

## COMMUNICATION

### Architecture génétique de l'hypertension pulmonaire : des gènes aux médicaments

MOTS-CLÉS : HYPERTENSION PULMONAIRE. MALADIE VEINO-OCCLUSIVE PULMONAIRE. TÉLANGIECTASIE HÉMORRAGIQUE HÉRÉDITAIRE

#### *Genetic features of pulmonary hypertension: from genes to treatments*

KEY-WORDS : HYPERTENSION, PULMONARY. PULMONARY VENO-OCCLUSIVE DISEASE. TELANGIECTASIA, HEREDITARY HEMORRHAGIC

Mélanie EYRIES<sup>1,2</sup>, Barbara GIRERD<sup>3,4</sup>, David MONTANI<sup>3,4</sup>, Florence COULET<sup>1</sup>, Marc HUMBERT<sup>3,4</sup>, Florent SOUBRIER<sup>1,2</sup>

**Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt en relation avec le contenu de cet article.**

## RÉSUMÉ

*La découverte de nouveaux gènes de susceptibilité à l'hypertension pulmonaire a bouleversé nos connaissances sur la physiopathologie de la maladie. À côté des mutations du gène **BMPR2** qui sont, par leurs fréquences et leurs effets, les principales mutations responsables des formes héréditaires de l'hypertension artérielle pulmonaire (**HTAP**) isolée, des mutations ont été décrites dans le gène **KCNK3 (TASK1)** codant pour un canal potassium, le gène **SMAD8** codant, comme **BMPR2**, pour une molécule de signalisation de la voie **BMP**, le gène **CAV1** codant pour la caveoline-1. Les mutations des gènes de l'endogline et du récepteur **ACVRL1** s'inscrivent dans le cadre de la maladie de Rendu-Osler et la survenue*

<sup>1</sup> Département de Génétique, Hôpital Pitié Salpêtrière, AP-H

<sup>2</sup> UMR\_S1166-ICAN, INSERM and UPMC Sorbonne Universités, Paris, France

<sup>3</sup> Centre de Référence de l'Hypertension Pulmonaire Sévère, Service de Pneumologie, Hôpital de Bicêtre, Le Kremlin Bicêtre, AP-HP, Paris, France

<sup>4</sup> UMR\_S 999, Univ. Paris-Sud, INSERM, Centre Chirurgical Marie Lannelongue, Le Plessis Robinson, Paris, France.

*Tirés à part* : Professeur Florent SOUBRIER, Département de Génétique, Hôpital Pitié Salpêtrière, AP-HP, 47 boulevard de l'hôpital, 75013 Paris ; e-mail : florent.soubrier@aphp.fr

*Article reçu le 26 janvier 2017, accepté le 8 mai 2017*

*de l'HTAP en aggrave la sévérité, et les mutations du gène TBX4 sont également responsables de formes syndromiques d'HTAP compliquant de façon rare le Small Patella Syndrome. Les mutations du gène EIF2AK4 (GCN2) sont responsables d'une forme rare et sévère d'hypertension pulmonaire, la maladie veino-occlusive pulmonaire appelée aussi hémangiomatose capillaire pulmonaire.*

*L'analyse des mécanismes d'action et de régulation de ces gènes et des conséquences fonctionnelles des mutations conduit à la conception de nouveaux traitements à visée étiologique de l'hypertension pulmonaire.*

## SUMMARY

*The discovery of new susceptibility genes to pulmonary hypertension has improved our knowledge of the pathophysiology of the disease. In addition to mutations in the BMPR2 gene, that are the main mutations responsible for the heritable forms of pulmonary arterial hypertension (PAH), by their frequencies and their effects, mutations have been described in the potassium channel KCNK3 gene (TASK1), the SMAD8 gene encoding a BMP signaling molecule, and the CAV1 gene encoding caveolin-1. Mutations in the Endoglin and ACVRL1 genes are responsible for Rendu-Osler disease increasing its severity and mutations in the TBX4 gene are responsible for syndromic forms of PAH that rarely complicate the Small Patella Syndrome. Mutations of the EIF2AK4 (GCN2) gene are responsible for a rare and severe form of pulmonary hypertension, the pulmonary veno-occlusive disease also called pulmonary capillary hemangiomatosis. The analysis of the mechanisms of action and regulation of these genes and of the functional consequences of the mutations leads to the design of new treatments aiming at treating the cause of pulmonary hypertension.*

