responsible for vascular remodeling in PAH¹. Because HDAC6 has pro-migratory, pro-proliferative and anti-apoptotic functions in various cancer cell types, we investigated whether HDAC6 contributes to these functions in PAH-PASMCs. To this end, *in vitro* loss-of-function approaches using molecular and pharmacological tools were conducted. Inhibition of HDAC6 activity in PAH-PASMCs was first achieved using Tubastatin A (TubA) and ACY- 775, two pharmacological inhibitors of HDAC6^{31,32} as well as by small interfering RNA. PAH-PASMCs exposed to TubA or ACY-775 displayed a dose-dependent increase in the amount of acetylated α - Tubulin¹⁸ without affecting the total levels of α -Tubulin and the global degree of histone H3 acetylation, thus confirming the selectivity of these inhibitors for HDAC6 (Supplementary Figure S4). Similar findings were observed following HDAC6 knockdown (Supplementary Figure S4). As expected, PAHPASMCs had a significantly greater proliferation rate (as assessed by Ki67 labeling) and were more resistant to apoptosis (as assessed by Annexin V assay) when compared to control PASMCs. Inhibition of HDAC6 by TubA, ACY-775 or siHDAC6 significantly decreased PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis (Fig. 3 and Supplementary Figure S4). Importantly, inhibition of HDAC6 had no effect on control PASMCs (Fig. 3), indirectly validating our above findings showing that HDAC6 is not or weakly expressed in these cells. Moreover, we found that pharmacological or molecular inhibition of HDAC6 reduced PAH-PASMC migration, as assessed by scratch wound assay *in vitro* (Supplementary Figure S5).

HDAC6 inhibition causes Bax-induced cell death by increasing acetylation of cytosolic Ku70.

We and others have previously demonstrated that mitochondria from PAH-PASMCs exhibit abnormalities rendering these cells less sensitive to apoptotic stimuli^{4,11}. Several cytosolic acetylated proteins have been

identified as direct target of HDAC6. Among these, we paid particular attention to Ku70, a multifunctional protein for which acetylation correlates with susceptibility to mitochondrial-dependent apoptosis^{16,33,34}. To demonstrate that HDAC6 inhibits Ku70 acetylation, enhancing Ku70-Bax binding and preventing stress-induced apoptosis, we first measured the acetylation level of Ku70 at lysine 539 (a critical acetylation site that influences Ku70-Bax binding)^{16,34} in PAH-PASMCs exposed to HDAC6 inhibitors. As assessed by Western blots, TubA, ACY-775 and siHDAC6 treatments increased acetylation of Ku70 in a dose-dependent manner (Fig. 4A), suggesting Bax release and translocation to mitochondria. A similar finding was observed after inhibition of HSP90 confirming our previous results showing that HSP90 promotes HDAC6 expression (Supplementary Figure S6). Because HDAC6 efficiently deacetylates K539 *in vitro*, we thus hypothesized that acetylation level of Ku70 is abnormally low in PAH cells. To examine this hypothesis, we measured the level of acetylated(K539)-Ku70 levels in human PAs from control and PAH patients. We found that the acetylated(K539)/total Ku70 ratio was reduced in PA cells from PAH patients compared to their normal counterparts (Fig. 4B). To demonstrate that inhibition of HDAC6 is accompanied by translocation of Bax to the mitochondria, serum-starved PAH-PASMCs treated or not with TubA or ACY-775 for 48 hours were subjected to immunofluorescence labeling for Bax and mitochondria were stained with MitoTracker Red. We found that consistent with our previous finding showing that inhibition of HDAC6 is associated with decreased resistance to apoptosis, inhibition of HDAC6 in PAH-PASMCs resulted in a greater colocalization of Bax with MitoTracker (Supplementary Figure S7). To further strengthen the role of HDAC6 in the context of Bax-mediated cell death, PAH-PASMCs were pre-treated with a cell permeable Bax-inhibiting peptide (BIP)-V5 designed from the Bax inhibiting domain of Ku7035 followed by HDAC6 inhibition under starvation conditions. Pretreatment with BIP-V5 significantly rescued cells from apoptosis induced by HDAC6 inhibition, whereas no effect was detected with a negative control peptide (Fig. 4C). Taken together, these results indicate that HDAC6 protects PAH-PASMCs from stress-induced mitochondrial apoptosis through Ku70 deacetylation and sequestration of Bax in the cytosol.

Pharmacological inhibition of HDAC6 improves pulmonary hypertension in the Sugen/Hypoxia rat model and provides a therapeutic effect comparable to the combination of standard PAH therapies.

To validate our *in vitro* findings, we performed *in vivo* studies in the Sugen/Hypoxia (Su/Hx) rat model to test whether treatment with TubA is able to reverse PAH. Once PAH establishment was echocardiographically confirmed (five weeks post Sugen injection), TubA (25 mg/kg) was administered daily via intraperitoneal injection for two weeks (Fig. 5A). We demonstrated that TubA significantly improved RV systolic pressure (RVSP) and mean PA pressure (mPAP) in Su/Hx-treated rats, as assessed by right heart catheterization (Fig. 5B). Although not statistically significant, inhibition of HDAC6 tends to result in an increase in cardiac output

(CO) and a decrease in right ventricular hypertrophy measured by Fulton index (Fig. 5B). Moreover, treatment with TubA resulted in a diminution of the total pulmonary vascular resistance (TPR) (Fig. 5B). To enhance the translational potential of TubA, we compared the efficacy of TubA alone or in combination with currently approved PAH therapies, namely Macitentan and Tadalafil. We found that TubA alone provides similar therapeutic effects than a combination of Macitentan and Tadalafil (Fig. 5B). Moreover, we confirmed that TubA administration decreased HDAC6 activity *in vivo* by assessing acetylated(K539)-Ku70 levels in dissected PAs (Fig. 5C). To determine whether the improvement of the hemodynamic parameters was due to reduced vascular remodeling of distal pulmonary vessels, vascular wall thickness was quantified by hematoxylin and eosin staining and α SMA labeling. As expected, Su/Hx induced a severe vascular remodeling as evidenced by vascular wall thickening comprising majority of α SMA positive cells. Medial hypertrophy of distal pulmonary vessels was greatly reduced following HDAC6 inhibition (Fig. 6). Consistently, the percentage of occluded pulmonary vessels was significantly lower in Su/Hx-treated rats given TubA than in those given vehicle (Supplementary Figure S8). We next validated our findings by measuring proliferation and apoptosis of distal PASMCs detected by α SMA labeling. In Su/Hx-challenged rats, proliferation of PASMCs was enhanced whereas virtually no apoptosis was detected as compared with controls. As observed *in vitro*, TubA suppressed proliferation and induced apoptosis in PASMCs (Fig. 6).

Pharmacological inhibition of HDAC6 reverses pulmonary arterial hypertension in MCT rats.

To further demonstrate the therapeutic benefit of TubA, we investigated whether the corrective effects observed in the Su/Hx model can be reproduced in a second model of PAH. As observed in the Su/Hx model, inhibition of HDAC6 with TubA significantly improved RVSP, mPAP, CO, TPR, RV hypertrophy, vascular remodeling (as assessed by medial wall thickness and percentage of occluded vessels) and cell proliferation/apoptosis imbalance in the MCT rat model (Supplementary Figure S9) reinforcing the view that HDAC6 is an essential component of vascular remodeling in PAH. Collectively, these results strongly support our hypothesis that HDAC6 promotes vascular remodeling in PAH and that its inhibition represents a new and promising avenue to tackle PAH.

Hdac6 loss of function in mice confers protection against chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension.

To test whether HDAC6 constitutes a necessary factor for pulmonary hypertension (PH) development, wild-type (*Hdac6*^{Y/+}) and *Hdac6* knockout mice (*Hdac6*^{Y/-}) were exposed to either normoxia or hypoxia (10% O₂) for 3 weeks. We first validated the absence of HDAC6 in mutant mice and demonstrated that hypoxia

exposure significantly increased HDAC6 expression in lungs from *Hdac6Y/+* mice (Fig. 7A). As expected, loss of *Hdac6* function in normoxic and chronic hypoxic mice was accompanied by the hyperacetylation of α -Tubulin and Ku70 (Supplementary Figure S10). From a hemodynamic point of view, chronic hypoxia induced PH in both *Hdac6Y/+* and *Hdac6Y/-* mice (increased RVSP, mPAP, TPR and decreased CO) nonetheless, these effects were significantly attenuated in mutant mice (Fig. 7B). Note that no differences in all the hemodynamic measurements were seen between *Hdac6Y/-* and *Hdac6Y/+* mice in normoxic condition (Fig. 7B). A trend to a decrease in RV hypertrophy measured by Fulton index was also seen in mutant mice (Fig. 7B). Finally, *Hdac6Y/-* mice had reduced pulmonary vascular remodeling, as assessed by α SMA labeling (Fig. 7C).

DISCUSSION

In the present study, we found that HDAC6 is strongly up-regulated in lungs, distal PAs and isolated PASMCS from PAH patients and animal models. In agreement with previous findings pinpointing HDAC6 as a regulator of the cell protective responses¹⁵, we demonstrated that HDAC6 antagonizes apoptosis in PAH-PASMCS through the stabilization of the cytosolic Ku70-Bax complex that suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria, as shown in Fig. 8. More importantly, we demonstrated that its selective inhibition improved the pro-migratory, pro-proliferative and apoptosis-resistant phenotype of PAH-PASMCS *in vitro* sparing control cells and significantly improved established PAH in two relevant rat models.

Although the overall status of histone modification is largely unknown in PAH, nuclear or pan-HDAC inhibitors have also been exploited in PAH for their beneficial effects under several pathophysiological conditions like cancer and inflammation³⁶. These investigations have yielded mixed results. Indeed, studies conducted in rat models of PH have reported positive impact of class I HDAC inhibitor on pulmonary vascular remodeling and RV hypertrophy^{37,38}. These results contrast with those documenting no therapeutic effects of broad-spectrum HDAC inhibitors in the Su/Hx-induced PAH rat model or even a deterioration of RV function in a rat model of RV hypertrophy^{39,40}. The unresolved controversies highlighted by these studies may reflect, at least in part, the unforeseeable side effects caused by nuclear HDAC inhibitors. Unlike most classical HDACs, which are located in the nucleus and deacetylate nuclear histones, HDAC6 is predominantly localized within the cytoplasm where it associates with non-histone substrates¹⁸. Therefore, our findings demonstrating therapeutic benefit of Tubastatin A in PAH models combined to the fact that HDAC6 has limited and nonlethal implication in physiological processes⁴¹ and is minimally expressed in lung control cells make it a promising candidate towards therapeutic implementation in human PAH.

Similarly to the lungs, HDAC6 is up-regulated in the RV of both PAH patients and experimental rats models of PAH (Su/Hx and MCT). Although its role in RV failure was not explored in the present study, previous studies

in heart failure revealed that HDAC6 promotes cardiac fibrosis⁴² and its inhibition was associated with cardioprotective effects in a left ventricular pressure overload model⁴³. This could thus explain the cardioprotective effects (better CO) of Tubastatin A in our models. Nonetheless, further studies are needed to fully elucidate the role of HDAC6 in RV failure. Our observations showing that inhibition of HDAC6 increases acetylation of Ku70 at lysine residue 539, known to abolish the ability of Ku70 to suppress Bax-mediated apoptosis³⁴ and that Tubastatin A treatment enhances PAH-PASMC apoptosis, which is blocked by a Bax-inhibiting peptides derived from the Bax-binding domain of Ku70, strongly support the implication of Ku70 in vascular remodeling. These findings are in line with a previous study reporting that HDAC6 expression in neuroblastoma cells maintains cytosolic Ku70 in an unacetylated state leading to Bax sequestration from the mitochondria and apoptosis evasion¹⁶. Interestingly, similar findings (increased HDAC6 and enhanced Ku70 acetylation in response to Tubastatin A) were found in PAH-PAECs suggesting the implication of HDAC6 in PAH-PAEC hyper-proliferation.

In addition to its cytoprotective functions in the cytosol, Ku70 is also involved in DNA double-stranded break and its acetylation level inversely correlates with its DNA repair efficiency⁴⁴. Interestingly, *Ku70* deficient mice exhibit lung abnormalities characterized by emphysema and blood vessel occlusions⁴⁵, two conditions intimately connected to defective DNA repair mechanisms and cell apoptosis. It is now well accepted that in the early stages of PAH, enhanced inflammation, oxidative stress and down-regulation of bone morphogenetic protein receptor type 2 (BMPR2) signaling cause irreversible accumulation of DNA damage and subsequent PAEC apoptosis⁴⁶. During disease progression, sustained activation of the DNA repair machinery was identified as an adaptive response used by PAH cells to face stress, allowing them to survive and hyper-proliferate^{8,9}. Thus, it can be assumed that endothelial cell overgrowth and development of plexiform-like lesions in *Ku70* mutant mice is the consequence of initial apoptosis due to accumulation of DNA damage and subsequent selection of apoptosis-resistant proliferating cells. Although not explored in the present study, inhibition of HDAC6 in established PAH may impair nuclear Ku70-mediated DNA repair function, contributing to decreased PAH-PASMC DNA repair capacity and thus diminished cell proliferation and resistance to apoptosis.

Our results identified cytosolic Ku70 as a target of HDAC6 promoting PAH-PASMC survival. However, several other mechanisms mediated by HDAC6 could explain the abnormal pro-proliferative and anti-apoptotic phenotype of these cells. For instance, HDAC6 was reported to promote autophagy²⁷ that is induced in human and experimental PAH^{14,47}. Although debated, autophagy is considered as a pro-survival mechanism against cellular stress, allowing removal of stress-induced damaged organelles and toxic protein aggregates⁴⁸. In addition, HDAC6 interacts and deacetylates various other proteins including Survivin and HSP90 to carry out cancerous functions^{49,50}. Indeed, HDAC6 was reported to induce Survivin deacetylation promoting its cytoplasmic localization and thus its anti-apoptotic functions⁵⁰. Given that we previously demonstrated that

Survivin is overexpressed in PAH-PASMCs contributing to the development of PAH^{7,51}, HDAC6 inhibition may also contribute to improve PAH by reducing the cytoplasmic pool of Survivin leading to increased sensitivity to apoptosis. Moreover, inhibition of HDAC6 was reported to increase acetylation of HSP90 and thus weaken its chaperone-dependent functions^{41,49}. Interestingly, HSP90 stabilizes various proteins associated with malignant growth and proliferation such as proviral integration site for Moloney murine leukemia virus-1 (PIM-1), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) and hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 α)^{52,53}, also found to be increased and implicated in PAH^{6,7,11}. Based on these findings, it can be assumed that HDAC6 overexpression in PAH-PASMCs favors HSP90 activity contributing to the proliferative and anti-apoptotic phenotype of PAH-PASMCs. In agreement with this, inhibition of HSP90 was recently reported to improve pulmonary vascular remodeling in PAH¹³. Nevertheless, as reported in cancer cells⁵⁴, we found that Tubastatin A does not induce hyperacetylation of HSP90 in PAH-PASMCs (data not shown) indicating that the beneficial effects of HDAC6 inhibition seen in our models cannot be ascribed to a weakening of HSP90 function.

In conclusion, our results identify HDAC6 as a druggable regulator of PAH-PASMC resistance to apoptosis and offer novel insights into the molecular mechanisms governing vascular remodeling. Importantly, HDAC6 has limited and nonlethal implication in physiological processes⁴¹ and phase 1/2 clinical trials investigating HDAC6 inhibitors in cancer are currently ongoing (clinical trial NCT 01323751). Based on these findings, HDAC6 inhibition represents a new and promising avenue to treat PAH, avoiding the unforeseeable undesirable side effects caused by non-specific nuclear HDAC inhibitors.

METHODS

All methods involving human and animal participants were performed with the approval of Laval University and the IUCPQ Biosafety and Ethics Committees, as well as in accordance with recent recommendations on optimal preclinical studies in PAH³.

Human tissue samples

Experimental procedures using human tissues or cells conformed to the principles outlined in the Declaration of Helsinki. Tissues were obtained from patients after a signed informed consent. Healthy lung tissues (controls) were obtained during lung resection for tumors. Lung samples were taken at distance from the tumor and demonstrated normal lung parenchyma. All the PAH tissues were from lung explants from transplant or early ("warm") autopsy. PAH diagnosis was previously confirmed by right heart catheterization. PAH and control tissues were obtained from Respiratory Health Network tissue bank. PAH and control donor were matched for age and sex (Supplementary Table 1)³.

Reagents and inhibitors

ACY-775 (2-((1-(3-fluorophenyl)cyclohexyl)amino)-*N*-hydroxypyrimidine-5-carboxamide) was obtained from Acetylon Pharmaceuticals. Tubastatin A (TubA) and 17-AAG (Tanespimycin) were purchased from SelleckChem. AT13387 (Onalespib) was purchased from AdooQ Bioscience. In some experiments, 200 μ M of Bax inhibitor peptide V5 (BIP-V5, MedChemExpress) or its corresponding control peptide (Millipore) was applied 16 hours before treatment with Tubastatin A or ACY-775.

Cell culture and treatments

PAH-PASMCs (n=5 cell lines) were isolated from small PAs (<1000 μ m diameter) from PAH patients. Controls PASMCs (n=4 cells lines) were either purchased from Cell Application or isolated from non-PAH patients as previously described^{5,8}. Cells were used at passages 4 to 9 for experiments. No changes in cell morphology were noted and PASMC phenotype was confirmed by α -smooth muscle actin staining, as previously done^{5,8}. PASMCs were grown in high-glucose DMEM supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (Thermo Fisher Scientific) and 1% antibiotic/antimycotic (Thermo Fisher Scientific). TubA and ACY-775 were dissolved first in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) and then added to the culture medium (0.15-2 μ M) immediately before use. siRNAs were transfected at a final concentration of 20-100nM with Lipofectamine RNAiMAX (Thermo Fisher Scientific).

In vitro proliferation and apoptosis measurements

PASMCs were cultured for 48 hours in 10% fetal bovine serum (FBS, a condition that is known to promote proliferation) or 0.1% FBS (a starvation condition that promotes apoptosis) in presence or absence of TubA, ACY-775, siHDAC6 or their respective controls. After treatment, cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 min. PASMC proliferation was measured by Ki67 labeling and apoptosis by AnnexinV assay, as previously performed^{5,6,8,55}. The total number of positive cells was calculated and divided by the total counter number of nuclei (DAPI), thus permitting the determination of percent values for each condition. At least 100 cells by experiment in 3 experiments were counted. All experiments were at least performed in triplicate.

Cell migration assay

PAH-PASMCs were grown to confluence. The cells were exposed or not to TubA, ACY-775, siHDAC6 or their corresponding controls for 24 hours before a linear scratch was made using a sterile 1000- μ L pipette tip. Detached cells were removed by repeated washes and fresh medium containing or not HDAC6 inhibitors was added. Wound closure was monitored during 24 hours by phase microscopy capturing images. Initial and remaining wound areas were determined with the aid of the image processing software « Image J » for calculation of the percentage of wound closure.

Quantitative RT-PCR and immunoblotting

Total RNAs were extracted from control and PAH-PASMCs using TRIzol reagent (Invitrogen), as previously described⁵⁶. Real-time RT-PCR was performed using a TaqMan RNA-to-CT 1-Step kit (Applied Biosystems) and a QuantStudio 7 Flex system (Applied Biosystems). HDAC6 expression was analyzed using the Taqman Gene Expression Assay (Assay ID Hs00997427_m1) from Applied Biosystems following the manufacturer directions. Reactions were run in triplicate and relative quantification was achieved with the comparative $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method by normalization with 18s ribosomal RNA.

For Western blotting, protein lysates were prepared from healthy and PAH tissues or PASMCs in a 2% Chaps protein extraction buffer containing protease Inhibitor (Roche) and phosphatase Inhibitor Cocktails (Sigma). The protein concentration of the extracts was determined using Bradford reagent (Bio-Rad). Equal amounts of protein were separated by SDS gel electrophoresis, transferred to PVDF membranes and incubated with either 5% non-fat dry milk or 10% goat serum in TBS-T buffer, then membranes were incubated overnight at 4°C with primary antibodies: HDAC6 (from Santa Cruz (1:100) for human samples and from Cell Signaling (1:1000) for rodent samples), Acetylated- α -Tubulin (Cell Signaling, 1:1000), α -Tubulin (Sigma, 1:5000), HSP90 (StressMarq, 1:2000), acetyl(K539)-Ku70 (St John's Laboratory, 1:1000), Ku70 (Santa Cruz, 1:1000), acetyl-Histone H3 (Cell Signaling, 1:1000) in 3% BSA. Next, membranes were incubated with appropriate horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Promega, 1:10000) for 2 hours at room temperature in 5% non-fat milk or in 3% BSA. Antibodies were revealed using ECL reagents (Perkin-Elmer) and using the imaging Chemidoc MP system (Bio-Rad Laboratories). Protein expression was quantified using the Image lab software (Bio-Rad Laboratories) and normalized to Amido black (AB), as previously described^{5,8,56}.

Immunohistochemistry and immunofluorescence studies

For *in vitro* localization of Bax, PAH-PASMCs serum-starved in 0.1% FBS and exposed or not to HDAC6 inhibitors for 48h were stained with the cell-permeable mitochondrion-selective dye MitoTracker Red (500nM, Life Technologies), fixed, permeabilized, and stained with antibody specific for Bax (Abcam, 1:150). Images were acquired using a Carl Zeiss MicroImaging microscope. Colocalization between Bax and MitoTracker was estimated by the software using an algorithm that calculates the Pearson's correlation coefficient. Paraffin-embedded lungs were serially sectioned at 5 μ m. Following citrate-based antigen retrieval, the sections were blocked with goat serum (5%) for 1 hour. Then, sections were incubated with primary antibodies at 4°C overnight. Rabbit polyclonal anti-HDAC6 (1:400, Abcam), anti-Ki67 (1:400, Millipore), and mouse monoclonal anti alpha smooth muscle actin (α SMA, 1:200, Sigma) were used as primary antibodies. Proteins were detected using appropriate fluorescent-dye conjugated secondary antibodies (Thermo Fisher Scientific). Apoptosis was detected by *in situ* direct DNA fragmentation (TUNEL) assay, according to manufacturer's

instructions. The Cyanine 3 Tyramide Signal Amplification Kit (PerkinElmer) was used for HDAC6 detection. Images were obtained with a Zeiss ApoTome microscope. The percentage of Ki67 or TUNEL-positive PSMCs was calculated by examining 20 randomly selected distal pulmonary vessels ($<50\mu\text{m}$) from each of 5 to 11 rats from each experimental group, as previously described^{5,8,55}.

Animal models

All experimental procedures were performed in accordance to protocol reviewed and approved by the Laval University Institutional Animal Care and Use Committee (protocol 2014176-2). The investigation conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the US National Institutes of Health (NIH). The Sugén-hypoxia (Su/Hx) and the monocrotaline (MCT) PAH rat models were used in the present study. Male 250–350g Sprague-Dawley rats (Charles River Laboratories) were used for both animal models. For the MCT model, rats were injected subcutaneously with 60 mg/kg of monocrotaline (Sigma). For the Su/Hx model, rats were injected with 20 mg/kg of SU5416 (Sigma) and put in hypoxia (10% O₂) for 3 weeks. Once PAH was established (after 14 days for MCT and week 5 for Sugén and confirmed by echography), TubA (a specific HDAC6 inhibitor, 25mg/kg) or vehicle (DMSO) was intraperitoneally administered every day for 2 weeks. Similarly, Macitentan (30mg/kg/day) and Tadalafil (10mg/kg/day) treatments were started 5 weeks after Sugén injection (once PAH was established) and were administered via gavage alone or in combination with TubA for 2 weeks. Adult knock-out (*Hdac6*^{-/-}) mice (aged 8 to 10 weeks) and their control groups (C57BL/6 mice) were exposed or not to chronic hypoxia (10% O₂) for 3 weeks. Mice were genotyped by PCR, as previously described⁴¹.

In vivo assessment of pulmonary hypertension, RV hypertrophy and pulmonary vascular remodeling.

At the time of sacrifice, rats and mice were initially anesthetized with 3%–4% isoflurane and maintained with 2% during procedures. Hemodynamic parameters, including RV systolic pressure (RVSP), mean PA pressure (mPAP), cardiac output (CO) and total pulmonary resistance (TPR) were measured blindly by closed chest right heart catheterization (SciSense catheters), as previously described^{5,8,56}. RV hypertrophy (Fulton index) was measured as the ratio of RV weight to left ventricular plus septal weight (RV/LV+S). Medial wall thickness of distal pulmonary vessels was quantified using Hematoxylin and Eosin (H&E) stain or α SMA labeling, by subtracting the area of the lumen from the total area of the vessel and reported as % of total pulmonary vessel area. Two measurements per vessel in 20 vessels per animal in at least 5 animals per group were performed. The percentage of occluded vessels was calculated by counting 50 vessels per animal, as previously described⁵⁷.

Statistical analysis

Statistical tests and graphs were done with GraphPad Prism 6.0. Values are expressed as fold change or mean±standard error of the mean, as they followed a normal distribution. Unpaired Student *t* tests were used for comparisons between 2 groups, and 1-way analysis of variance followed by a Tukey-Kramer post test was used for >2 groups. If the variances of different groups were not equal and depended on the mean of the data, statistical analyses were performed on log transformation of the data. A significance level inferior to 5% ($P<0.05$) was considered statistically significant.

REFERENCES:

- 1 Leopold, J. A. & Maron, B. A. Molecular Mechanisms of Pulmonary Vascular Remodeling in Pulmonary Arterial Hypertension. *Int J Mol Sci* **17**, doi:10.3390/ijms17050761 (2016).
- 2 Lajoie, A. C. *et al.* Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *The Lancet. Respiratory medicine* **4**, 291-305, doi:10.1016/s2213- 2600(16)00027-8 (2016).
- 3 Bonnet, S. *et al.* Translating Research into Improved Patient Care in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, doi:10.1164/rccm.201607-1515PP (2016).
- 4 Pullamsetti, S. S., Savai, R., Seeger, W. & Goncharova, E. A. From Cancer Biology to New PAH Therapeutics: Targeting Cell Growth and Proliferation Signaling Hubs. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, doi:10.1164/rccm.201606-1226PP (2016).
- 5 Meloche, J. *et al.* Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res* **117**, 525-535, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307004 (2015).
- 6 Paulin, R. *et al.* Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **123**, 1205-1215, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.963314 (2011).
- 7 McMurtry, M. S. *et al.* Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest* **115**, 1479-1491, doi:10.1172/JCI23203 (2005).
- 8 Meloche, J. *et al.* Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **129**, 786-797, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.006167 (2014).
- 9 Ranchoux, B. *et al.* DNA Damage and Pulmonary Hypertension. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 990, doi:10.3390/ijms17060990 (2016).
- 10 Meloche, J. *et al.* miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *American journal of physiology. Cell physiology* **309**, C363-372, doi:10.1152/ajpcell.00149.2015 (2015).

- 11 Bonnet, S. *et al.* An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* **113**, 2630-2641, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.105.609008 (2006).
- 12 Dromparis, P. *et al.* Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodeling and pulmonary hypertension. *Circ Res* **113**, 126-136, doi:10.1161/circresaha.112.300699 (2013).
- 13 Wang, G. K. *et al.* Inhibition of heat shock protein 90 improves pulmonary arteriole remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Oncotarget*, doi:10.18632/oncotarget.10855 (2016).
- 14 Long, L. *et al.* Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res* **112**, 1159-1170, doi:10.1161/circresaha.111.300483 (2013).
- 15 Matthias, P., Yoshida, M. & Khochbin, S. HDAC6 a new cellular stress surveillance factor. *Cell Cycle* **7**, 7-10, doi:10.4161/cc.7.1.5186 (2008).
- 16 Subramanian, C., Jarzembowski, J. A., Opipari, A. W., Jr., Castle, V. P. & Kwok, R. P. HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia* **13**, 726-734 (2011).
- 17 Boyault, C. *et al.* HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes & development* **21**, 2172-2181, doi:10.1101/gad.436407 (2007).
- 18 Hubbert, C. *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* **417**, 455-458, doi:10.1038/417455a (2002).
- 19 Ding, G. *et al.* HDAC6 promotes hepatocellular carcinoma progression by inhibiting P53 transcriptional activity. *FEBS letters* **587**, 880-886, doi:10.1016/j.febslet.2013.02.001 (2013).
- 20 Wang, Z. *et al.* HDAC6 promotes cell proliferation and confers resistance to temozolomide in glioblastoma. *Cancer letters* **379**, 134-142, doi:10.1016/j.canlet.2016.06.001 (2016).
- 21 Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M. & Schreiber, S. L. Domainselective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4389-4394, doi:10.1073/pnas.0430973100 (2003).
- 22 Rao, R. *et al.* HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood* **112**, 1886-1893, doi:10.1182/blood-2008-03-143644 (2008).
- 23 Hassoun, P. M. *et al.* Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol* **54**, S10-19, doi:10.1016/j.jacc.2009.04.006 (2009).
- 24 Namdar, M., Perez, G., Ngo, L. & Marks, P. A. Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 20003-20008, doi:10.1073/pnas.1013754107 (2010).

- 25 Chaudhary, N. *et al.* SMAR1 coordinates HDAC6-induced deacetylation of Ku70 and dictates cell fate upon irradiation. *Cell death & disease* **5**, e1447, doi:10.1038/cddis.2014.397 (2014).
- 26 Chen, C.-S. *et al.* Histone Deacetylase Inhibitors Sensitize Prostate Cancer Cells to Agents that Produce DNA Double-Strand Breaks by Targeting Ku70 Acetylation. *Cancer Research* **67**, 5318-5327, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3996 (2007).
- 27 Iwata, A., Riley, B. E., Johnston, J. A. & Kopito, R. R. HDAC6 and Microtubules Are Required for Autophagic Degradation of Aggregated Huntingtin. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 40282-40292, doi:10.1074/jbc.M508786200 (2005).
- 28 Kawaguchi, Y. *et al.* The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell* **115**, 727-738 (2003).
- 29 McLendon, P. M. *et al.* Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E5178-E5186, doi:10.1073/pnas.1415589111 (2014).
- 30 Trepel, J., Mollapour, M., Giaccone, G. & Neckers, L. Targeting the dynamic HSP90 complex in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 537-549 (2010).
- 31 Jochems, J. *et al.* Antidepressant-Like Properties of Novel HDAC6-Selective Inhibitors with Improved Brain Bioavailability. *Neuropsychopharmacology* **39**, 389-400, doi:10.1038/npp.2013.207 (2014).
- 32 Butler, K. V. *et al.* Rational Design and Simple Chemistry Yield a Superior, Neuroprotective HDAC6 Inhibitor, Tubastatin A. *Journal of the American Chemical Society* **132**, 10842-10846, doi:10.1021/ja102758v (2010).
- 33 Sawada, M. *et al.* Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat Cell Biol* **5**, 320-329, doi:10.1038/ncb950 (2003).
- 34 Cohen, H. Y. *et al.* Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax mediated apoptosis. *Molecular cell* **13**, 627-638 (2004).
- 35 Gomez, J. A. *et al.* Bax-inhibiting peptides derived from Ku70 and cell-penetrating pentapeptides. *Biochemical Society transactions* **35**, 797-801, doi:10.1042/bst0350797 (2007).
- 36 Falkenberg, K. J. & Johnstone, R. W. Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders. *Nat Rev Drug Discov* **13**, 673-691, doi:10.1038/nrd4360 (2014).
- 37 Cavaasin, M. A. *et al.* Selective Class I HDAC Inhibition Suppresses Hypoxia-Induced Cardiopulmonary Remodeling Through an Anti-Proliferative Mechanism. *Circulation research* **110**, 739-748, doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.258426 (2012).
- 38 Zhao, L. *et al.* Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid (VPA) and suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). *Circulation* **126**, 455-467, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.112.103176 (2012).

- 39 De Raaf, M. A. *et al.* Histone deacetylase inhibition with trichostatin A does not reverse severe angioproliferative pulmonary hypertension in rats (2013 Grover Conference series). *Pulmonary Circulation* **4**, 237-243, doi:10.1086/675986 (2014).
- 40 Bogaard, H. J. *et al.* Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am J Respir Crit Care Med* **183**, 1402-1410, doi:10.1164/rccm.201007-1106OC (2011).
- 41 Zhang, Y. *et al.* Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol* **28**, 1688-1701, doi:10.1128/mcb.01154-06 (2008).
- 42 Tao, H., Yang, J. J., Hu, W., Shi, K. H. & Li, J. HDAC6 Promotes Cardiac Fibrosis Progression through Suppressing RASSF1A Expression. *Cardiology* **133**, 18-26, doi:10.1159/000438781 (2016).
- 43 Demos-Davies, K. M. *et al.* HDAC6 contributes to pathological responses of heart and skeletal muscle to chronic angiotensin-II signaling. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology* **307**, H252-258, doi:10.1152/ajpheart.00149.2014 (2014).
- 44 Chen, C. S. *et al.* Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res* **67**, 5318-5327, doi:10.1158/0008-5472.can-06-3996 (2007).
- 45 Ngo, J. *et al.* Bax deficiency extends the survival of Ku70 knockout mice that develop lung and heart diseases. *Cell death & disease* **6**, e1706, doi:10.1038/cddis.2015.11 (2015).
- 46 Li, M. *et al.* Loss of bone morphogenetic protein receptor 2 is associated with abnormal DNA repair in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology* **50**, 1118-1128, doi:10.1165/rcmb.2013-0349OC (2014).
- 47 Lee, S.-J. *et al.* Autophagic Protein LC3B Confers Resistance against Hypoxia-induced Pulmonary Hypertension. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **183**, 649- 658, doi:10.1164/rccm.201005-0746OC (2011).
- 48 Dalby, K. N., Tekedereli, I., Lopez-Berestein, G. & Ozpolat, B. Targeting the prodeath and prosurvival functions of autophagy as novel therapeutic strategies in cancer. *Autophagy* **6**, 322- 329 (2010).
- 49 Kovacs, J. J. *et al.* HDAC6 Regulates Hsp90 Acetylation and Chaperone-Dependent Activation of Glucocorticoid Receptor. *Molecular cell* **18**, 601-607, doi:10.1016/j.molcel.2005.04.021.
- 50 Riolo, M. T. *et al.* Histone deacetylase 6 (HDAC6) deacetylates survivin for its nuclear export in breast cancer. *J Biol Chem* **287**, 10885-10893, doi:10.1074/jbc.M111.308791 (2012).
- 51 Courboulin, A. *et al.* Krüppel-like Factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respiratory Research* **12**, 128, doi:10.1186/1465-9921-12-128 (2011).

- 52 Mizuno, K. *et al.* Regulation of Pim-1 by Hsp90. *Biochemical and biophysical research communications* **281**, 663-669, doi:10.1006/bbrc.2001.4405 (2001).
- 53 Kim, H. L., Cassone, M., Otvos, L., Jr. & Vogiatzi, P. HIF-1alpha and STAT3 client proteins interacting with the cancer chaperone Hsp90: therapeutic considerations. *Cancer biology & therapy* **7**, 10-14 (2008).
- 54 Inks, E. S., Josey, B. J., Jesinkey, S. R. & Chou, C. J. A Novel Class of Small Molecule Inhibitors of HDAC6. *ACS Chemical Biology* **7**, 331-339, doi:10.1021/cb200134p (2012).
- 55 Courboulain, A. *et al.* Plumbagin reverses proliferation and resistance to apoptosis in experimental PAH. *The European respiratory journal* **40**, 618-629, doi:10.1183/09031936.00084211 (2012).
- 56 Ruffenach, G. *et al.* Role for RUNX2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*, doi:10.1164/rccm.201512-2380OC (2016).
- 57 Dean, A., Nilsen, M., Loughlin, L., Salt, I. P. & MacLean, M. R. Metformin Reverses Development of Pulmonary Hypertension via Aromatase Inhibition. *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* **68**, 446-454, doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07353 (2016).

ACKNOWLEDGMENT: We thank Dr. Matthias for generously providing *Hdac6* mutant mice. We also wish to thank Serge Simard, a biostatistician from the CRIUCPQ, for his help and advice in reviewing the present study. S. Chabot received a CIHR-Quebec Respiratory Health Training Program graduate scholarship. F. Potus is the recipient of a doctoral training award from the Centre de Recherche de l'Institut Universitaire de Cardiologie et de Pneumologie de Québec. Canada Research Chairs and Canadian Institutes of Health Research grants to S. Bonnet supported this work.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

O.B., S.C. and S.B. designed experiments and analyzed data. S.C., O.B., I.T., A.B., F.P., M.C.L., C.L., S.B.B., V.N. and R.P. performed the experiments. E.G. collected clinical samples. O.B., R.P., S.P. and S.B. wrote the manuscript. S.P. and S.B. have equally supervised the study. All authors read and approved the final version of the manuscript.

ADDITIONAL INFORMATION

Competing financial interests: The authors declare no competing financial interests.

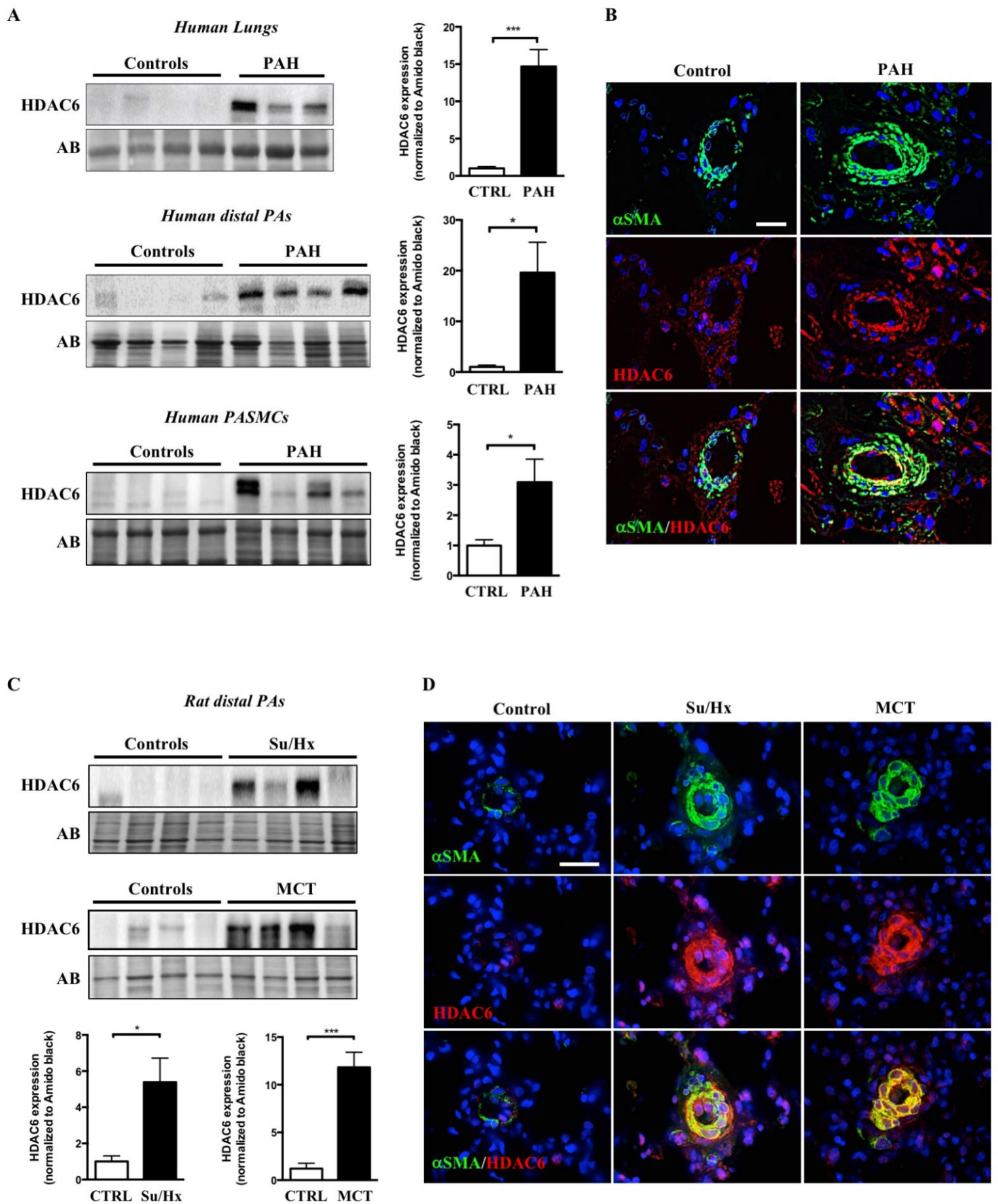
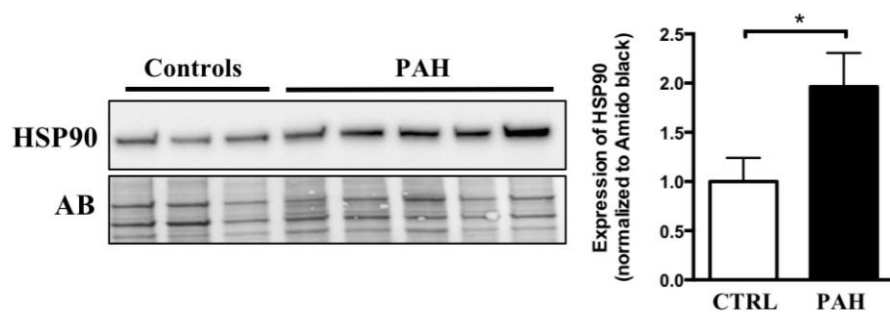
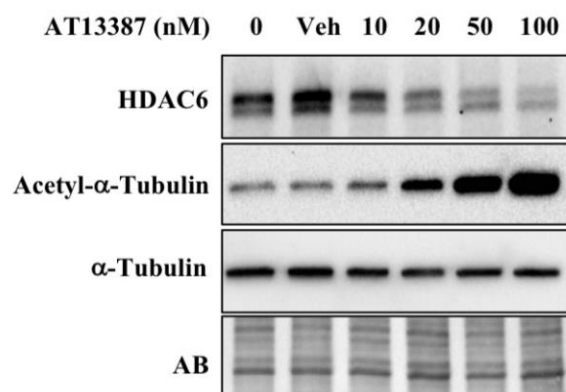