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est due à un remodelage des vaisseaux pulmonaires caractérisé par un épaississement de la paroi des artérioles de moyen et petit calibre (<500µm), des micro-thromboses artériolaires, des phénomènes inflammatoires, et des lésions plus spécifiques appelées lésions plexiformes [1]. La définition hémodynamique repose sur l'élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure ou égale à 25 mmHg, alors que la pression artérielle capillaire (ou pression artérielle pulmonaire occluse) est inférieure ou égale à 15mmHg, attestant de son caractère pré-capillaire [2]. Les différentes formes d'HTAP sont regroupées au sein de la classification internationale des hypertensions pulmonaires (HTP) dans le groupe 1 [3] Ce groupe comprend les formes idiopathiques sans cause connue (groupe 1.1), les formes héritables (groupe 1.2) qui incluent les formes familiales et idiopathiques avec mutations identifiées ainsi que les formes familiales sans mutation connue mais où un facteur génétique familial est suspecté. L'incidence de l'HTAP est de 1,1-7,6 par million d'adultes et par an, et sa prévalence est de 6,6 –26 par million d'adultes [4].

C'est sur les formes héritables que cette communication est centrée, excluant ainsi les formes d'HTAP induites par les drogues et toxines et les HTAP « associées » à

d'autres pathologies (maladies de système, infection HIV, hypertension portale, cardiopathies congénitales et bilharziose). Très proche sur le plan clinique et hémodynamique malgré d'importantes différences sur le plan anatomique et histologique est la maladie veino-occlusive pulmonaire (MVOP) ou hémangiomasose capillaire pulmonaire (classée dans le groupe 1') que quelques signes paracliniques permettent de suspecter, et dont l'étiologie génétique (pour les formes hérissables) est tout à fait différente de l'HTAP.

Les anomalies génétiques qui prédisposent fortement à la maladie et qui sont identifiées dans une proportion significative de cas permettent de décrire une architecture génétique de l'HTAP. L'architecture qui est décrite ici est appelée à être revue car de nouveaux gènes de prédisposition seront très probablement identifiés dans le futur.

Notre communication montre comment les analyses de génétique moléculaire peuvent permettre de mieux cerner le diagnostic de la maladie et parfois mettre sur la piste de syndromes qui n'avaient pas été étiquetés auparavant.

### **Causes génétiques des formes non syndromiques de l'HTA**

#### ***BMPR2 est le gène majeur des formes hérissables d'HTAP.***

Le gène *BMPR2* code pour un récepteur de type 2 de la voie des Bone Morphogenetic Proteins (BMPs) qui fait partie de la super-famille du TGF- $\beta$  et fut le premier gène à être identifié comme responsable des formes familiales d'HTAP grâce à des études de liaison génétique dans des familles informatives [5]. Depuis la reconnaissance du rôle de ce gène, des centaines de mutations de *BMPR2* ont été décrites et collectées dans des travaux collaboratifs internationaux [6]. Des mutations de *BMPR2* sont identifiées dans plus de 80 % des formes familiales typiques d'HTAP et dans 15 % des formes idiopathiques apparemment sporadiques. Les mutations de *BMPR2* sont présentes à l'état hétérozygote et sont responsables d'une perte de fonction de l'allèle porteur de la mutation chez les patients. La maladie est transmise sous un mode autosomique dominant et la pénétrance des mutations de *BMPR2* est incomplète car le pourcentage de porteurs de mutations qui vont développer la maladie est en moyenne de 14 % pour les hommes et de 42 % pour les femmes, mais la pénétrance varie de famille en famille [7].

Sur le plan clinique, les cas d'HTAP survenant dans un contexte de mutation de *BMPR2* sont à début plus précoce (7 ans plus tôt en moyenne) et sont plus sévères au diagnostic que les cas idiopathiques sans mutation, et le risque de décès ou de transplantation est plus élevé dans ces formes [8]. Les porteurs de mutation *BMPR2* sont en général non répondeurs aux antagonistes des canaux calciques [9].

Les mutations tronquantes (par apparition d'un codon stop ou par insertion-délétion entraînant un changement de cadre de lecture) sont les plus faciles à interpréter car l'invalidation fonctionnelle est facile à inférer. En revanche les mutations faux-sens sont d'interprétation plus difficile sauf lorsqu'elles se situent

dans un domaine essentiel pour la fonction de BMPRII, tel que le domaine catalytique de la kinase. Il peut également s'agir de grands réarrangements du gène, souvent par délétion d'un ou plusieurs exons ou du gène entier [1]. On ne peut pas parler de relations génotypes-phénotypes étroites mais les mutations de *BMPR2* localisées dans le domaine intra-cellulaire du récepteur seraient associées à une HTAP moins sévère et un âge de début plus tardif [10].

BMPRII est un récepteur de type II de la voie de signalisation des BMPs qui forme un complexe avec un récepteur de type I, le récepteur ALK1, en réponse à BMP9 et 10 dans les cellules endothéliales (CE) [1]. Le complexe transmet son signal au noyau de la cellule à travers la famille de facteurs de transcription Smad (Smad 1,5, 8 pour la voie BMP) et le co-récepteur Smad4. La voie des BMPs utilise également une signalisation non transmise par les Smad pour un réglage fin et pour des régulations spécifiques de certaines cellules [12].

Les mutations du gène *BMPR2* entraînent une perte de fonction du récepteur, une baisse de l'expression du récepteur muté dans les cellules et une diminution de la signalisation BMP dans les poumons et induit des modulations phénotypiques des CE et des cellules musculaires lisses (CML). En dépit de la complexité de la voie des BMPs, attestée par les effets contrastés des différents membres de la famille des BMP (qui comprend plus de 20 membres) sur les cellules vasculaires, il a été montré que BMP9, le ligand majeur de BMPRII, a un rôle anti-apoptotique sur les CE et limite la prolifération des CML dans un modèle d'hypertension pulmonaire chez la souris [13]. Ainsi une voie des BMPs déficiente peut conduire à un état où les CE sont susceptibles à l'apoptose, ce qui conduit à la sélection de clones de CE prolifératifs et résistants à l'apoptose, et à une prolifération de CML [13-17]. Ces altérations phénotypiques des cellules vasculaires pulmonaires majeures conduisent à un épaississement de la paroi des artères vasculaires pré-capillaires impliquant l'intima, la media et l'adventice avec une augmentation de la prolifération cellulaire, comme observé dans l'HTAP [18]. Expérimentalement, il a été montré que l'administration de BMP9 est capable de corriger les effets des mutations de *BMPR2* *in vitro* et dans les modèles expérimentaux *in vivo* [13].

D'autres médiateurs dont l'expression ou l'activité est en relation directe avec la voie des BMPs pourraient potentiellement intervenir dans la genèse du remodelage vasculaire. Nous avons ainsi montré que l'expression de l'apeline était profondément inhibée par l'activation de la voie BMP par le ligand BMP9 dans les CE pulmonaires en culture [19]. Or l'apelin a des effets sur la prolifération des cellules vasculaires induites par l'hypoxie, comme le montre la baisse de la prolifération des CE induite en hypoxie par l'inhibition de l'apeline ou de son récepteur [20]. La déficience de la voie BMP entraîne une baisse de l'activité de la phosphatase PTEN (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase) (phosphatase and tensin homolog) ce qui induit une augmentation de la signalisation de la voie PI3K-AKT-mTORC1. Il a été montré que le blocage de la voie ALK1 augmentait les niveaux de phosphoPTEN inactif et que le traitement par BMP9 diminue la phosphorylation de PTEN, augmentant ainsi son activité [21]. Ceci montre l'importance de l'interac-

tion entre la voie BMP et la voie PI3K/AKT car cette dernière stimule la prolifération, la migration et la survie des CE [22].

Le gène *SMAD8* (alias *SMAD9*) code pour le facteur de transcription Smad 8 qui est un important médiateur de la signalisation BMP. Deux mutations tronquantes (interrompant la phase de lecture de l'ARNm) ont été décrites dans le gène *SMAD8* chez des patients d'ascendance asiatique [23]. Le récepteur tronqué Smad8 (C202X) n'est pas phosphorylé par un récepteur de type 1 activé et ne peut pas interagir avec Smad4 [23].

Une mutation homozygote tronquante de *BMP9* a été identifiée chez un enfant de 5 ans atteint d'une HTAP pédiatrique [24]. Comme BMP9 est le principal ligand d'ALK1/BMPRII, le mécanisme de la maladie peut être supposé comme étant proche de celui des autres mutations trouvées dans les autres gènes de la voie des BMPs, *BMPRII* et *SMAD8*.

### **D'autres gènes sont responsables des formes non syndromiques d'HTA**

D'autres gènes ont été identifiés plus récemment à l'origine de prédisposition à l'HTAP mais les mutations sur ces gènes sont beaucoup plus rares. Des mutations faux-sens du gène *KCNK3* (alias *TASK1*) ont été trouvées dans trois familles avec HTAP par séquençage d'exomes (whole exome sequencing ou WES) et trois mutations additionnelles ont été identifiées en analysant le gène dans une grande série de patients avec une forme familiale ou idiopathique d'HTAP [25]. Le gène *KCNK3* code pour un canal potassium sensible au voltage et un déficit fonctionnel sur ce gène peut conduire à une augmentation du calcium intracellulaire dans les CML vasculaires et à une augmentation du tonus vasculaire. L'expression de *KCNK3* est très diminuée dans les CML et les CE de patients avec HTAP et dans l'HTAP expérimentale chez l'animal. L'inhibition de *KCNK3* promeut la vasoconstriction et la prolifération des CML vasculaires [26]. Une mutation bi-allélique invalidant *KCNK3* dans une forme pédiatrique sévère d'HTAP a été récemment décrite [27].