FIGURE 1

A



B



C

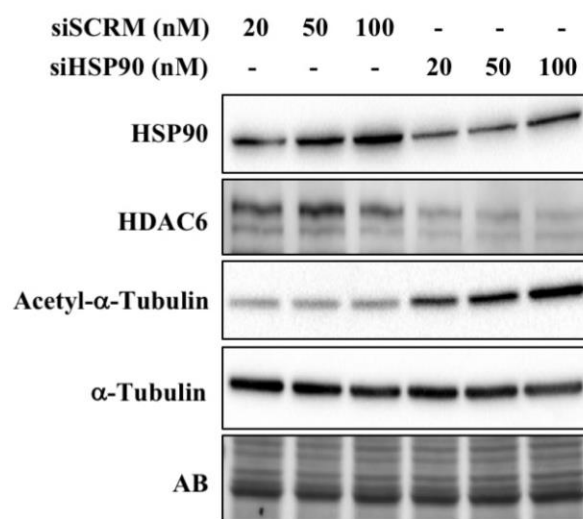


FIGURE 2

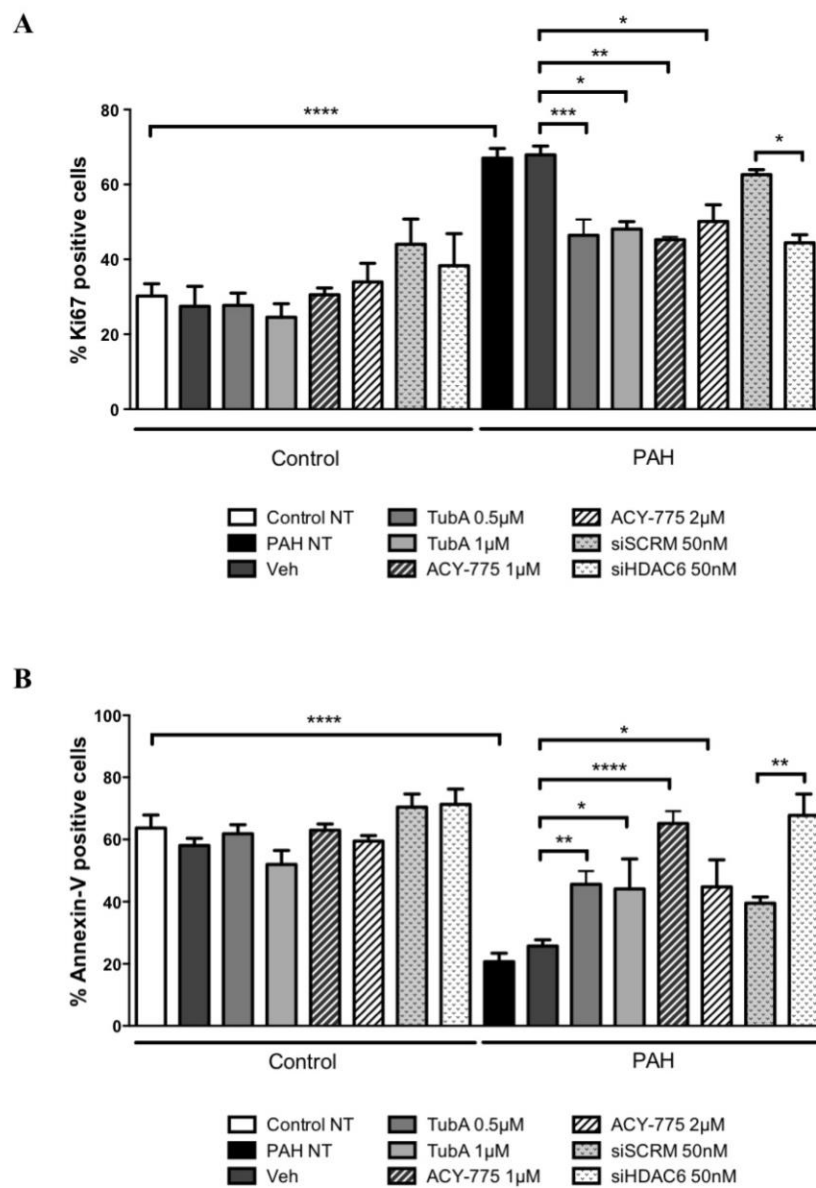


FIGURE 3

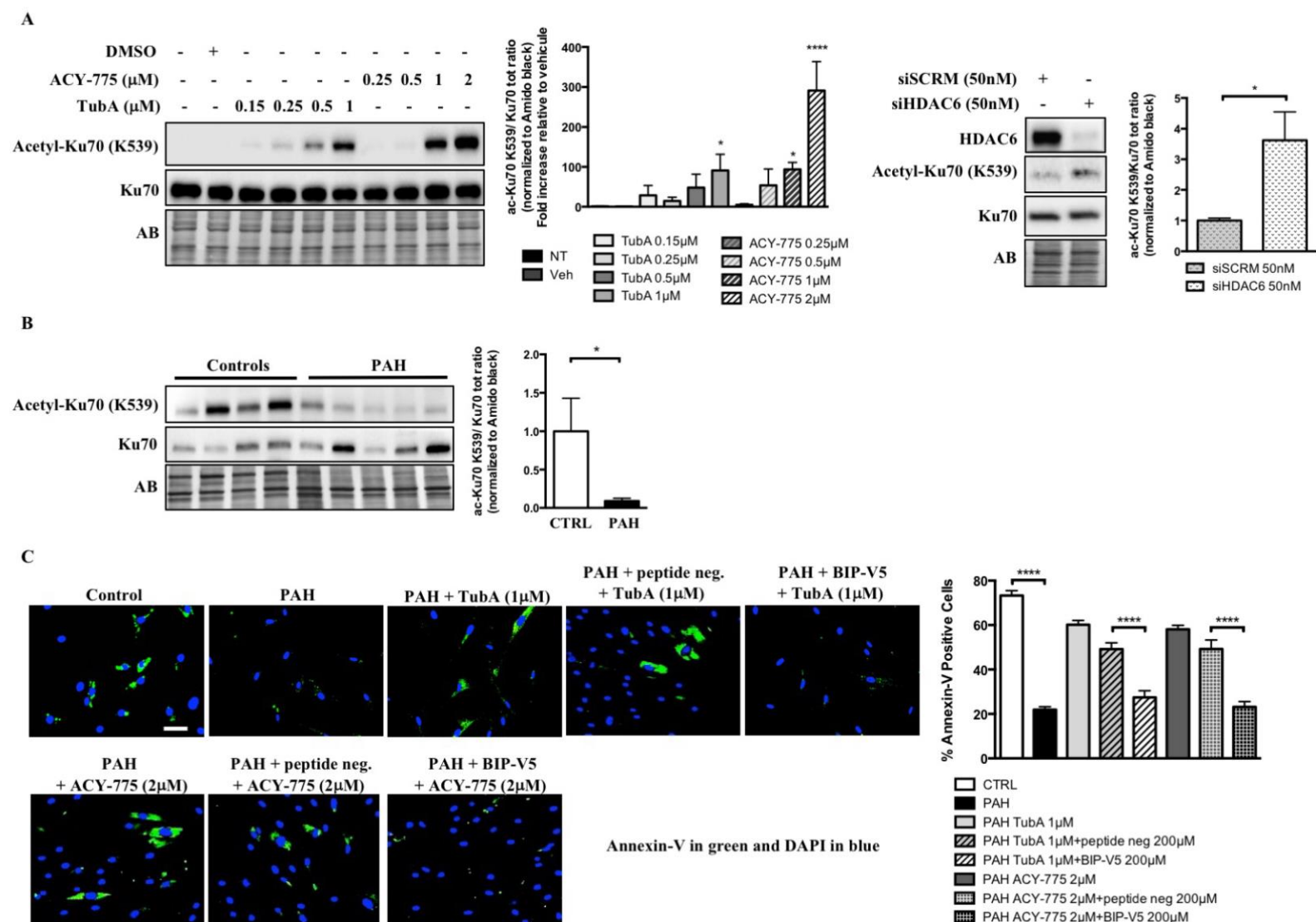


FIGURE 4

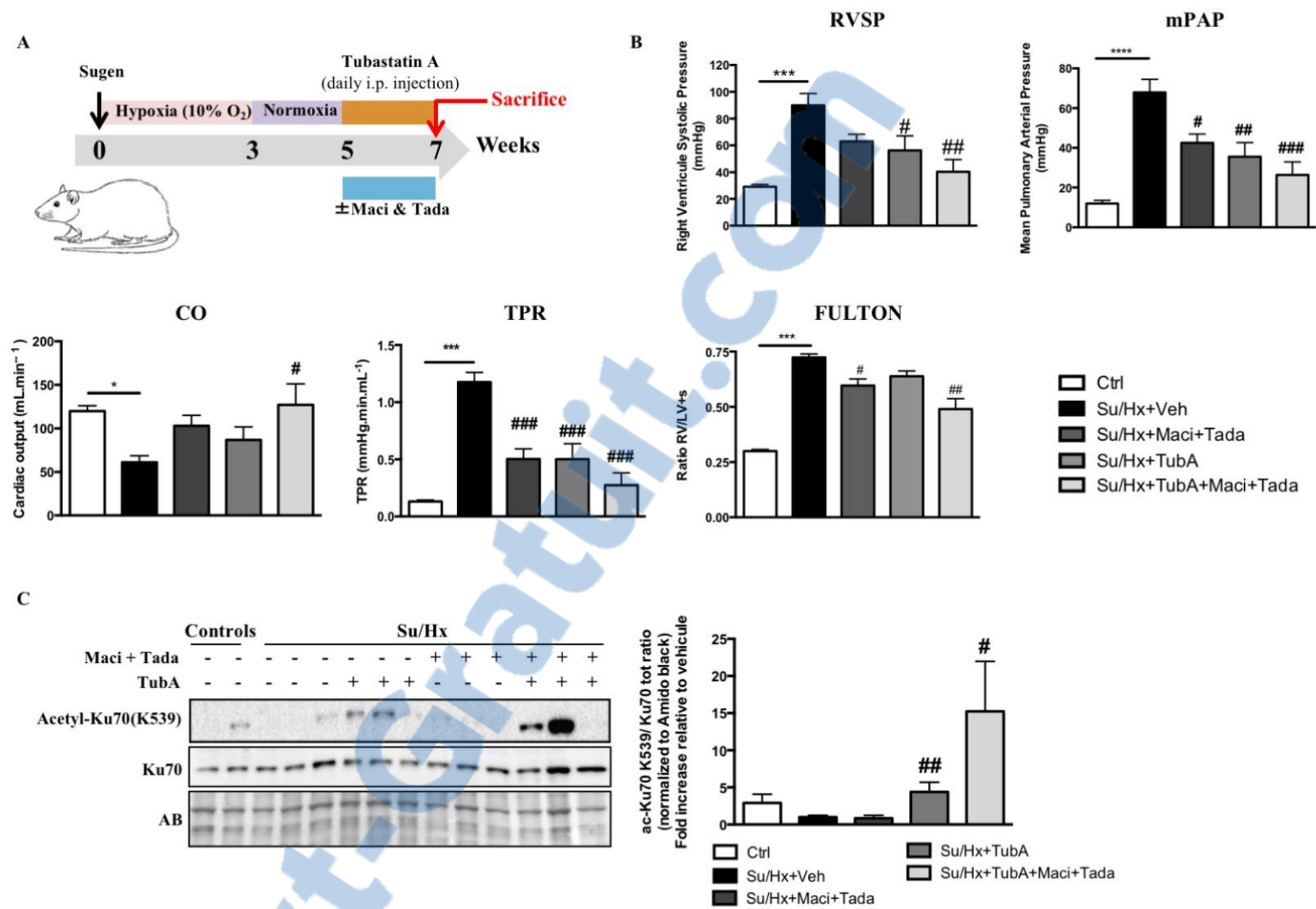
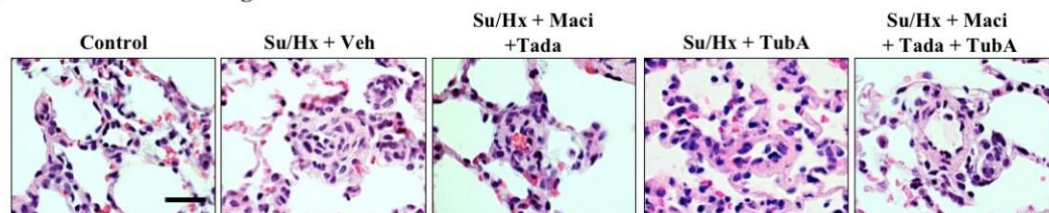
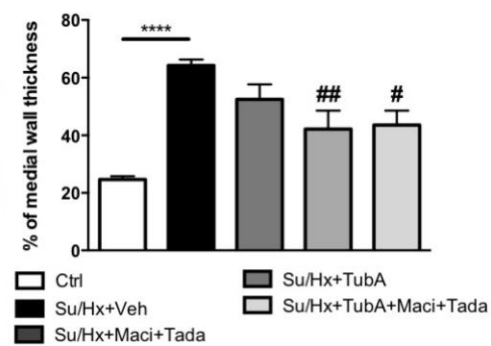


FIGURE 5

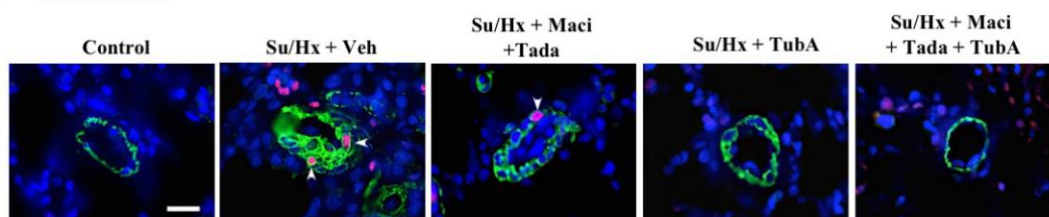
A Vascular remodeling



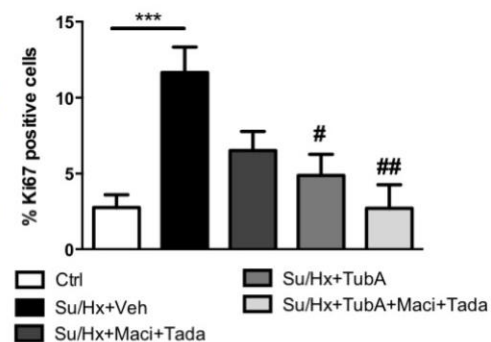
Hematoxylin and Eosin stain



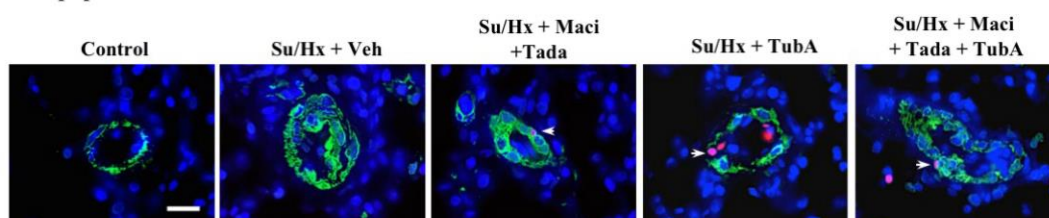
B Proliferation



Ki67 in red, α SMA in green and DAPI in blue



Apoptosis



TUNEL in red, α SMA in green and DAPI in blue

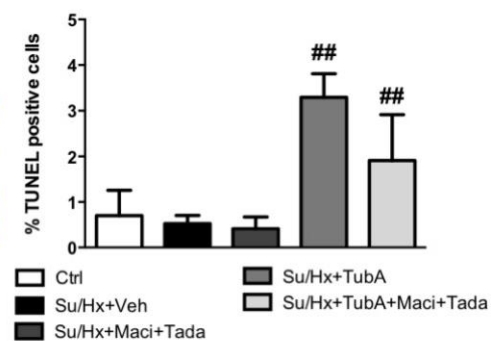


FIGURE 6

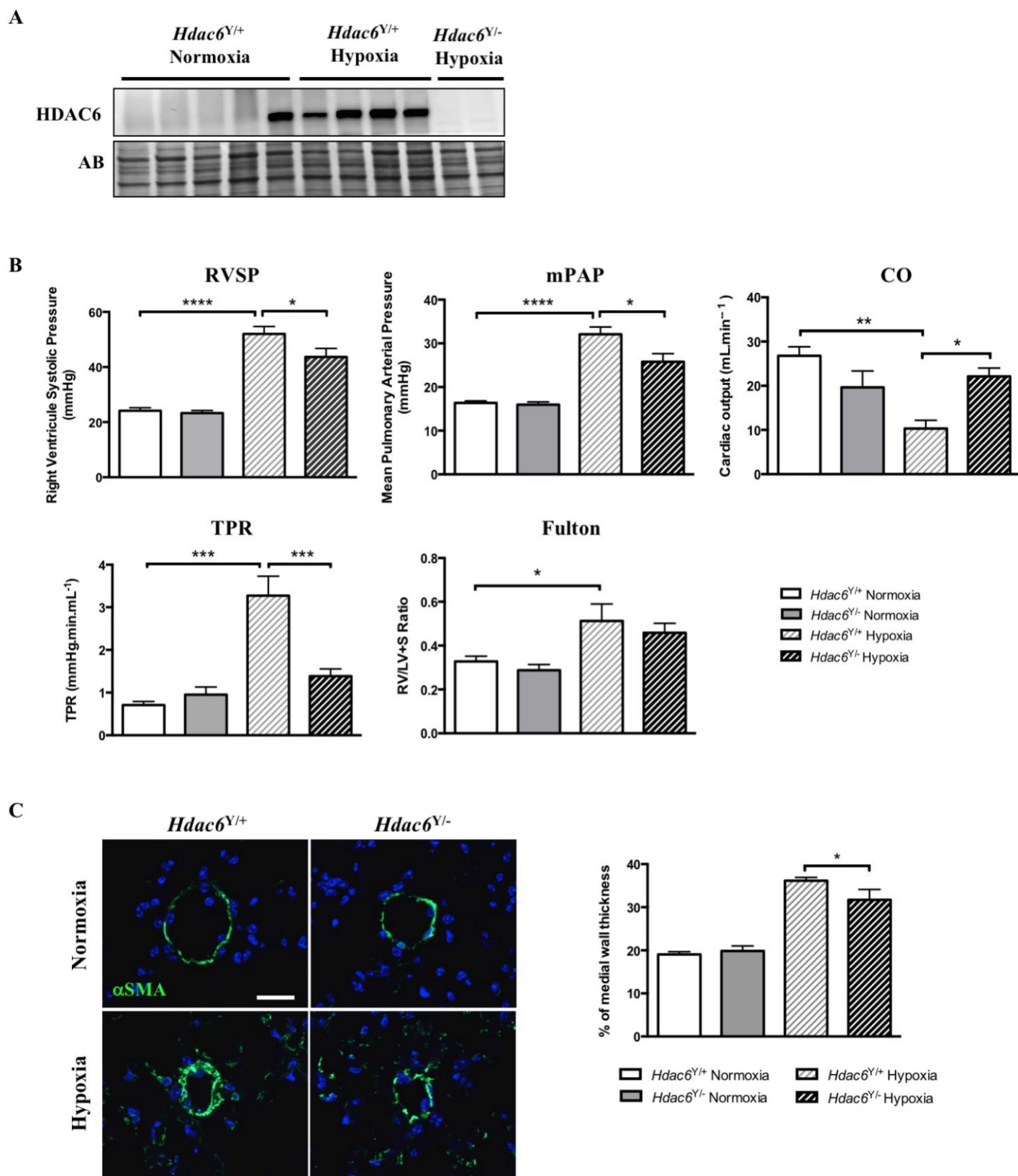


FIGURE 7

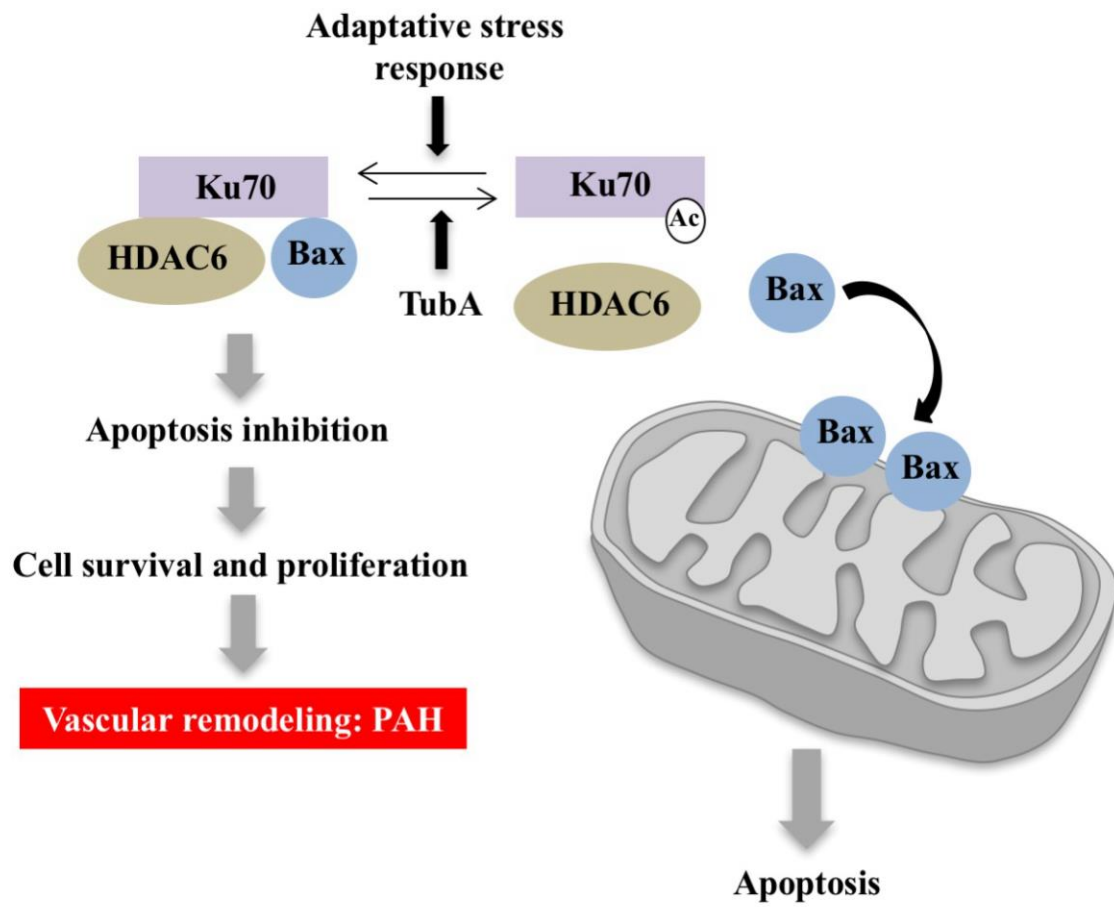


FIGURE 8

FIGURE LEGENDS

Figure 1. HDAC6 is overexpressed in lungs and distal pulmonary arteries (Pas) from PAH patients and animal models. **A**, Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of HDAC6 expression in lung tissues, distal Pas and isolated PA smooth muscle cells (PASMCs) from control (n=4-8) and PAH patients (n=4-12). **B**, Double immunofluorescence staining for α SMA (green) and HDAC6 (red) and DAPI nuclear staining in lungs from control donors (n=5) and PAH patients (n=5), confirming the overexpression of HDAC6 in remodeled Pas. **C**, Representative Western blots and corresponding densitometric analyses of HDAC6 expression in distal Pas of non-treated rats (n=5 for each model) as well as rats exposed to Sugen-hypoxia (Su/Hx, n=6) or monocrotaline (MCT, n=5). **D**, Double immunofluorescence staining for α SMA (green) and HDAC6 (red) and DAPI nuclear staining showing increased expression of HDAC6 in remodeled distal Pas after Su/Hx exposure or MCT injury compared to non-treated rats (n=5 per group). Protein expression was normalized by Amido black (AB). Scale bar=25 μ m *P<0.05 and ***P<0.001.

Figure 2. HSP90 is increased in PAH-PASMCs and stabilizes HDAC6 expression. **A**, HSP90 expression was assessed by Western blot in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMCs) from control (n=3) and PAH patients (n=5). Protein band densitometry is reported in the corresponding graph. **B**, Expression of HDAC6, acetylated- α -Tubulin, and α -Tubulin was assessed in PAH-PASMCs by Western blot after treatment or not with a pharmacological HSP90 inhibitor (AT13387, 10-100nM for 48 hours) or vehicle (dimethyl sulfoxide). **C**, Expression of HSP90, HDAC6, acetylated- α -Tubulin, and α -Tubulin was assessed in PAH-PASMCs by Western blot after treatments with a siHSP90 or siSCRM (20- 100nM for 48 hours). Blots are representative of two independent experiments.

Figure 3. Inhibition of HDAC6 diminishes PAH-PASMC proliferation and resistance to apoptosis. **A**, Proliferation (Ki67) was measured after treatments of PAH-PASMCs with two pharmacological HDAC6 inhibitors (Tubastatin A and ACY-775) or vehicle (DMSO), as well as siHDAC6 or siSCRM (50nM) for 48 hours. **B**, Apoptosis was similarly assessed following HDAC6 inhibition. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.001. Experiments were performed in triplicate in 3 control and 4 PAH-PASMC cell lines.

Figure 4. HDAC6 inhibition in PAH-PASMCs causes Bax-induced cell death by increasing acetylation of cytosolic Ku70. **A**, Representative Western blots of acetyl(K539)-Ku70 and total Ku70 in PAH-PASMCs after treatments with two HDAC6 inhibitors Tubastatin A and ACY-775 or siHDAC6 for 48 hours. Data were expressed as the ratio of acetyl(K539)-Ku70/total Ku70. **B**, Expression of acetylated(K539)-Ku70 and Ku70 was assessed in distal Pas from control (n=4) and PAH patients (n=5) by Western blot. Data were expressed as the ratio of acetyl(K539)-Ku70/total Ku70. **C**, Apoptosis was measured using Annexin V staining (green) in

control (n=3 cell lines) and PAH-PASMCs (n=3 cell lines) pre-treated or not with Bax inhibitory peptides (BIP-V5, 200μM) or control peptides before being exposed to indicated HDAC6 inhibitors for 48 hours. Representative immunofluorescence images of apoptotic Annexin-V-positive cells (green) stained for DAPI (blue) and corresponding quantification are shown. Scale bar=50μm. Protein expression was normalized by Amido black (AB). ***P<0.001 and ****P<0.001.

Figure 5. Tubastatin A (TubA) improves pulmonary arterial hypertension in the Sugan/Hypoxia (Su/Hx) rat model and provides a therapeutic effect comparable to the combination of standard PAH therapies.

A, Schematic of the experimental design. **B**, RVSP, mPAP, CO, TPR and Fulton index were measured in control, Su/Hx+Veh (dimethyl sulfoxide), Su/Hx+Macitentan (30mg/kg/d) + Tadalafil (10mg/kg/d), Su/Hx+TubA (25mg/kg/d) and Su/Hx+TubA+Macitentan+Tadalafil; n=5 to 7 rats/group. **C**, Expression of acetylated(K539)-Ku70 and Ku70 was assessed by Western blot in distal Pas from control and Su/Hx exposed rats treated or not with Tubastatin A (TubA, 25mg/kg/d), combination of Macitentan (Maci, 30mg/kg/day) and Tadalafil (Tada, 10mg/kg/day) or combination of Tubastatin A, Macitentan and Tadalafil for 2 weeks. TubA-treated Su/Hx rats display increased expression of acetylated(K539)-Ku70 confirming successful inhibitory effect of TubA on HDAC6 activity in distal Pas. Protein expression was normalized by Amido black and protein band densitometry was reported in the corresponding graph. *P<0.05, ***P<0.001 and ****P<0.001 (vs control) and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 (vs Su/Hx+Veh).

Figure 6. HDAC6 inhibition using Tubastatin A decreases vascular remodeling in Su/Hx-induced rats.

A, Representative images of distal pulmonary vessels and corresponding quantification of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness using Hematoxylin and Eosin (H&E) stain and αSMA labeling. **B**, Proliferation (Ki67) and apoptosis (TUNEL) were studied in lungs of control, Su/Hx-PAH+Veh, Su/Hx+Macitentan+Tadalafil, Su/Hx+TubA and Su/Hx+TubA+Macitentan+Tadalafil rats. Representative images of distal pulmonary vessels labeled with Ki67 (top) and TUNEL (bottom) in red. Vascular smooth muscle cells were labeled using alpha smooth muscle actin staining (green). Graphs represent the percentage of PASMCs positive for Ki67- or TUNEL in distal pulmonary vessels. Arrowheads mark positive cells. Scale bar=20μm; n=5 to 7 rats/group (mean of 20 vessels/rat). **P<0.01 (vs control) and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 (vs Su/Hx+Veh).

Figure 7. Hdac6 loss of function in mice confers protection against chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension.

A, HDAC6 expression was measured by Western blot in lungs from wild-type (*Hdac6*^{Y/+}) and *Hdac6* mutant (*Hdac6*^{Y/-}) mice exposed or not to hypoxia for 3 weeks. **B**, RVSP, mPAP, CO, TPR and Fulton index were measured in wild-type and *Hdac6* mutant mice exposed to normoxia or hypoxia

(10% O₂) for 3 weeks. **C**, Representative images of distal pulmonary vessels and corresponding quantification of vascular remodeling as determined by the measure of the medial wall thickness using α SMA labeling. (mean of 10 vessels/mice). Scale bar=20 μ m. Protein expression was normalized by Amido black (AB). N=5 to 10 mice/group. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 and ****P<0.0001.

Figure 8. Proposed model depicting the molecular mechanisms by which HDAC6 promotes vascular remodeling in PAH. To deal with stressful conditions, HDAC6 is overexpressed in PAH-PASMCs and maintains cytosolic Ku70 in a deacetylated state preventing Bax translocation to mitochondria and subsequent apoptosis. This results in increased cell survival contributing to vascular remodeling and PAH progression. Conversely, HDAC6 inhibition increases Ku70 acetylation and Bax release promoting mitochondrial membrane depolarization and programmed cell death.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

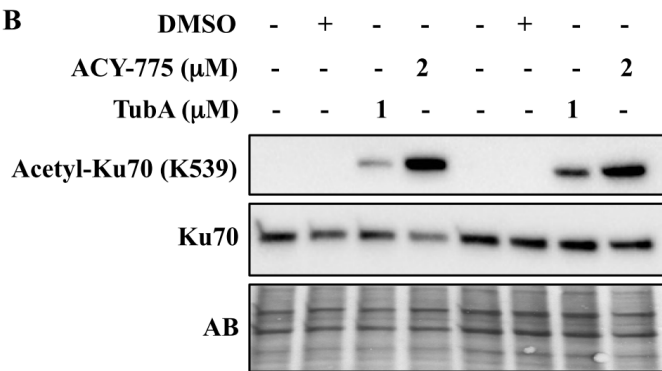
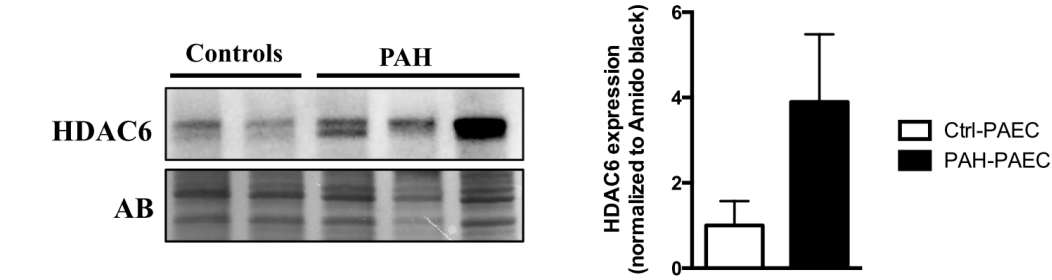
SUPPLEMENTARY TABLE

	Ctrl (n=13)	PAH (n=15)
Age (years)	43±17	55±15
Gender (female (%))	5 (38.5%)	10 (66.6%)
PAH group		
- HPAH		2 (13.3%)
- IPAH		5 (33.3%)
- Ssc-PAH		7 (46.7%)
- CHD-PAH		1 (6.7%)
Functional class (n (%))		
I	-	0
II	-	1 (6.7%)
III	-	5 (33.3%)
IV	-	7 (46.7%)
Unknown		2 (13.3%)
Pulmonary hemodynamics		
mPAP (mmHg)	-	50±10
CO (L.min ⁻¹)	-	4.5±0.9
PVR (dyne.sec ⁻¹ .cm ⁻⁵)	-	722±189
Medication		
Endothelin receptor antagonist	-	8 (53.3%)
PDE5 inhibitor	-	9 (60%)
Prostacyclin analog	-	2 (13.3%)
Unknown	-	4 (26.6%)

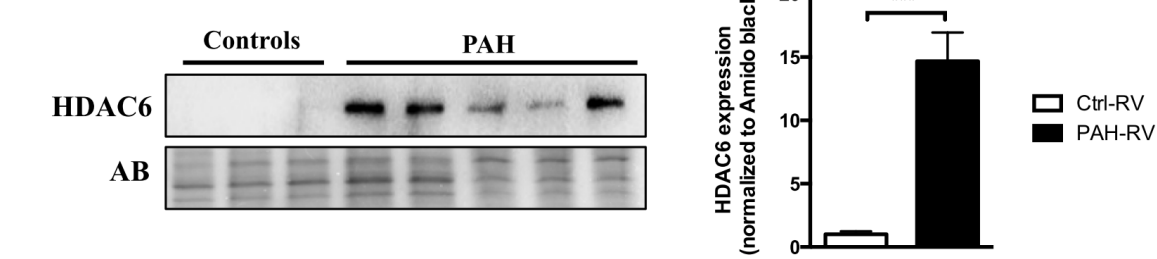
Supplementary Table 1. Baseline characteristics of control and PAH patients. :

Values are means ± SD. HPAH: heritable PAH; IPAH: idiopathic PAH; Ssc-PAH: systemic sclerosis-associated PAH; CHDPAH: congenital heart disease-associated PAH (Eisenmenger syndrome); mPAP: mean pulmonary arterial pressure; CO: cardiac output; PVR: pulmonary vascular resistance; PDE5: phosphodiesterase-5. Please note than some patients take more than one type of medication.

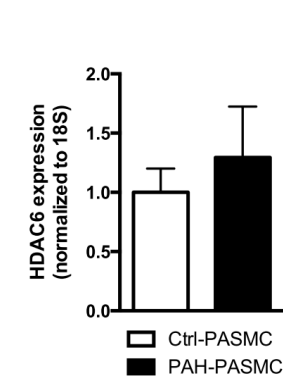
A *Pulmonary arterial endothelial cells*



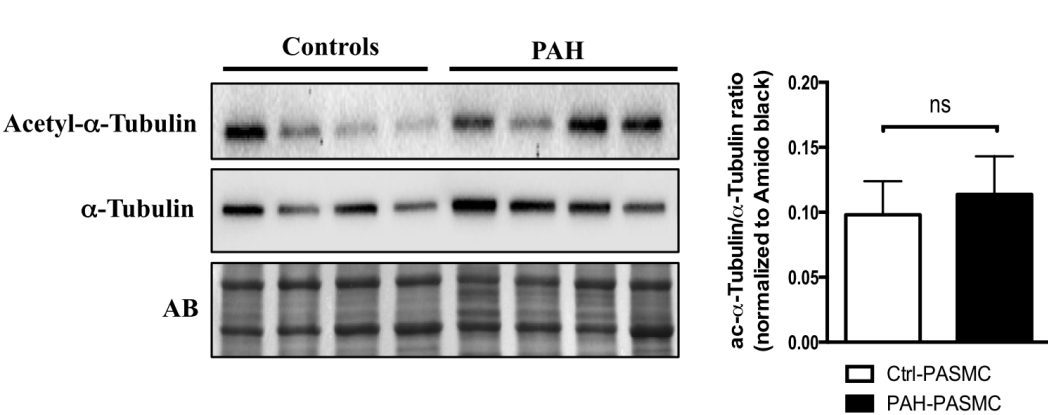
C *Human Right ventricles*



D *Human PASMCs*

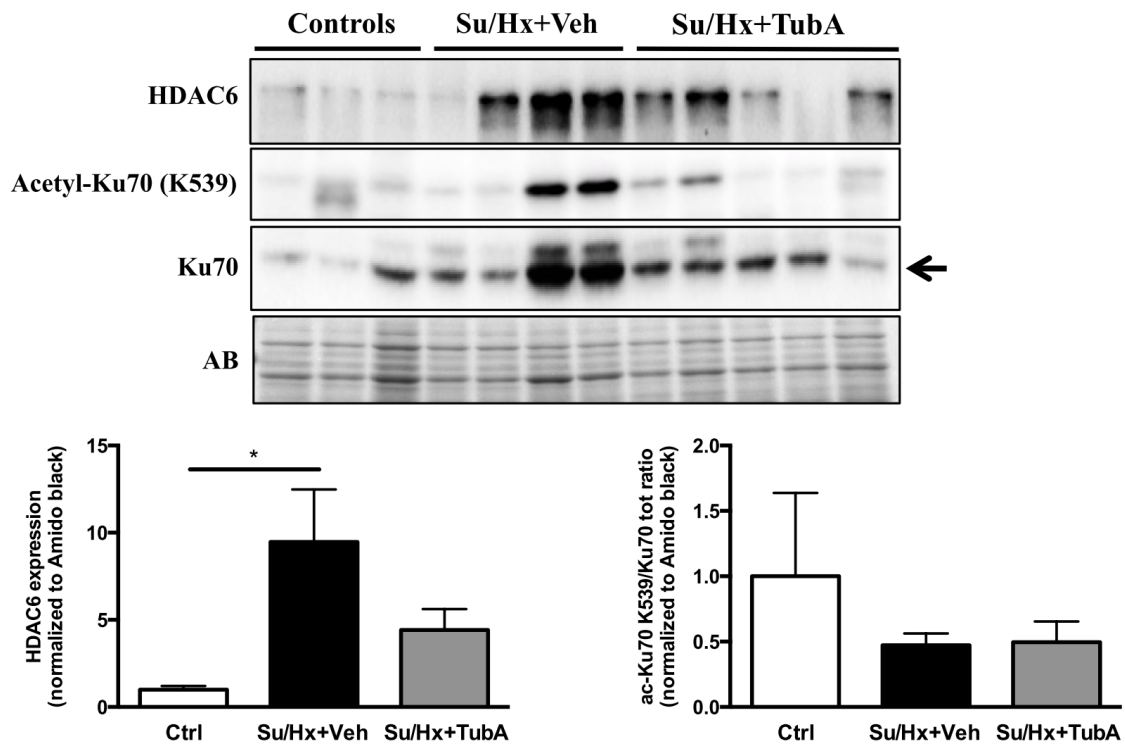


E *Human PASMCs*

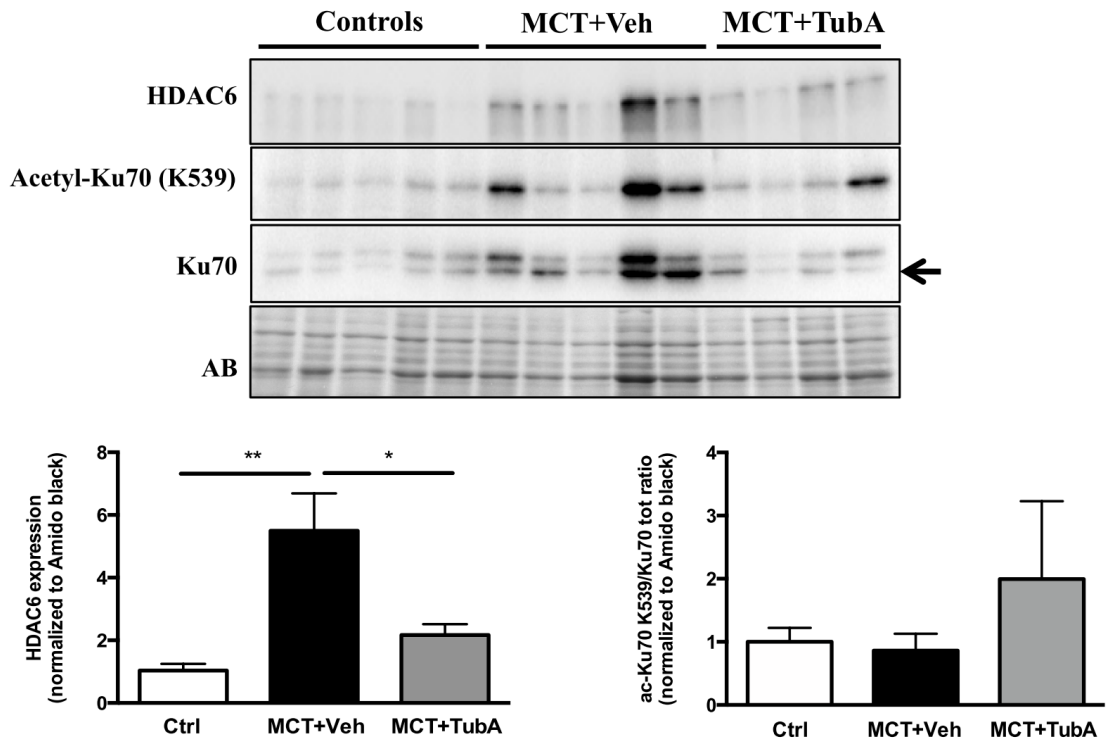


SUPPLEMENTARY FIGURE 1

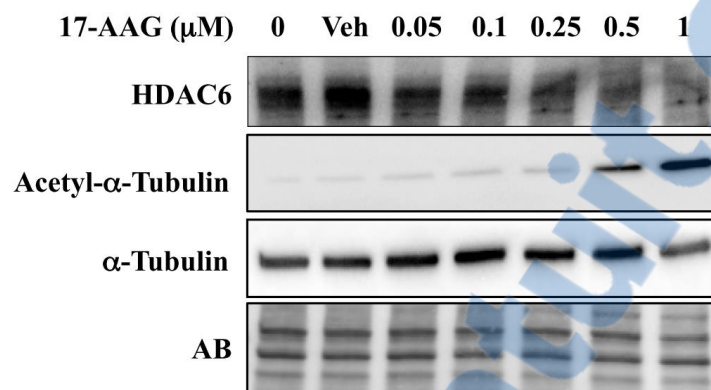
A



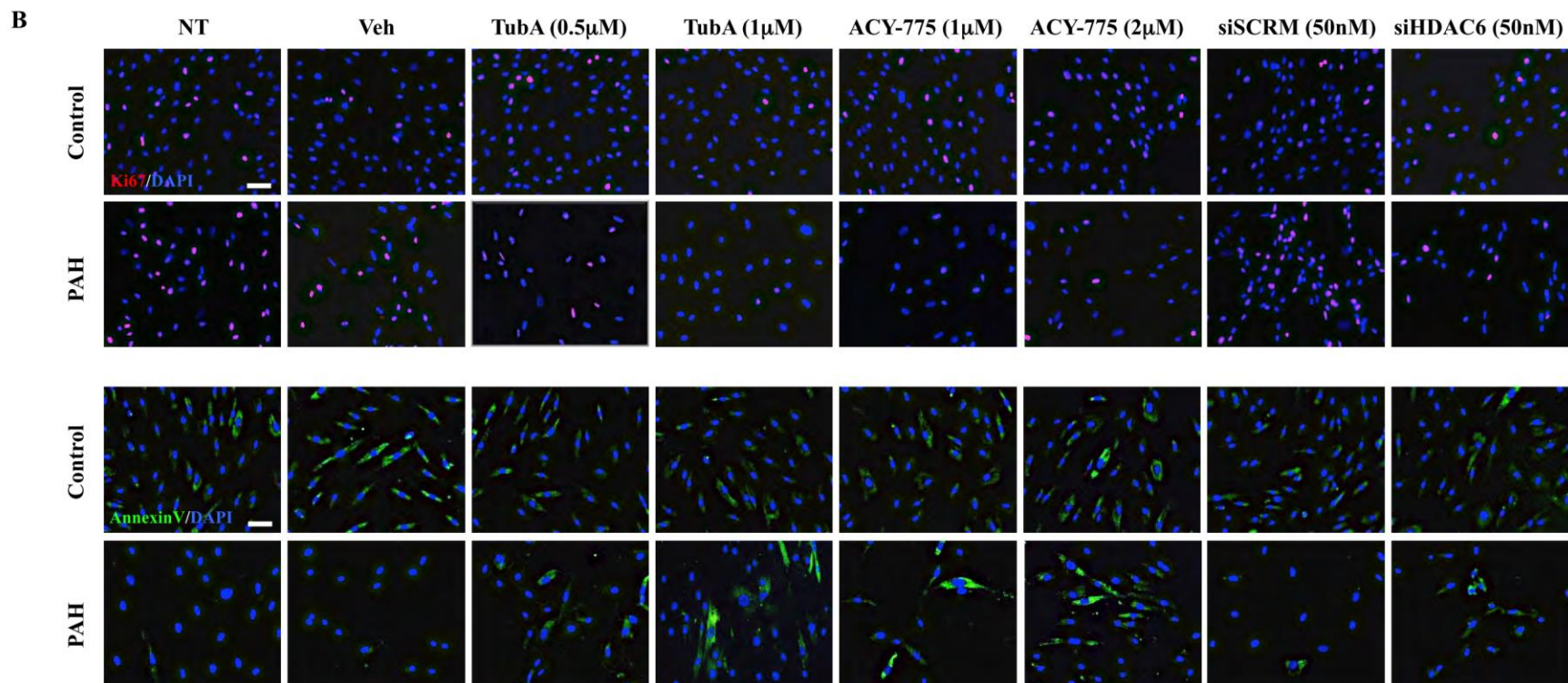
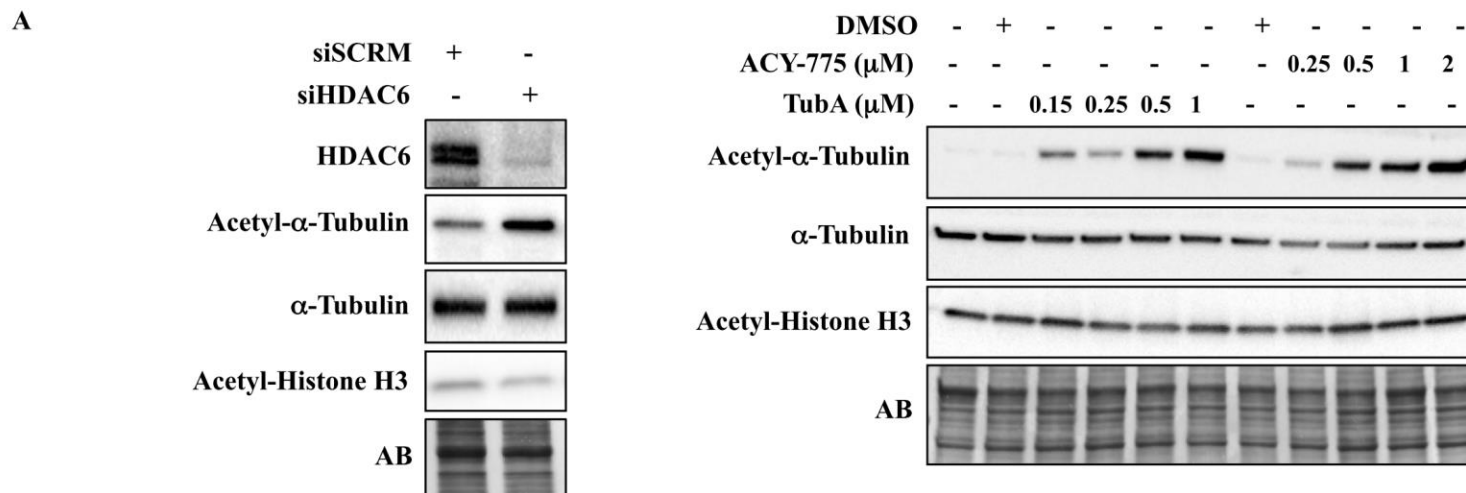
B



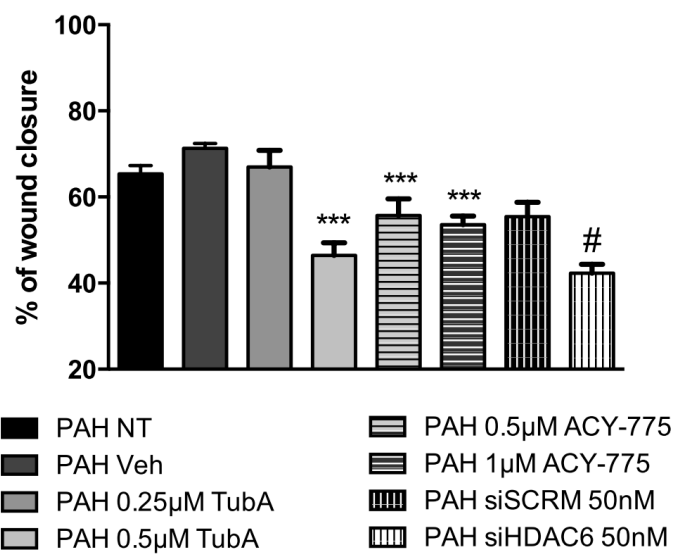
SUPPLEMENTARY FIGURE 2



SUPPLEMENTARY FIGURE 3

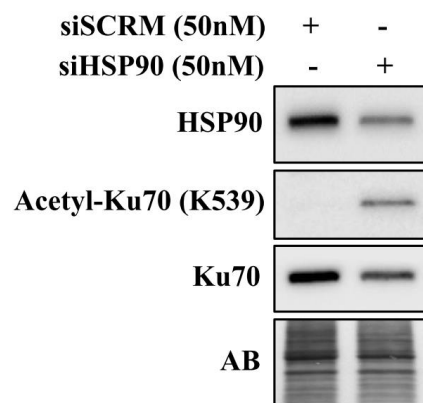
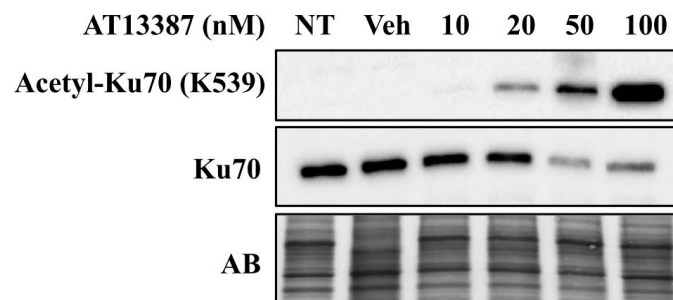


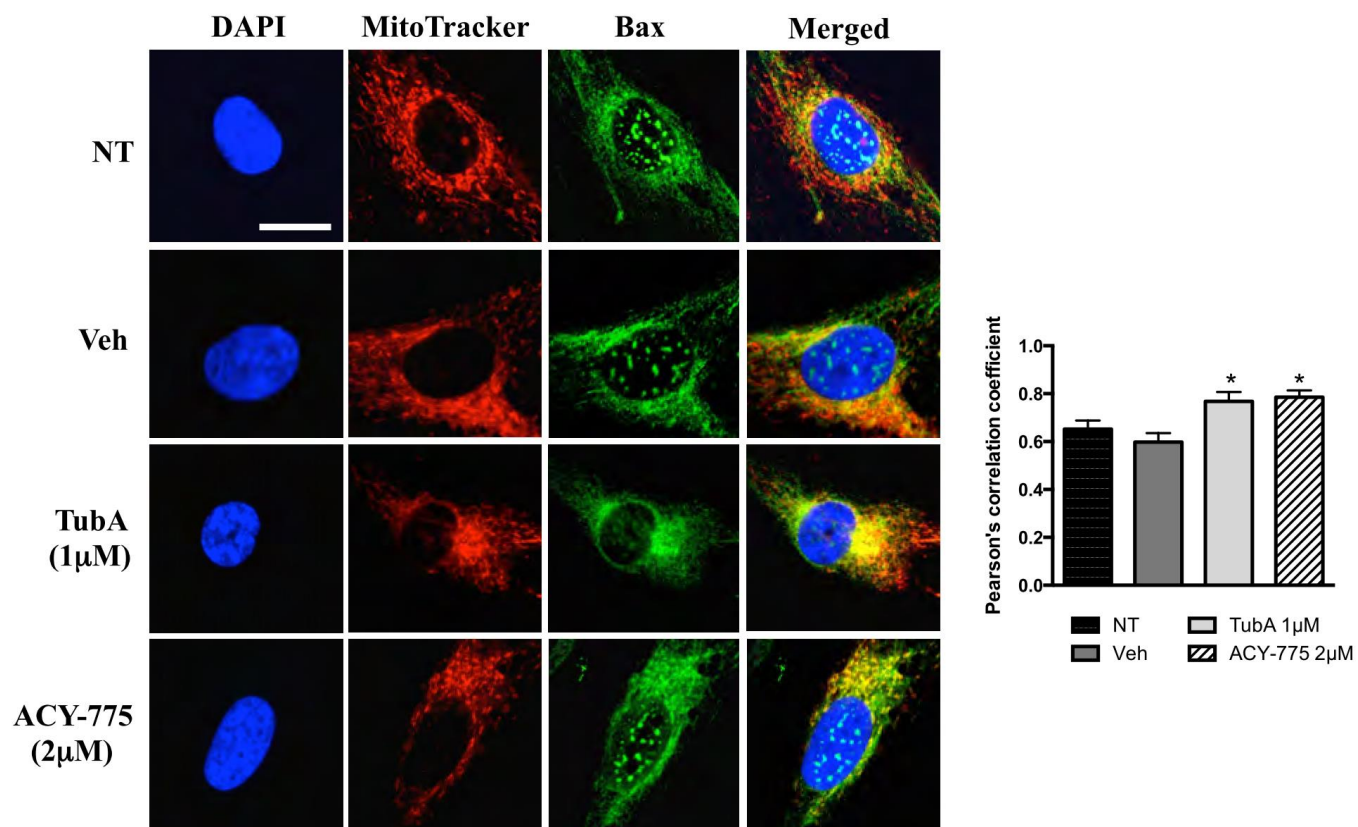
SUPPLEMENTARY FIGURE 4



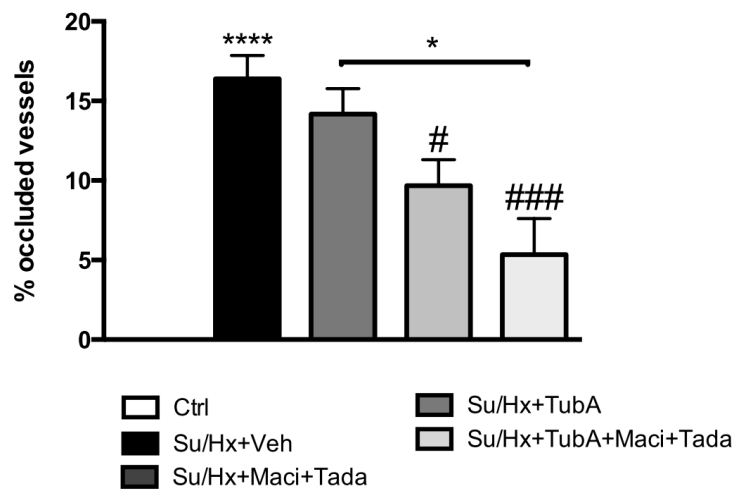
SUPPLEMENTARY FIGURE 5



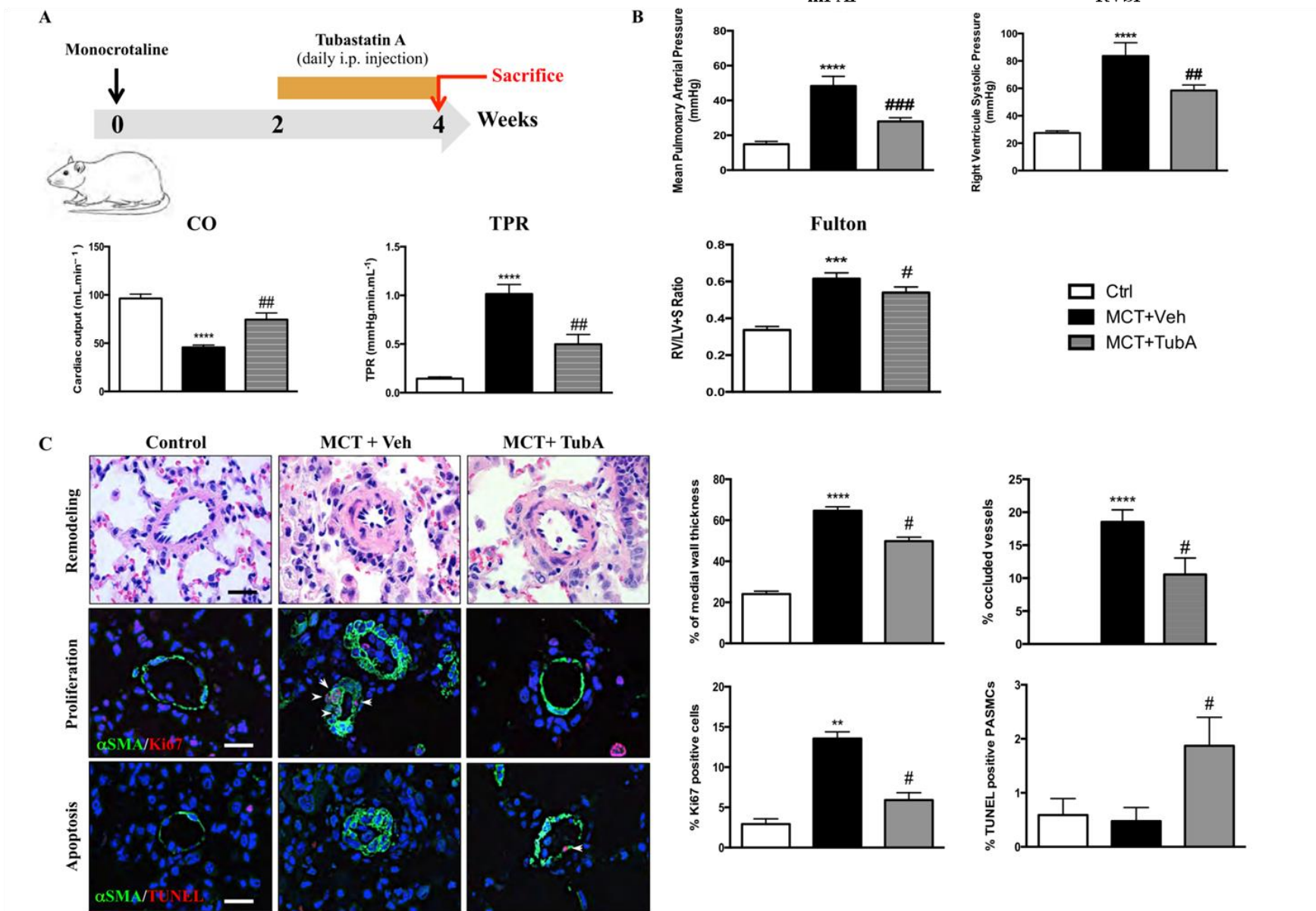
A**B****SUPPLEMENTARY FIGURE 6**



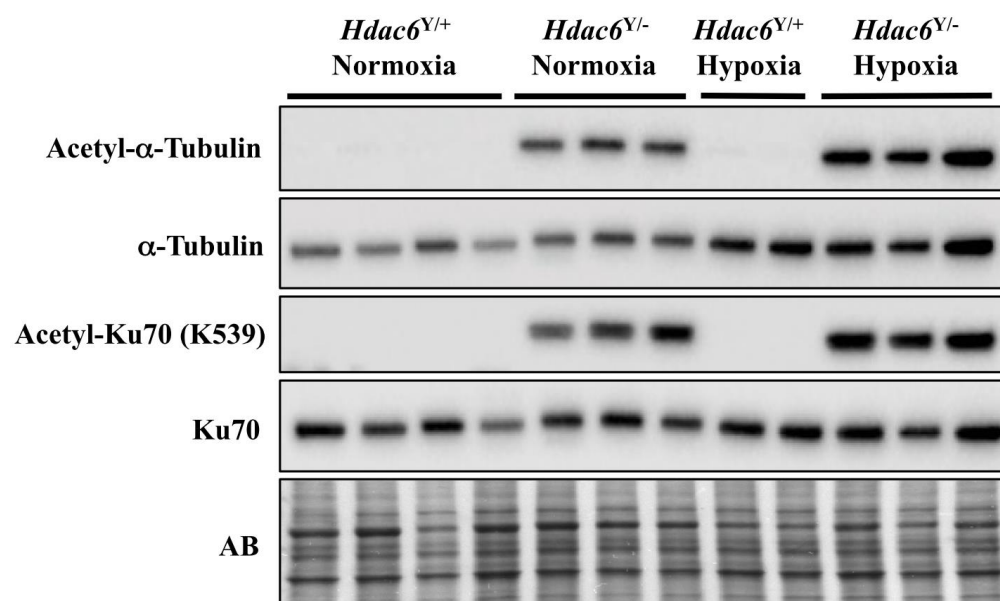
SUPPLEMENTARY FIGURE 7



SUPPLEMENTARY FIGURE 8



SUPPLEMENTARY FIGURE 9



SUPPLEMENTARY FIGURE 10

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. HDAC6 is overexpressed in isolated pulmonary artery endothelial cells and right ventricles from PAH patients. **A**, Western blot and corresponding densitometric analysis of HDAC6 in pulmonary artery endothelial cells (PAEC) isolated from control (n=2) and PAH (n=3) patients. **B**, The expression levels of acetylated-Ku70 (K539) and Ku70 were analyzed by Western blot in PAH-PAECs treated or not with Tubastatin A (1 μ M), ACY-775 (2 μ M) or vehicle (DMSO) for 48 hours. **C**, Western blot and corresponding densitometric analysis of HDAC6 in right ventricles (RV) isolated from control (n=3) and PAH (n=5) patients. **E**, Graph showing relative quantification of HDAC6 mRNA expression between control PSMCs (n=3) and PAH-PSMCs (n=3). **E**, Western blot and corresponding densitometric analysis of acetylated- α -Tubulin/ α -Tubulin ratio in PSMCs isolated from controls (n=4) and PAH (n=4) patients. Protein expression was normalized by Amido black (AB). ***P<0.001. ns: not statistically significant.

Supplementary Figure 2. HDAC6 is overexpressed in right ventricles from Su/Hx and MCT rats. **A**, Western blots and corresponding densitometric analyses of HDAC6 and acetylated Ku70 (K539)/Ku70 ratio in right ventricles from controls (n=3), Su/Hx+Veh (n=4) and Su/Hx+TubA (n=5) rats. **B**, Western blots and corresponding densitometric analyses of HDAC6 and acetylated Ku70 (K539)/Ku70 ratio in right ventricles from controls (n=5), MCT+Veh (n=5) and MCT+TubA (n=4) rats. Protein expression was normalized by Amido black (AB). *P<0.05 and **P<0.01.

Supplementary Figure 3. Pharmacological inhibition of HSP90 activity in PAH-PSMCs using 17-AAG mimics AT13387 effects leading to reduced HDAC6 expression. Expression of HDAC6 in PAHPASMCs was assessed by Western blot after treatment or not with 17-AAG (0.05-1 μ M) or vehicle (dimethyl sulfoxide) for 48 hours. Blots are representative of two independent experiments.

Supplementary Figure 4. Confirmation of HDAC6 inhibition in PAH-PSMCs. **A**, The expression levels of HDAC6, acetylated α -Tubulin, α -Tubulin, acetylated Histone H3 and Histone H3 were analyzed by Western blot in PAH-PSMCs treated or not with Tubastatin A (0.15-1 μ M), ACY-775 (0.25- 2 μ M), siHDAC6 (50nM) or their respective controls for 48 hours. Blots are representative of three independent experiments. **B**, Representative images of control and PAH-PSMCs labeled with Ki67 (proliferation, top panel) and Annexin-V (apoptosis, bottom panel) after treatments with Tubastatin A, ACY-775, siHDAC6 or their respective controls for 48 hours. Scale bar = 50 μ m. Experiments were performed in triplicate in 3 control and 4 PAH-PASMC cell lines.

Supplementary Figure 5. Inhibition of HDAC6 reduces PAH-PASMCs migration. Graphical view showing the percentage of wound after 24 hours. Experiments were performed in three PAH-PASMC cell lines. *** $P < 0.001$ (vs Veh) and # $P < 0.05$ (vs siSCRM).

Supplementary Figure 6. Inhibition of HSP90 using siRNA or AT13387 increases acetylation of Ku70 at lysine 539. **A**, The expression levels of HSP90, acetylated-Ku70 (K539) and Ku70 were assessed in PAH-PASMCs by Western blot after treatments with siHSP90 or siSCRM (50nM for 48 hours). **B**, The expression levels of acetylated-Ku70 (K539) and Ku70 were assessed in PAH-PASMCs by Western blot after treatments with a pharmacological HSP90 inhibitor (AT13387, 10-100nM for 48 hours) or vehicle (DMSO).

Supplementary Figure 7. Inhibition of HDAC6 in serum-starved PAH-PASMCs results in a greater colocalization of Bax with MitoTracker. Representative images of serum-starved PAH-PASMCs treated or not with Tubastatin A (1 μ M), ACY-775 (2 μ M) or Veh for 48h and co-stained with MitoTracker Red and Bax. Colocalization between Bax and MitoTracker was estimated by the Carl Zeiss LSM software using an algorithm that calculates the Pearson's correlation coefficient. Pearson's correlation coefficient was from three independent experiments (three PAH-PASMC cell lines) with ten fields per experiment for a total of 30 fields contributing to the cumulative result. Scale bar=20 μ m. * $P < 0.05$ (vs NT or Veh).

Supplementary Figure 8. Inhibition of HDAC6 in the Sugren/Hypoxia (Su/Hx) rat model reduces the proportion of occluded pulmonary vessels. The percentage of occluded vessels was calculated by counting 50 vessels per animal (n=5 to 7 rats/group). * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ (vs control) and # $P < 0.05$, and ### $P < 0.001$ (vs Su/Hx+Veh).

Supplementary Figure 9. Tubastatin A (TubA) improves hemodynamic parameters, right ventricular hypertrophy and vascular remodeling in the monocrotaline (MCT) rat model. **A**, Schematic of the experimental design. **B**, Right ventricular systolic pressure (RVSP), mean pulmonary artery pressure (mPAP), cardiac output (CO), total pulmonary vascular resistance (TPR) and right ventricular hypertrophy were measured in control, MCT+Veh (dimethyl sulfoxide) and MCT+TubA (25mg/kg/d) rats; n=7 to 11 rats/group. **C**, Representative images of distal pulmonary vessels stained with Hematoxylin and Eosin (H&E) or labeled with Ki67 (proliferation, red) or TUNEL (apoptosis, red). Vascular smooth muscle cells were labeled using alpha smooth muscle actin (α SMA, green). Graphs represent the degree of vascular remodeling (as determined by the measure of the medial wall thickness and the percent of occluded vessels by H&E stain or α SMA labeling) and the percentage of PASMCs positive for Ki67 or TUNEL in distal pulmonary vessels. Arrowheads mark

positive cells. Scale bar=20µm; n=7 to 11 rats/group. **P<0.01; ***P<0.001; ****P<0.0001 (vs control) and #P<0.05, ##P<0.01, and ###P<0.001 (vs MCT+Veh).

Supplementary Figure 10. Normoxic or chronically hypoxic *Hdac6* mutant mice exhibit increased acetylation of α -Tubulin and Ku70. The expression levels of acetylated- α -Tubulin, α -Tubulin, acetyl(K539)-Ku70 and Ku70 were measured by Western blot in lungs from wild-type (*Hdac6*^{Y/+}) and *Hdac6* mutant (*Hdac6*^{Y/-}) mice exposed to either normoxia or hypoxia for 3 weeks.

Rapport-Gratuit.com

CHAPITRE 3 : Discussion et Conclusion

Discussion

Nous avons démontré pour la première fois l'implication de l'histone désacétylase 6, à l'aide de tissus humains et de 3 modèles animaux, dans le phénotype pro-prolifératif et anti-apoptotique des CMLAPs HTAP. En effet, nous montrons qu'HDAC6 est fortement surexprimée dans les poumons, artères pulmonaires distales et CMLAPs isolées de patients HTAP. De plus, l'inhibition d'HDAC6 renverse le phénotype de type cancéreux dans les CMLAPs HTAP en diminuant leur résistance à l'apoptose et leur taux de prolifération. *In vivo*, nous avons montré que l'inhibition pharmacologique d'HDAC6 par la tubastatine A améliorait les paramètres hémodynamiques dans deux modèles précliniques murins (Su/Hx et MCT), et que le traitement pouvait être combinée de manière sécuritaire à une bithérapie actuellement approuvée. Ces améliorations hémodynamiques sont imputables à une diminution du remodelage artériel pulmonaire due à une diminution de la prolifération et une augmentation de l'apoptose des cellules d'artères pulmonaires distales.

Il a été montré qu'HDAC6 désacétyle KU70, entraînant la séquestration de Bax, permettant ainsi aux cellules d'éluder l'apoptose (214). Nous observons que l'inhibition d'HDAC6 dans les CMLAPs HTAP entraîne l'augmentation de l'acétylation de KU70 à la lysine 539, un site critique à la liaison de Bax (214), suggérant une dissociation du complexe KU70-Bax. Une colocalisation de Bax avec le marqueur des mitochondries mitotracker (fig.S7) lorsque HDAC6 est inhibée les cellules HTAP nous suggère la même chose. Aussi, un prétraitement avec un peptide inhibiteur de Bax permettait aux CMLAPs HTAP d'éluder l'apoptose provoquée par l'inhibition d'HDAC6, confirmant le lien HDAC6-KU70-Bax. KU70 est aussi une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN. En effet, les souris mutantes KU70 meurent de manière prématurée en raison de l'instabilité de leur génome. Celles-ci développent aussi des occlusions vasculaires se traduisant en des diminutions du temps d'accélération dans l'artère pulmonaire à l'échocardiographie, indice d'une augmentation de pression artérielle pulmonaire (215). Une étude portant sur des cellules de cancer de la prostate a mis en lumière l'apport de ce même résidu de lysine, K539, comme étant l'un des sites de liaison de KU70 avec les cassures d'ADN double brin (189). L'inhibition d'HDAC6 combinée à différentes chimiothérapies augmente la sensibilité des cellules cancéreuses à ces agents, justement en augmentant le dommage à l'ADN (188) (208). Le phénotype observé suite à l'inhibition d'HDAC6 dans nos cellules et nos modèles pourrait donc avoir des conséquences sur deux mécanismes de survie attribuable à KU70, soit la séquestration de Bax et la réparation du dommage à l'ADN.

Nous proposons qu'HDAC6 est surexprimée en réponse à l'augmentation de la protéine chaperonne HSP90, elle-même augmentée en raison des médiateurs inflammatoires circulants présents dans l'environnement pulmonaire HTAP (142). Bien que l'inverse, soit la régulation d'HSP90 par HDAC6, soit aussi établie dans la littérature (136), la tubastatine A n'entraîne pas d'augmentation d'acétylation d'HSP90 dans nos cellules humaines HTAP. D'autres mécanismes pourraient aussi être responsables de l'augmentation d'expression



d'HDAC6. Le lecteur épigénétique à bromodomaine BRD4, dont la surexpression a récemment identifié par notre équipe comme jouant un rôle dans la pathogénèse de l'HTAP (101), a été reconnu comme pouvant se lier au promoteur du gène d'HDAC6 (216).

Aussi, nous avons confirmé l'implication d'HDAC6 dans l'étiologie de l'HTAP à l'aide de souris mutantes *hdac6^{Y/-}*, celles-ci étant partiellement protégées de l'augmentation des pressions pulmonaires dans un modèle d'hypoxie chronique par rapport à leurs contreparties *hdac6^{Y/+}*. Les souris sauvages ont d'ailleurs développé un épaississement de la couche de CML dans les artères pulmonaires distales significativement plus important que les souris mutées pour HDAC6, démontrant une fois de plus qu'HDAC6 puisse jouer un rôle dans le remodelage observé en HTAP. Les souris mutées sont aussi connues pour avoir une population de cellules T régulatrices (Treg) particulière plus importante que leur contrepartie sauvage (217). HDAC6 et HSP90 sont déterminantes dans la fonction des Treg, leur inhibition pouvant améliorer leur fonction et augmenter leur nombre dans un modèle d'autoimmunité (217). Or, les Treg, lorsque absents ou dysfonctionnels, prédisposent à l'hypertension pulmonaire car ceux-ci jouent un rôle important dans la prévention de la dysfonction endothéliale (70) (218). L'inhibition d'HDAC6 pourrait exercer ses effets en modulant une réponse immunitaire Treg dépendante. De plus, la tubastatine A, l'inhibiteur HDAC6 spécifique utilisé dans notre étude, diminue l'expression de $TNF\alpha$ et IL-6, deux cytokines inflammatoires largement documentées comme étant impliquées dans le remodelage vasculaire (219) (220) (221) (222).

Un acteur très important dans le développement de l'HTAP est NFAT (nuclear factor of activated T cell). En effet, ce facteur de transcription joue un rôle critique dans la résistance à l'apoptose des CMLAP-HTAP en contribuant à l'hyperpolarisation mitochondriale, à la diminution de l'expression de $K_v1.5$ et à l'augmentation de la protéine anti-apoptotique BCL-2 (86). Dans les cellules lymphatiques, il a été montré que l' α -tubuline et NFAT forment un complexe et sont ensuite cotransportées au noyau par l'Importin- β (223). De manière fort intéressante, en inhibant HDAC6 avec la trichostatine A ou l'acétate, l'acétylation de l' α -tubulin est augmentée, mais n'empêche pas la formation du complexe avec NFAT. Toutefois, il réduit la capacité de translocation de NFAT par l'Importin- β (223). Ces résultats nous suggèrent que l'inhibition d'HDAC6 en HTAP pourrait indirectement jouer sur l'activité du facteur de transcription de NFAT en empêchant sa translocation nucléaire.

Le rôle d'HDAC6 dans la clairance des protéines mal repliées par autophagie préférentiellement par le système ubiquitine-protéasome (224) (187) a été bien établi dans plusieurs maladies dégénératives (184) (183). En effet, un équilibre entre le complexe p97/VCP, favorisant la dégradation des protéines ubiquitinyliées par le protéasome, et HDAC6, favorisant leur agrégation, existe dans une cellule saine. Grâce à son domaine de liaison à l'ubiquitine et au moteur dynéine, HDAC6 peut faciliter la maturation de l'autophagosome et

transporter le cargo sur les microtubules (225) (186). L'autophagie étant un mécanisme adaptatif permettant la survie de la cellule même sous un grand stress, l'efficacité de l'inhibition d'HDAC6 dans nos modèles cellulaires et animaux HTAP pourrait aussi s'expliquer par une disruption de ce système, entraînant l'accumulation cytotoxique d'agrégats de protéines mal repliées.

Les mitochondries contribuent au phénotype profond de l'HTAP étant dérégulées de plusieurs manières (226). HDAC6 intervient dans le contrôle qualité des mitochondries, leur connectivité et leurs mouvements. Les mitochondries ont aussi la capacité de bouger dans la cellule, une propriété particulièrement importante dans les cellules très polarisées comme les neurones, mais qui trouve aussi son importance dans tous les types cellulaires (185) (227). Les mitochondries HTAP ont un déséquilibre fusion/fission, c'est-à-dire qu'elles ont une propension à se fragmenter plutôt qu'à s'assembler en réseau (228) (229). Récemment, l'équipe de Guedes-Dias et collaborateurs a apporté une piste intéressante quant à l'implication d'HDAC6 dans la dynamique mitochondriale (185). Dans leur étude portant sur deux types de cellules neuronales isolées de rats, ils ont établi que les mitochondries d'un type neuronal étaient intrinsèquement moins motiles et portées à la fission par rapport au second type. Le même phénotype est observé en HTAP par rapport aux cellules saines. Cette baisse de motilité a été corrélée avec la diminution des niveaux d'acétyl- α tubuline provoquée par une expression augmentée d'HDAC6. Le recrutement de protéines motrices étant directement associé à l'acétylation de l' α -tubuline (230) (231), et sachant qu'une plus grande motilité mitochondriale augmente les probabilités de fusion, les auteurs ont émis l'hypothèse que l'inhibition pharmacologique d'HDAC6 permettrait d'augmenter la motilité et la fusion en augmentant les niveaux d'acétylation de l' α -tubuline. Effectivement, sans observer de modification sur le niveau total de mitochondries ni le niveau de protéines impliquées dans la fusion et la fission, la tubastatine A, l'inhibiteur sélectif d'HDAC6 utilisé dans notre étude, a permis d'augmenter la taille et la motilité des mitochondries ainsi que de réduire le nombre, changeant ainsi la balance fusion/fission de la cellule. Cet aspect mérite d'être investigué plus en profondeur dans le contexte de l'HTAP.

Aussi, nous avons vérifié si l'inhibition d'HDAC6 permettait de diminuer la propension des CMLAPs-HTAP à la migration. Nous avons effectué un test in vitro de fermeture de plaie, et avons observé un effet bénéfique de l'inhibition pharmacologique et moléculaire d'HDAC6 sur la migration. Nous n'avons pas évalué par quel mécanisme spécifique la migration des cellules HTAP était altérée. Cependant, nous pouvons proposer quelques pistes d'investigation. En effet, l'augmentation de l'acétylation de l' α -tubuline a pu augmenter la stabilité des microtubules (207), diminuant la capacité de migration des cellules. L'inhibition d'HDAC6 a aussi pu entraîner une diminution de l'interaction de la cortactine avec le squelette d'actine en promouvant sa localisation nucléaire (205), diminuant la capacité de migration des cellules. L'un ou l'autre de ces processus, ou encore une combinaison des deux, pourraient représenter des mécanismes plausibles à la diminution de migration en réponse à l'inhibition d'HDAC6.

Nous n'avons pas exploré l'incidence de l'inhibition d'HDAC6 sur les ROS. En regard de la littérature, il est cependant possible d'émettre quelques hypothèses. L'augmentation d'espèces oxygénées réactives (ROS) est un facteur soupçonné de provoquer des dommages à l'ADN et de stabiliser HIF1 α en HTAP (232) (82) (132). Les peroxiredoxins I et II (Prx I, PrxII) ont pour rôle de réduire le peroxyde, mais leur activité est inhibée par une trop grande quantité de ce dernier. Cependant, suite à l'inhibition d'HDAC6, la forme acétylée des Prx s'accumule et celle-ci est plus active à réduire l'H₂O₂ (194). Il serait intéressant de vérifier si le changement de phénotype observé suite à l'inhibition d'HDAC6 dans nos cellules pourrait impliquer un changement de la quantité de ROS via les Prx.

La démonstration de l'importance des CE et les fibroblastes de l'*adventia* dans le remodelage artériel pulmonaire des patients HTAP n'est plus à faire. Nous avons observé qu'HDAC6 était augmentée dans les CE des AP HTAP. C'est pourquoi nous avons exploré l'effet de l'inhibition d'HDAC6 sur les CE (présenté dans la section supplémentaire de l'étude). Nous avons observé les mêmes mécanismes observés dans les CMLAPs, soit une augmentation de l'acétylation de KU70 et un rétablissement du déséquilibre entre prolifération et apoptose. Nous n'avons pas exploré l'effet de l'inhibition d'HDAC6 chez les fibroblastes.

De plus, telle que mentionnée dans l'introduction, le facteur de transcription RUNX2, interagit avec HDAC6 en le recrutant au noyau, un processus nécessaire à la différenciation des cellules d'ostéoblastes (191). La surexpression de Runx2 en HTAP étant un processus pouvant mener à la calcification des artères pulmonaires des patients (94), il aurait pu être intéressant d'étudier le rôle d'HDAC6 dans ce processus. Si HDAC6 venait à être impliqué, et considérant que les souris *runx2*^{-/-} ne sont pas viables, une meilleure compréhension du processus de calcification pourrait peut-être survenir en étudiant les souris *hdac6*^{Y/-}.

Notre étude apporte un souffle nouveau dans l'étude de l'inhibition des histones désacétylases en HTAP. En effet, bien que certains effets positifs aient été rapportés sur le remodelage artériel d'un modèle expérimental en utilisant des inhibiteurs d'HDAC de classe I, d'autres n'ont rapporté aucun effet thérapeutique ou pire, une diminution des fonctions cardiaques suite à l'utilisation d'inhibiteur pan-HDAC (155) (154) (156) (157). La spécificité des inhibiteurs utilisés avait été soulevée comme un problème à l'utilisation des inhibiteurs d'HDAC vu les effets secondaires non désirés sur le cœur droit, dont la fonction doit absolument être préservée pour espérer soigner les patients (233) (234). Nous démontrons qu'HDAC6 est surexprimé spécifiquement dans les ventricules droits de patients HTAP comparés aux contrôles sains, et les modèles expérimentaux traités aux inhibiteurs d'HDAC6 ont une hypertrophie cardiaque droite diminuée. De plus, les animaux traités à l'inhibiteur d'HDAC6 combiné à la bithérapie ont une amélioration significative des fonctions cardiaques, telle que montrée par la normalisation du débit cardiaque par rapport aux contrôles. Ainsi, les préoccupations en regard de la

toxicité cardiaque des inhibiteurs pan-HDAC peuvent vraisemblablement être écartées par l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques d'HDAC6.

La prise en charge des patients HTAP a été parmi les premières à s'adapter aux caractéristiques des patients dans le but d'orienter le choix de traitement. Dès les années 80, les patients étaient orientés ou non vers des bloqueurs de canaux calciques ou non en fonction du test de vasoréactivité effectué au diagnostic. De plus en plus de chercheurs spécialisés dans la recherche de facteurs de développement ayant des potentiels thérapeutiques dans différentes sphères de la santé humaine, notamment dans l'étude des cancers, parlent d'adapter la médication en fonction des patients. Ce courant de médecine personnalisée promeut l'identification de caractéristiques spécifiques présentent chez un patient en particulier pour l'aider à combattre avec plus de précision à l'aide d'inhibiteurs hautement spécifiques. Le traitement de l'HTAP ne saurait échapper à ce courant, particulièrement devant la pléiade de facteurs identifiés comme étant impliqués dans le développement du remodelage vasculaire, dont certaines ont été mentionnées précédemment, et ce sans même s'aventurer dans les molécules associées aux dysfonctions cardiaques et musculaires des patients HTAP qui font l'objet d'une littérature fournie. Il est clair que les traitements actuels ont des limites, et ne réussissent pas à complètement guérir l'HTAP. Notre étude met en lumière la possibilité d'un ajout bénéfique d'inhibiteur d'HDAC6 à la médication actuelle chez la proportion de patients ayant une surexpression de cette protéine dans leurs tissus.

Conclusion

En conclusion, nous sommes les premiers à identifier la surexpression de l'histone désacétylase 6 en HTAP et à l'identifier comme cible thérapeutique de choix. Nous avons obtenu nos résultats à partir de tissus issus de donneurs sains et HTAP, de cellules isolées de ces derniers et testé 2 différents inhibiteurs d'HDAC6. Nous avons observé qu'HDAC6 est surexprimée dans les tissus et cellules isolées. L'inhibition d'HDAC6 diminue le taux de prolifération et de la résistance à l'apoptose des cellules HTAP, sans pour autant qu'il n'y ait d'effet sur les cellules saines. Nous avons ensuite vérifié l'effet de l'inhibition d'HDAC6 sur 2 modèles précliniques d'HTAP, dont l'un en combinaison avec une bithérapie pertinente représentant celle d'un patient HTAP typique de 2016 et avons observé des effets bénéfiques et même potentialisateurs de la combinaison de thérapie. Nous avons finalement confirmé l'implication d'HDAC6 dans la pathogénèse dans un modèle de souris mutantes exposées à l'hypoxie chronique et avons observé qu'une protection au développement de l'HTAP était conférée aux souris mutées pour HDAC6 par rapport à leurs compagnons sauvages.

Cette étude a ainsi un haut potentiel translationnel. Le besoin de stratégie thérapeutique ciblant exclusivement les cellules malades sans affecter les cellules saines est de plus en plus soulevé. HDAC6 est une protéine de

stress, dont l'expression est presque absente dans les tissus et cellules isolés de donneurs sains, en faisant une cible thérapeutique intéressante. Aussi, des inhibiteurs spécifiques d'HDAC6 sont présentement en étude clinique dans plusieurs types de cancers. L'étude pourrait donc avoir un impact direct sur la stratégie thérapeutique des patients HTAP rapidement, pourvu que les résultats soient répliqués par des équipes indépendantes.

Bibliographie

1. **A. Chaouat, M. Humbert.** Remodelage vasculaire pulmonaire - Pulmonary vascular remodeling. *La Lettre du Pneumologue* . 2003, Vol. VI, 19.
2. **Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX.** New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca^{2+} signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012, Vol. 302.
3. **Nazzareno Galiè, Marc Humbert, Jean-Luc Vachieri, Simon Gibbs, Irene Lang, Adam Torbicki, Gérald Simonneau, Andrew Peacock, Anton Vonk Noordegraaf, Maurice Beghetti, Ardeschir Ghofrani, Miguel Angel Gomez Sanchez, Georg Hansmann, Walter Klepetko, et al.** 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*. 2016, pp. 67–119.
4. **Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM, Souza R.** Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013, Vol. 62, 25.
5. **Galiè N, Hoeper M, Humbert M, et al.** Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *Eur Heart J* . 2009, Vol. 30.
6. **John J. Ryan, Jessica Huston, Shelby Kutty, Nathan D. Hatton , Lindsay Bowman, Lian Tian, Julia E. Herr, Amer M. Johri, Stephen L. Archer.** Right Ventricular Adaptation and Failure in Pulmonary Arterial Hypertension. *Canadian Journal of Cardiology*. 2015, Vol. 31, 4.
7. **Ling Y, Johnson MK, Kiely DG, Condliffe R, Elliot CA, Gibbs JS, Howard LS, Pepke-Zaba J, Sheares KK, Corris PA, Fisher AJ, Lordan JL, Gaine S, Coghlan JG, Wort SJ, Gatzoulis MA, Peacock AJ.** Changing demographics, epidemiology, and survival of incident pulmonary arterial hypertension: results from the pulmonary hypertension registry of the United Kingdom and Ireland. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012, Vol. 186, pp. 790–796.
8. **Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaïci A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jaïs X, Montani D, Souza R, Simonneau G.** Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010, Vol. 122, pp. 156–163.
9. **Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, et al.** Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006, 173.
10. **EF, Van Epps.** Primary pulmonary hypertension in brothers. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*. 1957, Vol. 78, 3, pp. 471–482.
11. **Loyd JE, Primm RK, Newmann JH.** Transmission of familial primary pulmonary hypertension. *Am Rev Respir Dis* . 1984, Vol. 129.
12. **Lane KB, Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, Philipps JA III, Loyd JE, Nichols WC, Trembath RC.** Heterozygous germline mutations in BMPR II, encoding a TGF- β receptor, cause familial primary hypertension. *Nat Genet* 2000 . 2000, Vol. 67.
13. **Montani D, Günther S, Dorfmueller P, Perros F, Girerd B, Garcia G, Jaïs X, Savale L, Artaud-Macari E, Price LC, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O.** Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis*. Jul 6, 2013.
14. **Thomson JR, Machado RD, Pauciulo MW, Morgan NV, Humbert M, Elliott GC, Ward K, Yacoub M, Mikhail G, Rogers P, Newman J, Wheeler L, Higenbottam T, Gibbs JS, Egan J, Crozier A, Peacock A, Allcock R, Corris P, Loyd JE, Trembath RC, Nichols WC.** Sporadic primary pulmonary hypertension is

associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *Journal of medical genetics*. Oct 2000, pp. 741-5.

15. **Rich S, Dantzker DR, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Koerner SK.** Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med*. 1987, pp. 216–223.

16. **Bonow R, Mann D, Zipes D, Libby P, Rich S.** Pulmonary hypertension. [book auth.] Mann D, Zipes D, Libby P Bonow R. *Braunwald's heart disease: A textbook of cardiovascular medicine*. 2012, pp. 1696–1718.

17. **Rich, Jonathan D. Rich and Stuart.** Clinical Diagnosis of Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2014, Vol. 130, 20.

18. **Bossone E, D'Andrea A, D'Alto M, Citro R, Argiento P, Ferrara F, Cittadini A, Rubenfire M, Naeije R.** Echocardiography in pulmonary arterial hypertension: from diagnosis to prognosis. *J Am Soc Echocardiogr*. 2013, Vol. 26.

19. **Yen-Chun Lai, Karin C. Potoka, Hunter C. Champion, Ana L. Mora and Mark T. Gladwin.** Pulmonary Arterial Hypertension - The Clinical Syndrome. *Circ. Res*. 2014, Vol. 115.

20. **Barst RJ, McGoon M, Torbicki A, Sitbon O, Krowka MJ, Olschewski H, Gaine S.** Diagnosis and differential assessment of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004, Vol. 43(Suppl 1), pp. S40–S47.

21. **Miyamoto S, Nagaya N, Satoh T, et al.** Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000, Vol. 161.

22. **Benza RL, Miller DP, Gomberg-Maitland M, Frantz RP, Foreman AJ, Coffey CS, Frost A, Barst RJ, Badesch DB, Elliott CG, Liou TG, McGoon MD.** Predicting survival in pulmonary arterial hypertension: insights from the Registry to Evaluate Early and Long-Term Pulmonary Arterial Hypertension Disease Management (REVEAL). *Circulation*. 2010, Vol. 122.

23. **Savarese G, Paolillo S, Costanzo P, D'Amore C, Cecere M, Losco T, Musella F, Gargiulo P, Marciano C, Perrone-Filardi P.** Do changes of 6-minute walk distance predict clinical events in patients with pulmonary arterial hypertension? A meta-analysis of 22 randomized trials. *J Am Coll Cardiol*. 2012, Vol. 60.

24. **Nagaya N, Nishikimi T, Okano Y, et al.** Plasma brain natriuretic peptide levels increase in proportion to the extent of right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 1998, Vol. 31.

25. **Warwick G, Thomas PS, Yates DH.** Biomarkers in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2008, Vol. 32.

26. **HH Leuchte, M Holzapfel, RA Baumgartner, et al.** Clinical significance of brain natriuretic peptide in primary pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004, Vol. 43.

27. **Leuchte HH, El NM, Tuerpe JC, Hartmann B, Baumgartner RA, Vogeser M, Muehling O, Behr J.** N-terminal pro-brain natriuretic peptide and renal insufficiency as predictors of mortality in pulmonary hypertension. *Chest*. 2007, Vol. 131.

28. **Herve P, Humbert M, Sitbon O, Parent F, Nunes H, Legal C, Garcia G, Simonneau G.** Pathobiology of pulmonary hypertension: the role of platelets and thrombosis. *Clin Chest Med*. 2001, Vol. 22.

29. **Fuster V, Steele PM, Edwards WD, Gersh BJ, McGoon MD, Frye RL.** Primary pulmonary hypertension: natural history and the importance of thrombosis. *Circulation*. 1984, Vol. 70.

30. **JN, Cohn.** Optimal diuretic therapy for heart failure. *Am J Med*. 2001, Vol. 111.

31. **Sandoval J, Aguirre JS, Pulido T, Martinez-Guerra ML, Santos E, Alvarado P, Rosas M, Bautista E.** Nocturnal oxygen therapy in patients with the Eisenmenger syndrome. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001.

32. **Humbert M, Sitbon O, Simonneau G.** Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004.

33. **Marc Humbert, Nicholas W Morrell, Stephen L Archer, Kurt R Stenmark, Margaret R MacLean, Irene M Lang, Brian W Christman, E.Kenneth Weir, Oliver Eickelberg, Norbert F Voelkel, Marlene Rabinovitch.** Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. . *J Am Coll Cardiol.* . 2004, pp. 13S-24S.
34. **Adel Giaid, Masashi Yanagisawa, David Langleben, Rene P. Michel, Robert Levy, Hani Shennib, Sadao Kimura, Tomoh Masaki, William P. Duguid, and Duncan J. Stewart.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993, pp. 1732-9.
35. **Sitbon O, Humbert M, loos V, et al.** Who benefits from long-term calcium-channel blocker therapy in primary pulmonary hypertension? *Am J Respir Crit Care Med.* 2003, Vol. 167.
36. **Sitbon O, Humbert M, Jagot JL, et al.** Inhaled nitric oxide as a screening agent for safely identifying responders to oral calcium-channel blockers in primary pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 1998, Vol. 12.
37. **Rich S, Kaufmann E, Levy PS.** The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension . *N Engl J Med.* 1992, Vol. 327.
38. **Sitbon O, Humbert M, Jaïs X, loos V, Hamid AM, Provencher S, Garcia G, Parent F, Herve P, Simonneau G.** Long-term response to calcium channel blockers in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2005, Vol. 111.
39. **Jones DA, Benjamin CW, Linseman DA.** Activation of thromboxane and prostacyclin receptors elicits opposing effects on vascular smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase signaling cascades. *Mol Pharmacol.* 1995 , Vol. 48.
40. **Galiè N, Manes A, Branzi A.** Prostanoids for pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Med.* 2003, Vol. 2.
41. **S, Mehta.** Sildenafil for pulmonary arterial hypertension: exciting, but protection required. *Chest.* 2003, Vol. 123.
42. **Perrin S, Chaumais MC, O'Connell C, Amar D, Savale L, Jaïs X, Montani D, Humbert M, Simonneau G, Sitbon O.** New pharmacotherapy options for pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Pharmacother.* 2015, Vol. 16.
43. **Giaid A, Saleh D.** Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* . 1995, Vol. 333.
44. **Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH.** High lung PDE5: a strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005, Vol. 334.
45. **Wharton J, Strange JW, Moller GMO, Growcott EJ, Ren X, Franklyn AP, Phillips SC, Wilkins MR.** Antiproliferative effects of phosphodiesterase type 5 inhibition in human pulmonary artery cells. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005, Vol. 172.
46. **Fagan KA, McMurtry IF, Rodman DM.** Role of endothelin-1 in lung disease. *Respir Res.* 2001, Vol. 2.
47. **Benigni A, Remuzzi G.** Endothelin antagonists. *Lancet.* 1999, Vol. 353.
48. **Yanisagawa M, Kurihara H, Kimura S, et al.** A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988, Vol. 332.
49. **Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ.** Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1993, Vol. 328.
50. **Galiè N, Manes A, Branzi A.** The endothelin system in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res.* 2004, Vol. 61.
51. **Lavelle A, Sugrue R, Lawler G, et al.** Sitaxentan-induced hepatic failure in two patients with pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2009, Vol. 34.

52. Lajoie AC, Lauzière G, Lega JC, Lacasse Y, Martin S, Simard S, Bonnet S, Provencher S. Combination therapy versus monotherapy for pulmonary arterial hypertension: a meta-analysis. *Lancet Respir Med*. 2016, Vol. 4.
53. Keogh A, Benza RL, Corris P, Darteville P, Frost A, Kim NH, Lang I, Pepke-Zaba J, Sandoval J, Mayer E. Interventional and surgical modalities of treatment in pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol* . 2009, Vol. 54.
54. Toyoda Y, Thacker J, Santos R, Nguyen D, Bhama J, Bermudez C, Kormos R, Johnson B, Crespo M, Pilewski J, Teuteberg J, Alvarez R, Mathier M, McNamara D, McCurry K, Zenati M, Hattler B. Long-term outcome of lung and heart-lung transplantation for idiopathic pulmonary arterial hypertension. . *Ann Thorac Surg* . 2008, Vol. 86.
55. de Perrot M, Granton JT, McRae K, Pierre AF, Singer LG, Waddell TK, Keshavjee S. Outcome of patients with pulmonary arterial hypertension referred for lung transplantation: a 14-year single-center experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* . 2012, Vol. 143.
56. Ranchoux B, Antigny F, Rucker-Martin C, Hautefort A, Péchoux C, Bogaard HJ, Dorfmueller P, Remy S, Lecerf F, Planté S, Chat S, Fadel E, Houssaini A, Anegon I, Adnot S, Simonneau G, Humbert M, Cohen-Kaminsky S, Perros F. Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension. *Circulation*. 2015, Vol. 131, 11.
57. Budhiraja R, Tudor RM, Hassoun PM. Endothelial Dysfunction in Pulmonary Hypertension. *Circulation*. 2004, Vol. 109.
58. M, Rabinovitch. EVE and beyond, retro and prospective insights. *Am J Physiol*. 1999 йил, Vol. 277.
59. Dorfmueller P, Zarka V, Durand-Gasselin I, et al. Chemokine RANTES in severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002, Vol. 165.
60. Balabanian K, Foussat A, Dorfmueller P, et al. CX(3)C chemokine fractalkine in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002, Vol. 165.
61. Perros F, Dorfmueller P, Souza R, et al. Fractalkine-induced smooth muscle cell proliferation in pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007, Vol. 29.
62. 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, Vol. 151.
63. Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Elevated Levels of Inflammatory Cytokines Predict Survival in Idiopathic and Familial Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2010, Vol. 122.
64. Nabata T, Morimoto S, Koh E, Shiraishi T, Ogihara T. Interleukin-6 stimulates c-myc expression and proliferation of cultured vascular smooth muscle cells. *Biochem Int*. 1991, Vol. 20.
65. Courboulain A, Tremblay VL, Barrier M, Meloche J, Jacob MH, Chapolard M, Bissierier M, Paulin R, Lambert C, Provencher S, Bonnet S. Krüppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension. *Respir Res*. 2011, Vol. 12.
66. Zhang B, Shen M, Xu M, Liu LL, Luo Y, Xu DQ, Wang YX, Liu ML, Liu Y, Dong HY, Zhao PT, Li ZC. Role of macrophage migration inhibitory factor in the proliferation of smooth muscle cell in pulmonary hypertension. *Mediators Inflamm*. 2012.
67. Fujita M, Shannon JM, Irvin CG, Fagan KA, Cool C, Augustin A, Mason RJ. Overexpression of tumor necrosis factor-alpha produces an increase in lung volumes and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001, Vol. 280.

68. **Tamby MC, Chanseaud Y, Humbert M, Fermanian J, Guilpain P, Garcia-de-la-Peña-Lefebvre P, Brunet S, Servettaz A, Weill B, Simonneau G, Guillevin L, Boissier MC, Mouthon L.** Anti-endothelial cell antibodies in idiopathic and systemic sclerosis associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2005, Vol. 60.
69. **Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, Nicolls MR.** Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2014, Vol. 115.
70. **Tamosiuniene R, Tian W, Dhillon G, Wang L, Sung YK, Gera L, Patterson AJ, Agrawal R, Rabinovitch M, Ambler K, Long CS, Voelkel NF, Nicolls MR.** Regulatory T cells limit vascular endothelial injury and prevent pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2011, Vol. 109.
71. **Perros F, Dorfmueller P, Souza R, et al.** Dendritic cell recruitment in lesions of human and experimental pulmonary hypertension. *Eur Respir J*. 2007, Vol. 29.
72. **AP, Fishman.** Changing Concepts of the Pulmonary Plexiform Lesion . *Physiol Res*. 2000, Vol. 49.
73. **D Jonigk, H Golpon, CL Bockmeyer, L Maegel et al.** Plexiform Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension : Composition, Architecture, and Microenvironment. *Am J Pathol*. 2011, Vol. 1.
74. **Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, Riddle SR, Frid MG.** The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. *Annu Rev Physiol*. 2013, Vol. 75.
75. **Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S, Frid M.** The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Compr Physiol*. 2011, Vol. 1.
76. **Smith RS, Smith TJ, Blieden TM, Phipps RP.** Fibroblasts as sentinel cells. Synthesis of chemokines and regulation of inflammation. *Am J Pathol*. 1997, Vol. 2.
77. **Dromparis P, Michelakis ED.** Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol*. 2013, pp. 95–126.
78. **ED, Paulin R and Michelakis.** The Metabolic Theory of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res*. 2014, Vol. 115.
79. **Gray MW, Burger G, Lang BF.** Mitochondrial evolution. *Science*. 1999, Vol. 283, pp. 1476–1481.
80. **Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB.** Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science*. 2009, Vol. 324.
81. **GL, Semenza.** Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012, Vol. 148.
82. **Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thébaud B, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Moudgil R, McMurtry MS, Weir EK, Archer SL.** An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2006, Vol. 22.
83. **Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, Dyck JR, Michelakis ED.** Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodeling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med*. 2010, Vol. 44.
84. **Pastorino JG, Hoek JB, Shulga N.** Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. *Cancer Res*. 2005, Vol. 22.
85. **Kuga T, Kobayashi S, Hirakawa Y, Kanaide H, Takeshita A.** Cell cycle—Dependent expression of L- and T-type Ca²⁺ currents in rat aortic smooth muscle cells in primary culture. *Circ. Res.* . 1996, Vol. 79.
86. **Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, Hashimoto K, Bonnet SN, Michelakis ED.** The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* . 2007, Vol. 104.

87. **Boucherat O, Chabot S, Antigny F, Perros F, Provencher S, Bonnet S.** Potassium channels in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2015, Vol. 46.
88. **Krick S, Platoshyn O, Sweeney M, Kim H, Yuan JX.** Activation of K⁺ channels induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2001, Vol. 280.
89. **McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, Michelakis ED.** Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res.* 2004, Vol. 95.
90. **Remillard CV, Yuan JX.** Activation of K⁺ channels: an essential pathway in programmed cell death. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004, Vol. 286.
91. **Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Trégouët DA, Borczuk A, Rosenzweig EB, Girerd B, Montani D, Humbert M, Loyd JE, Kass RS, Chung WK.** A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2013, Vol. 369.
92. **Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, Péchoux C, Potus F, Nadeau V, Tremblay E, Ruffenach G, Bourgeois A, Dorfmueller P, Breuils-Bonnet S, Fadel E, Ranchoux B, Jourdon P, Girerd B, et al.** Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation.* 2016, Vol. 133.
93. **GL, Semenza.** Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature Reviews Cancer.* 2003, Vol. 3, pp. 721-732.
94. **Ruffenach G, Chabot S, Tanguay VF, Courboulain A, Boucherat O, Potus F, Meloche J, Pflieger A, Breuils-Bonnet S, Nadeau V, Paradis R, Tremblay E, Girerd B, Hautefort A, Montani D, Fadel E, Dorfmueller P, Humbert M, Perros F, Paulin R, et al.** Role for Runt-related Transcription Factor 2 in Proliferative and Calcified Vascular Lesions in Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016, Vol. 194.
95. **Boengler K, Hilfiger-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R.** The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacol Ther.* 2008, Vol. 120.
96. **Grote K, Luchtefeld M, Schieffer B.** JANUS under stress: role of JAK/STAT signaling pathway in vascular diseases. *Vascul Pharmacol.* 2005, Vol. 43.
97. **Paulin R, Courboulain A, Meloche J, Mainguy V, Dumas de la Roque E, Saksouk N, Côté J, Provencher S, Sussman MA, Bonnet S.** Signal transducers and activators of transcription-3/pim1 axis plays a critical role in the pathogenesis of human pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2011, Vol. 123.
98. **Savai R, Al-Tamari HM, Sedding D, Kojonazarov B, Muecke C, Teske R, Capecchi MR, Weissmann N, Grimminger F, Seeger W, Schermuly RT, Pullamsetti SS.** Pro-proliferative and inflammatory signaling converge on FoxO1 transcription factor in pulmonary hypertension. *Nat Med.* 2014, Vol. 20.
99. **Kanno S, Wu YJ, Lee PC, Billiar TR, Ho C.** Angiotensin-converting enzyme inhibitor preserves p21 and endothelial nitric oxide synthase expression in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension in rats. *Circulation.* 2001, Vol. 104.
100. **Fouty BW, Grimison B, Fagan KA, Le Cras TD, Harral JW, Hoedt-Miller M, Sclafani RA, Rodman DM.** p27(Kip1) is important in modulating pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001, Vol. 25.
101. **Meloche J, Potus F, Vaillancourt M, Bourgeois A, Johnson I, Deschamps L, Chabot S, Ruffenach G, Henry S, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Nadeau V, Lambert C, Paradis R, Provencher S, Bonnet S.** Bromodomain-Containing Protein 4: The Epigenetic Origin of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res.* 2015, Vol. 117.
102. **Belkina AC, Denis GV.** BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2012, Vol. 12.

103. **Segura MF, Fontanals-Cirera B, Gazieli-Sovran A, Guijarro MV, Hanniford D, Zhang G, González-Gomez P, Morante M, Jubierre L, Zhang W, Darvishian F, Ohlmeyer M, Osman I, Zhou MM, Hernando E.** BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res.* 2013, Vol. 73.
104. **DC, Altieri.** Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer.* 2003, Vol. 1.
105. **McMurtry MS, Archer SL, Altieri DC, Bonnet S, Haromy A, Harry G, Bonnet S, Puttagunta L, Michelakis ED.** Gene therapy targeting survivin selectively induces pulmonary vascular apoptosis and reverses pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005, Vol. 115.
106. **A S Dhillon, S Hagan, O Rath and W Kolch.** MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 2007, Vol. 26, pp. 3279–3290.
107. **Wilson JL, Yu J, Taylor L, Polgar P.** Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLoS One.* 2015.
108. **Li X, et al.** Notch3 signaling promotes the development of pulmonary arterial hypertension. *Nature Med.* 2009, Vol. 15.
109. **Campos AH, Wang W, Pollman MJ, Gibbons GH.** Determinants of Notch-3 receptor expression and signaling in vascular smooth muscle cells: implications in cell-cycle regulation. *Circ Res.* 2002, Vol. 91.
110. **Wang W, Prince CZ, Mou Y, Pollman MJ.** Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol. Chem.* 2002, Vol. 277.
111. **RJ, Barst.** PDGF signaling in pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2005, Vol. 115, pp. 2691–2694.
112. **SA, Antoniu.** Targeting PDGF pathway in pulmonary arterial hypertension. *Expert Opin Ther Targets.* 2012, Vol. 16, pp. 1055-63.
113. **Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Hervé P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R, Humbert M.** Platelet-derived Growth Factor Expression and Function in Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008, Vol. 178, pp. 81-8.
114. **Schermuly RT, Dony E, Ghofrani HA, Pullamsetti S, Savai R, Roth M, Sydykov A, Lai YJ, Weissmann N, Seeger W, Grimminger F.** Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J Clin Invest.* 2005, Vol. 115, pp. 2811-21.
115. **Hoeper MM, Barst RJ, Bourge RC, Feldman J, Frost AE, Galié N, Gómez-Sánchez MA, Grimminger F, Grünig E, Hassoun PM, Morrell NW, Peacock AJ, Satoh T, Simonneau G, Tapon VF, Torres F, Lawrence D, Quinn DA, Ghofrani HA.** Imatinib Mesylate as Add-on Therapy for Pulmonary Arterial Hypertension - Results of the Randomized IMPRES Study. *Circulation.* 2013, Vol. 127, pp. 1128-38.
116. **Frost AE, Barst RJ, Hoeper MM, Chang HJ, Frantz RP, Fukumoto Y, Galié N, Hassoun PM, Klose H, Matsubara H, Morrell NW, Peacock AJ, Pfeifer M, Simonneau G, Tapon VF, Torres F, Dario Vizza C, Lawrence D, Yang W, Felser JM, Quinn DA, Ghofrani HA.** Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2015, Vol. 34, pp. 1366-75.
117. **Abenham L, Moride Y, Brenot F, et al.** Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. *N Engl J Med.* 1996, Vol. 335, pp. 609-16.
118. **Mark EJ, Patalas ED, Chang HT, et al.** Fatal pulmonary hypertension associated with short-term use of fenfluramine and phentermine. *N Engl J Med.* 1997, Vol. 337, pp. 602-606.

119. **Rothman RB, Ayestas MA, Dersch CM, Baumann MH.** Aminorex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates. Implications for primary pulmonary hypertension. *Circulation*. 1999, Vol. 100, 8, pp. 869-75.
120. **Maclean MR, Dampsie Y.** The Serotonin Hypothesis of Pulmonary Hypertension Revisited. *Adv Exp Med Biol*. 2010, Vol. 661, pp. 309-22.
121. **Mortimer HJ, Peacock AJ, Kirk A, Welsh DJ.** p38 MAP kinase: essential role in hypoxia-mediated human pulmonary artery fibroblast proliferation. *Pulm Pharmacol Ther*. 2007, Vol. 20, pp. 718-25.
122. **Marcos E, Fadel E, Sanchez O et al.** Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension. *Circ Res*. 2004, Vol. 94, pp. 1263-1270.
123. **Eddahibi S, Guignabert C, Barlier-Mur AM et al.** Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension - critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia. *Circulation*. 2006, Vol. 113, pp. 1857-1864.
124. **Cogolludo A, Moreno L, Lodi F et al.** Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells - role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res*. 2006, Vol. 98, pp. 931-938.
125. **Long L, MacLean MR, Jeffery TK et al.** Serotonin increases susceptibility to pulmonary hypertension in BMPR2-deficient mice. *Circ Res*. 2006, Vol. 98, pp. 818-827.
126. **Fantozzi I, Huang W, Zhang J, Zhang S, Platoshyn O, Remillard CV, Thistlethwaite PA, Yuan JX.** 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*. 2005, Vol. 321, pp. 783-806.
127. **RC, Trembath.** Mutations in the TGF-beta type 1 receptor, ALK1, in combined primary pulmonary hypertension and hereditary haemorrhagic telangiectasia, implies pathway specificity. *J Heart Lung Transplant*. 2001, Vol. 20.
128. **Chaouat A, Coulet F, Favre C, Simonneau G, Weitzenblum E, Soubrier F, Humbert M.** Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2004, Vol. 5, pp. 446-8.
129. **Nasim MT, Ogo T, Ahmed M, Randall R, Chowdhury HM, Snape KM, Bradshaw TY, Southgate L, Lee GJ, Jackson I, Lord GM, Gibbs JS, Wilkins MR, Ohta-Ogo K, Nakamura K, Girerd B, Coulet F, Soubrier F, Humbert M, Morrell NW, Trembath RC, Machado RD.** Molecular genetic characterization of SMAD signaling molecules in pulmonary arterial hypertension. *Hum Mutat*. 2011, Vol. 32, pp. 1385-1389.
130. **Meloche J, Pflieger A, Vaillancourt M, Paulin R, Potus F, Zervopoulos S, Graydon C, Courboulain A, Breuils-Bonnet S, Tremblay E, Couture C, Michelakis ED, Provencher S, Bonnet S.** Role for DNA damage signaling in pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2014, Vol. 129.
131. **Ranchoux B, Meloche J, Paulin R, Boucherat O, Provencher S, Bonnet S.** DNA Damage and Pulmonary Hypertension. *Int J Mol Sci*. 2016, Vol. 17.
132. **Meloche J, Le Guen M, Potus F, Vinck J, Ranchoux B, Johnson I, Antigny F, Tremblay E, Breuils-Bonnet S, Perros F, Provencher S, Bonnet S.** miR-223 reverses experimental pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2015, Vol. 309.
133. **Yeager ME, Reddy MB, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR.** Activation of the unfolded protein response is associated with pulmonary hypertension. *Pulm Circ*. 2012, Vol. 2.
134. **ME Yeager, DD Belchenko, CM Nguyen et al.** Endothelin-1, the Unfolded Protein Response, and Persistent Inflammation - Role of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012, Vol. 46.

135. **R. Zhao, M. Davey, Y.C. Hsu, P. Kaplanek, A. Tong, A.B. Parsons, N. Krogan, G. Cagney, D. Mai, J. Greenblatt, C. Boone, A. Emili, W.A. Houry.** Navigating the chaperone network: an integrative map of physical and genetic interactions mediated by the hsp90 chaperone. *Cell*. 2005, Vol. 120.
136. **Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP.** HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell*. 2005, Vol. 18.
137. **Pick E, Kluger Y, Giltmane JM, Moeder C, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM.** High HSP90 expression is associated with decreased survival in breast cancer. *Cancer Res*. 2007, Vol. 67.
138. **Liu W, Wu Y, Wang L, Gao L, Wang Y, Liu X, Zhang K, Song J, Wang H, Bayer TA, Glaser L, Sun Y, Zhang W, Cutaia M, Zhang DY, Ye F.** Protein signature for non-small cell lung cancer prognosis. *Am J Cancer Res*. 2014, Vol. 4.
139. **Westekemper H, Karimi S, Süsskind D, Anastassiou G, Freistühler M, Steuhl KP, Bornfeld N, Schmid KW, Grabelius F.** Expression of HSP 90, PTEN and Bcl-2 in conjunctival melanoma. *Br J Ophthalmol*. 2011, Vol. 95.
140. **Wang J, Cui S, Zhang X, Wu Y, Tang H.** High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer. *PLoS One*. 2013, Vol. 8.
141. **Yongkai Wu, Bo Huang, Qian Liu, Yongyu Liu.** Heat shock protein 90- β over-expression is associated with poor survival in stage I lung adenocarcinoma patients. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015, Vol. 8.
142. **Wang GK, Li SH, Zhao ZM, Liu SX, Zhang GX, Yang F, Wang Y, Wu F, Zhao XX, Xu ZY.** Inhibition of heat shock protein 90 improves pulmonary arteriole remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Oncotarget*. 2016.
143. **F Anjum, J Lazar, J Soh, M Albitar, et al.** Dysregulation of ubiquitin-proteasome pathway and apolipoprotein A metabolism in sickle cell disease-related pulmonary arterial hypertension. *Pulm Circ*. 2013, Vol. 3.
144. **Lee SJ, Smith A, Guo L, et al.** Autophagic protein LC3B confers resistance against hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010, Vol. 183.
145. **Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, Dunmore BJ, Morrell NW.** Chloroquine Prevents Progression of Experimental Pulmonary Hypertension via Inhibition of Autophagy and Lysosomal Bone Morphogenetic Protein Type II Receptor Degradation. *Circ Res*. 2013, Vol. 112.
146. **Mizumur K, Cloonan SM, Haspel JA, Choi AM.** The Emerging Importance of Autophagy in Pulmonary Diseases. *Chest*. 2012, Vol. 142.
147. **Courboulain A, Paulin R, Giguère NJ, Saksouk N, Perreault T, Meloche J, Paquet ER, Biardel S, Provencher S, Côté J, Simard MJ, Bonnet S.** Role for miR-204 in human pulmonary arterial hypertension. *J Exp Med*. 2011, Vol. 208.
148. **Potus F, Ruffenach G, Dahou A, Thebault C, Breuils-Bonnet S, Tremblay È, Nadeau V, Paradis R, Graydon C, Wong R, Johnson I, Paulin R, Lajoie AC, Perron J, Charbonneau E, Joubert P, Pibarot P, Michelakis ED, Provencher S, Bonnet S.** Downregulation of MicroRNA-126 Contributes to the Failing Right Ventricle in Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2015, Vol. 132.
149. **Potus F, Malenfant S, Graydon C, Mainguy V, Tremblay È, Breuils-Bonnet S, Ribeiro F, Porlier A, Maltais F, Bonnet S, Provencher S.** Impaired angiogenesis and peripheral muscle microcirculation loss contribute to exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014, Vol. 190.
150. **Bertero T, Lu Y, Annis S, Hale A, Bhat B, Saggarr R, Saggarr R, Wallace WD, Ross DJ, Vargas SO, Graham BB, Kumar R, Black SM, Fratz S, Fineman JR, West JD, Haley KJ, Waxman AB, Chau BN,**

- Cottrill KA, Chan SY.** Systems-level regulation of microRNA networks by miR-130/301 promotes pulmonary hypertension. *J Clin Invest.* 2014, Vol. 124.
151. **Li N, Oberley TD, Oberley LW, Zhong W.** Overexpression of manganese superoxide dismutase in DU145 human prostate carcinoma cells has multiple effects on cell phenotype. *Prostate* . 1998, Vol. 35.
152. **Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, Dyck JR, et al.** Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010. 2010, Vol. 121.
153. **Belkina AC, Denis GV.** BET domain co-regulators in obesity, inflammation and cancer. *Nat Rev Cancer* . 2012, Vol. 12.
154. **Cavasin MA, Demos-Davies K, Horn TR, Walker LA, Lemon DD, Birdsey N, Weiser-Evans MCM, Harral J, Irwin DC, Anwar A, Yeager ME, Li M, Watson PA, Nemenoff RA, Buttrick PM, Stenmark KR and McKinsey TA.** Selective class I histone deacetylase inhibition suppresses hypoxia-induced cardiopulmonary remodeling through an antiproliferative mechanism. *Circ Res.* 2012, Vol. 110.
155. **Zhao L, Chen C-N, Hajji N, Oliver E, Cotroneo E, Wharton J, Wang D, Li M, McKinsey TA, Stenmark KR and Wilkins MR.** Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation.* 2012, Vol. 126.
156. **De Raaf MA, Hussaini AA, Gomez-Arroyo J, Kraskauskas D, Farkas D, Happé C, Voelkel NF and Bogaard HJ.** Histone deacetylase inhibition with trichostatin A does not reverse severe angioproliferative pulmonary hypertension in rats (2013 Grover Conference serie). *Pulm Circ.* 2012, Vol. 4.
157. **Bogaard HJ, Mizuno S, Hussaini AA, Toldo S, Abbate A, Kraskauskas D, Kasper M, Natarajan R and Voelkel NF.** Suppression of histone deacetylases worsens right ventricular dysfunction after pulmonary artery banding in rats. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011, Vol. 18.
158. **Network, The Cancer Genome Atlas Research.** Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011, Vol. 474, pp. 609–615 .
159. **Network, he Cancer Genome Atlas Research.** Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012, Vol. 490, pp. 61-70.
160. **Sood AK, Armaiz-Pena GN, Halder J, Nick AM, Stone RL, Hu W, et al.** Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. *J Clin Invest.* 2010, Vol. 120, pp. 1515–1523.
161. **Mitra, S. K., Hanson, D. A. & Schlaepfer, D. D.** Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2005, Vol. 6.
162. **Paulin R, Meloche J, Courboulain A, Lambert C, Haromy A, Courchesne A, Bonnet P, Provencher S, Michelakis ED, Bonnet S.** Targeting cell motility in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2014, Vol. 43, 2, pp. 531-44.
163. **Rita Nogueira-Ferreira, Rui Vitorino, Rita Ferreira, Tiago Henriques-Coelho.** Exploring the monocrotaline animal model for the study of pulmonary arterial hypertension: A network approach. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics.* 2015.
164. **J.G. Gomez-Arroyo, L. Farkas, A.A. Alhussaini, D. Farkas, D. Kraskauskas, N.F. Voelkel, et al.** The monocrotaline model of pulmonary hypertension in perspective. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2012, pp. L363–L369.
165. **R. Naeije, L. Dewachter.** Animal models of pulmonary arterial hypertension. *Rev. Mal. Respir.* 2007, pp. 481–496.
166. **Yeager, Kelley L. Colvin and Michael E.** Animal Models of Pulmonary Hypertension: Matching Disease Mechanisms to Etiology of the Human Disease. *J Pulm Respir Med.* Aug 4, 2014.

167. **Stenmark KR, Fagan KA, Frid MG.** Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circ Res.* 2006, Vol. 99.
168. **Meyrick BO, Perket EA.** The sequence of cellular and hemodynamic changes of chronic pulmonary hypertension induced by hypoxia and other stimuli. *Am Rev Respir Dis.* 1989, Vol. 140.
169. **Jones RC, Capen DE, Cohen KS, Munn LL, Jain RK, Duda DG.** A protocol for phenotypic detection and characterization of vascular cells of different origins in a lung neovascularization model in rodents. *Nat Protoc.* 2008, Vol. 3.
170. **Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF.** Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2009, Vol. 297, 6.
171. **Bauer NR, Moore TM, McMurtry IF.** Rodent models of PAH: are we there yet? . *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007, Vol. 293.
172. **Taraseviciene-Stewart L, Kasahara Y, Alger L, Hirth P, Mc Mahon G, Waltenberger J, Voelkel NF, Tuder RM.** Inhibition of the VEGF receptor 2 combined with chronic hypoxia causes cell death-dependent pulmonary endothelial cell proliferation and severe pulmonary hypertension. *FASEB J.* 2001, 15.
173. **Michael G. Dickinson, Beatris Bartelds, Marinus A. J. Borgdorff, Rolf M. F. Berger.** The role of disturbed blood flow in the development of pulmonary arterial hypertension: lessons from preclinical animal models. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2013, Vol. 305.
174. **Abe K, Toba M, Alzoubi A, Ito M, Fagan KA, Cool CD, Voelkel NF, McMurtry IF, Oka M.** Formation of plexiform lesions in experimental severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010., Vol. 121.
175. **Sakao S, Tatsumi K.** The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension. *Respiration.* 2011, Vol. 81.
176. **Yee KW, O'Farrell AM, Smolich BD, Cherrington JM, McMahon G, Wait CL, McGreevey LS, Griffith DJ, Heinrich MC.** SU5416 and SU5614 inhibit kinase activity of wild-type and mutant FLT3 receptor tyrosine kinase. *Blood.* 2002, Vol. 100.
177. **Y Li, D Shin, SH Kwon.** Histone deacetylase 6 plays a role as a distinct regulator of diverse cellular processes. *FEBS J.* 2012 йил, Vol. 280.
178. **Zhang Y, Li N, Caron C, Matthias G, Hess D, Khochbin S, Matthias P.** HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo. *EMBO J.* 2003, Vol. 22.
179. **Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP.** HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002, Vol. 417.
180. **Lee YS, Lim KH, Guo X, Kawaguchi Y, Gao Y, Barrientos T, Ordentlich P, Wang XF, Counter CM, Yao TP.** The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res.* 2008.
181. **Kamemura K, Ito A, Shimazu T, Matsuyama A, Maeda S, Yao TP, Horinouchi S, Khochbin S, Yoshida M.** Effects of downregulated HDAC6 expression on the proliferation of lung cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008.
182. **Woan KV, Lienlaf M, Perez-Villaroel P, Lee C, Cheng F, Knox T, Woods DM, Barrios K, Powers J, Sahakian E, Wang HW, Canales J, Marante D, Smalley KS, Bergman J, Seto E1, Kozikowski A, Pinilla-Ibarz J, Sarnaik A, Celis E, Weber J, Sotomayor EM, Villagra A.** Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation. *Mol Oncol.* 2015.
183. **Iwata A, Riley BE, Johnston JA, Kopito RR.** HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin. *J Biol Chem.* 2005, Vol. 280.

184. **Kawaguchi Y, Kovacs JJ, McLaurin A, Vance JM, Ito A, Yao TP.** The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*. 2003, Vol. 115.
185. **Guedes-Dias P, de Proença J, Soares TR, Leitão-Rocha A, Pinho BR, Duchon MR, Oliveira JM.** HDAC6 inhibition induces mitochondrial fusion, autophagic flux and reduces diffuse mutant huntingtin in striatal neurons. *Biochim Biophys Acta*. 2015.
186. **Lee JY, Koga H, Kawaguchi Y, Tang W, Wong E, Gao YS, Pandey UB, Kaushik S, Tresse E, Lu J, Taylor JP, Cuervo AM, Yao TP.** HDAC6 controls autophagosome maturation essential for ubiquitin-selective quality-control autophagy. *EMBO J*. 2010, Vol. 29.
187. **Boyault C, Zhang Y, Fritah S, Caron C, Gilquin B, Kwon SH, Garrido C, Yao TP, Vourc'h C, Matthias P, Khochbin S.** HDAC6 controls major cell response pathways to cytotoxic accumulation of protein aggregates. *Genes Dev*. 2007, Vol. 21.
188. **Namdar M, Perez G, Ngo L, Marks PA.** Selective inhibition of histone deacetylase 6 (HDAC6) induces DNA damage and sensitizes transformed cells to anticancer agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, Vol. 46, pp. 20003-8.
189. **Chen CS, Wang YC, Yang HC, Huang PH, Kulp SK, Yang CC, Lu YS, Matsuyama S, Chen CY, Chen CS.** Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res*. 2007, Vol. 67.
190. **Li S, Liu X, Chen X, Zhang L, Wang X.** Histone deacetylase 6 promotes growth of glioblastoma through inhibition of SMAD2 signaling. *Tumour Biol*. 2015, Vol. 12, pp. 9661-5.
191. **Westendorf JJ, Zaidi SK, Cascino JE, Kahler R, van Wijnen AJ, Lian JB, Yoshida M, Stein GS, Li X.** Runx2 (Cbfa1, AML-3) interacts with histone deacetylase 6 and represses the p21(CIP1/WAF1) promoter. *Mol Cell Biol*. 2002, Vol. 22, pp. 7982-92.
192. **Bellosta P, Masramon L, Mansukhani A, Basilico C.** p21(WAF1/CIP1) acts as a brake in osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res*. 2003, Vol. 18.
193. **Bai J, Lei Y, An GL, He L.** Down-Regulation of Deacetylase HDAC6 Inhibits the Melanoma Cell Line A375.S2 Growth through ROS-Dependent Mitochondrial Pathway. *PLoS One*. 2015.
194. **Parmigiani RB, Xu WS, Venta-Perez G, Erdjument-Bromage H, Yaneva M, Tempst P, Marks PA.** HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, Vol. 105, pp. 9633-8.
195. **Choi MH, Lee IK, Kim GW, Kim BU, Han YH, Yu DY, Park HS, Kim KY, Lee JS, Choi C, Bae YS, Lee BI, Rhee SG, Kang SW.** Regulation of PDGF signalling and vascular remodelling by peroxiredoxin II. *Nature*. 2005, Vol. 435, pp. 347-353.
196. **Qian DZ, Kachhap SK, Collis SJ, Verheul HM, Carducci MA, Atadja P, Pili R.** Class II Histone Deacetylases Are Associated with VHL-Independent Regulation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α . *Cancer Res*. 2006, Vol. 66, pp. 8814-8821.
197. **Kong X, Lin Z, Liang D, Fath D, Sang N, Caro J.** Histone deacetylase inhibitors induce VHL and ubiquitin-independent proteasomal degradation of hypoxia-inducible factor 1 α . *Mol Cell Biol*. 2006, Vol. 6, pp. 2019-28.
198. **Kowshik J, Giri H, Kishore TK, Kesavan R, Vankudavath RN, Reddy GB, Dixit M, Nagini S.** Ellagic acid inhibits VEGF/VEGFR2, PI3K/Akt and MAPK signaling cascades in the hamster cheek pouch carcinogenesis model. *Anticancer Agents Med Chem*. 2014, Vol. 9, pp. 1249-60.
199. **Kamemura K, Ogawa M, Ohkubo S, Ohtsuka Y, Shitara Y, Komiya T, Maeda S, Ito A, Yoshida M.** Depression of mitochondrial metabolism by downregulation of cytoplasmic deacetylase, HDAC6. *FEBS Lett*. 2012, Vol. 9, pp. 1379-83.

200. **Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K.** Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90. *J Biol Chem.* 2005, Vol. 29, pp. 26729-34.
201. **Rao R, Fiskus W, Yang Y, Lee P, Joshi R, Fernandez P, Mandawat A, Atadja P, Bradner JE, Bhalla K.** HDAC6 inhibition enhances 17-AAG--mediated abrogation of hsp90 chaperone function in human leukemia cells. *Blood.* 2008, Vol. 5, pp. 1886-93.
202. **P, Youle R J and Narendra D.** Mechanisms of mitophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2011, Vol. 12, pp. 9-14.
203. **Lee JY, Nagano Y, Taylor JP, Lim KL, Yao TP.** Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy. *J Cell Biol.* 2010, Vol. 4, pp. 671-9.
204. **Daly, R. J.** Cortactin signalling and dynamic actin networks. *Biochem. J.* 2004, Vol. 382, pp. 13-25.
205. **X. Zhang, Z. Yuan, Y. Zhang, S. Yong, A. Salas-Burgos, J. Koomen, N. Olashaw, J. T. Parsons, X.-J. Yang, S. R. Dent, T.-P. Yao, W. S. Lan, E. Seto.** HDAC6 modulates cell motility by altering the acetylation level of cortactin. *Mol. Cell.* 2007, Vol. 27, pp. 197-213.
206. **Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL.** Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, Vol. 100, 8, pp. 4389-94.
207. **Matsuyama A, Shimazu T, Sumida Y, Saito A, Yoshimatsu Y, Seigneurin-Berny D, Osada H, Komatsu Y, Nishino N, Khochbin S, Horinouchi S, Yoshida M.** In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *EMBO J.* 2002, Vol. 21, 24, pp. 6820-31.
208. **Wang L, Xiang S, Williams KA, Dong H, Bai W, Nicosia SV, Khochbin S, Bepler G, Zhang X.** Depletion of HDAC6 Enhances Cisplatin-Induced DNA Damage and Apoptosis in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *PLoS One.* 2012, Vol. 7.
209. **T, Jin S and Weaver D.** Double-strand break repair by Ku70 requires heterodimerization with Ku80 and DNA binding functions. *EMBO J.* 1997, Vol. 22, pp. 6874-6885.
210. **Chaudhary N, Nakka KK, Chavali PL, Bhat J, Chatterjee S, Chattopadhyay S.** SMAR1 coordinates HDAC6-induced deacetylation of Ku70 and dictates cell fate upon irradiation. *Cell Death Dis.* 2014.
211. **Ozaki T, Wu D, Sugimoto H, Nagase H, Nakagawara A.** Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) inhibits p53-dependent apoptosis through the collaboration with HDAC6 in response to DNA damage. *Cell Death Dis.* 2013.
212. **Ngo J, Matsuyama M2, Kim C, Poventud-Fuentes I, Bates A, Siedlak SL, Lee HG, Doughman YQ, Watanabe M, Liner A, Hoit B, Voelkel N, Gerson S, Hasty P, Matsuyama S.** Bax deficiency extends the survival of Ku70 knockout mice that develop lung and heart diseases. *Cell Death Dis.* 2015.
213. **ED, Michelakis.** Pulmonary arterial hypertension: yesterday, today, tomorrow. *Circ Res.* 2014, Vol. 115.
214. **Subramanian C, Jarzembowski JA, Opipari AW, Jr., Castle VP and Kwok RP.** HDAC6 deacetylates Ku70 and regulates Ku70-Bax binding in neuroblastoma. *Neoplasia.* 2011, Vol. 13.
215. **J Ngo, M Matsuyama, C Kim, I Poventud-Fuentes, A Bates, S L Siedlak, H-g Lee, Y Q Doughman, M Watanabe, A Liner, B Hoit, N Voelkel, S Gerson, P Hasty, and S Matsuyama.** Bax deficiency extends the survival of Ku70 knockout mice that develop lung and heart diseases. *Cell Death Dis.* 2015, Vol. 6.
216. **Hussong M, Börno ST, Kerick M, Wunderlich A, Franz A, Sülthmann H, Timmermann B, Lehrach H, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger MR.** The bromodomain protein BRD4 regulates the KEAP1/NRF2-dependent oxidative stress response. *Cell Death Dis.* 2014, Vol. 5.

217. **de Zoeten EF, Wang L, Butler K, Beier UH, et al.** Histone Deacetylase 6 and Heat Shock Protein 90 Control the Functions of Foxp3+ T-Regulatory Cells. *Mol Cell Biol.* 2011, Vol. 31.
218. **Tamosiuniene R, Nicolls MR.** Regulatory T cells and pulmonary hypertension. *Trends Cardiovasc Med.* 2011, Vol. 21.
219. **Humbert M, Monti G, Brenot F, Sitbon O, Portier A, Grangeot-Keros L, Duroux P, Galanaud P, Simonneau G, Emilie D.** Increased interleukin-1 and interleukin-6 serum concentrations in severe primary pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995, Vol. 151.
220. **Soon E, Holmes AM, Treacy CM, Doughty NJ, Southgate L, Machado RD, Trembath RC, Jennings S, Barker L, Nicklin P, Walker C, Budd DC, Pepke-Zaba J, Morrell NW.** Elevated levels of inflammatory cytokines predict survival in idiopathic and familial pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2010, Vol. 122.
221. **Lambert CM, Roy M, Meloche J, Robitaille GA, Agharazii M, Richard DE, Bonnet S.** Tumor necrosis factor inhibitors as novel therapeutic tools for vascular remodeling diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010, Vol. 299.
222. **Rabinovitch M, Guignabert C, Humbert M, and Nicolls MR.** Inflammation and Immunity in the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circ Res.* 2014, Vol. 115.
223. **Ishiguro K, Ando T, Maeda O, Watanabe O, Goto H.** Cutting edge: tubulin α functions as an adaptor in NFAT-importin β interaction. *J Immunol.* 2011, Vol. 5, pp. 2710-3.
224. **Boyault C, Gilquin B, Zhang Y, Rybin V, Garman E, Meyer-Klaucke W, Matthias P, Müller CW, Khochbin S.** HDAC6-p97/VCP controlled polyubiquitin chain turnover. *EMBO J.* 2006, Vol. 25.
225. **Pandey UB, Nie Z, Batlevi Y, McCray BA, Ritson GP, Nedelsky NB, Schwartz SL, DiProspero NA, Knight MA, Schuldiner O, Padmanabhan R, Hild M, Berry DL, Garza D, Hubbert CC, Yao TP, Baehrecke EH, Taylor JP.** HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS. *Nature.* 2007, Vol. 447.
226. **Paulin R, Michelakis ED.** The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2014, Vol. 115.
227. **S Chen, GC Owens, H Makarenkova, DB Edelman.** HDAC6 Regulates Mitochondrial Transport in Hippocampal Neurons. *PLoS One* 2010 .
228. **Ryan J, Marsboom G, Fang YH, Toth PT, Morrow E, Luo N, Piao L, Hong Z, Ericson K, Zhang HJ, Han M, Haney CR, Chen CT, Sharp WW, Archer SL.** PGC1 α -mediated mitofusin-2 deficiency in female rats and humans with pulmonary arterial hypertension. . *Am J Respir Crit Care Med.* 2013.
229. **Ryan J, Dasgupta A, Huston J, Chen KH, Archer SL.** Mitochondrial dynamics in pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl).* 2015, Vol. 93.
230. **NA Reed, D Cai, TL Blasius, GT Jih, E Meyhofer, J Gaertig, KJ Verhey.** Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Curr Biol.* 2006.
231. **Dompierre JP, Godin JD, Charrin BC, Cordelières FP, King SJ, Humbert S, Saudou F.** Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *J Neurosci.* 2007, Vol. 27.
232. **Federici C, Drake KM, Rigelsky CM, McNelly LN, Meade SL, Comhair SA, Erzurum SC, Aldred MA.** Increased mutagen sensitivity and DNA damage in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2015, Vol. 192, pp. 219–228.
233. **Bogaard HJ, Mizuno S, Voelkel NF.** Letter by Bogaard et al Regarding Article, “Histone Deacetylation Inhibition in Pulmonary Hypertension: Therapeutic Potential of Valproic Acid and Suberoylanilide Hydroxamic Acid”. *Circulation.* 2013, Vol. 127.

234. Lan Zhao, Chien-Nien Chen, Nabil Hajji, Eduardo Oliver, Emanuele Cotroneo, John Wharton, Martin R. Wilkins, Daren Wang, Min Li, Kurt R. Stenmark, Timothy A. McKinsey, Peter Buttrick. Response to Letter Regarding Article, "Histone Deacetylation Inhibition in Pulmonary Hypertension: Therapeutic Potential of Valproic Acid and Suberoylanilide Hydroxamic Acid". *Circulation*. 2013, Vol. 127.