Le gène *CAVI* codant pour la caveoline-1 est également un nouveau gène décrit à l'origine de formes héritables d'HTAP. La cavéoline-1 est un composant majeur des cavéoles qui sont des invaginations de la membrane plasmique de 50-100nm de diamètre qui sont très présentes dans les CE et les CML et qui sont le site de localisation de nombreux récepteurs couplés aux protéines G et le site de fixation membranaire de la synthase endothéliale du monoxyde d'azote. Des mutations du gène *CAVI* ont été identifiées dans une grande famille à cas multiples d'HTAP et une mutation *de novo* de ce gène a été identifiée chez un jeune enfant atteint d'HTAP sporadique [28]. D'autres mutations hétérozygotes ou homozygotes invalidant *CAVI* ont été identifiées, associées à une lipodystrophie congénitale généralisée (LCG), sans HTAP associée [29, 30]. Sur le plan physiopathologique, la caveoline-1 inhibe la synthase du monoxyde d'azote (NO) en se liant à l'enzyme, ce qui peut apparaître contradictoire avec un effet délétère de son inactivation partielle ou totale puisqu'il est décrit un déficit de vasodilatation dans l'HTAP. La réponse à cette

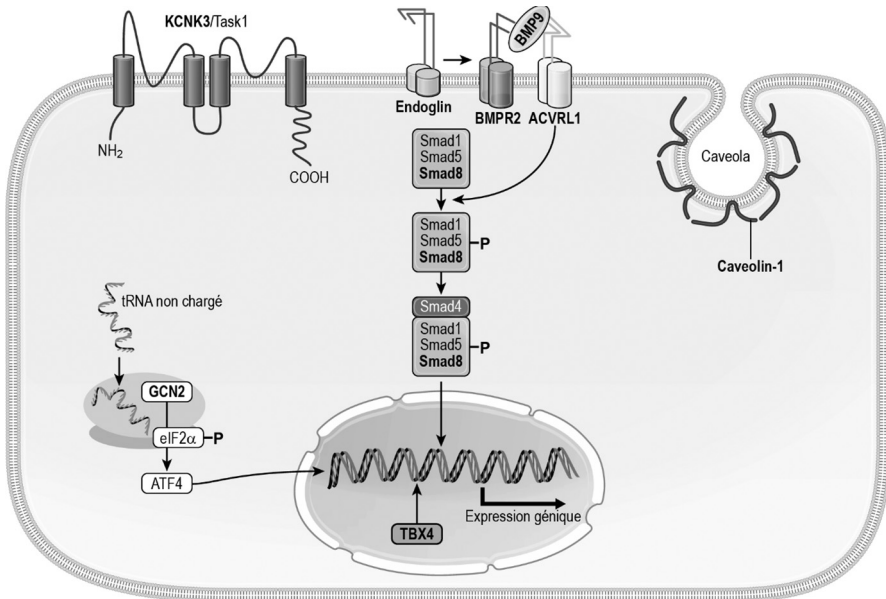
contradiction apparente pourrait venir du modèle murin de souris déficientes en caveoline-1 (*Cav-1<sup>-/-</sup>*) qui développent une HTAP par augmentation des résistances vasculaires pulmonaires liée au remodelage vasculaire des vaisseaux pulmonaires pré-capillaires en dépit d'une augmentation de deux fois du taux de NO dans le plasma [31]. Ces résultats suggèrent que le remodelage vasculaire est secondaire à un autre processus et que l'augmentation de la production de NO est le résultat d'une contre-régulation [32, 33]. Un lien avec la voie BMP est possible puisque le récepteur BMPRII est aussi localisé dans les cavéoles dans les CML aortiques et la perte de cavéoline-1 entraîne une diminution de BMPRII lié à la membrane [34]. Des études fonctionnelles *in vitro* sur des cavéoline mutées ont montré que les mutations tronquantes de la partie C-terminale de la protéine (p.F160X) affectaient la formation des complexes oligomériques de caveolin-1 et la colocalisation avec un autre constituant des cavéoles, la cavin-1 [35]. Une publication récente vient compliquer l'interprétation de ces résultats en montrant que les souris invalidées pour *Cav-1* montrent une atténuation du remodelage vasculaire aortique, coronaire et rénal (épaississement de la media et fibrose péri-vasculaire) en réponse à une administration continue d'angiotensine II [36].

Ainsi, d'autres gènes ne faisant pas partie de la voie des BMPs pourraient être en cause dans le développement de l'HTAP, ce qui a un double intérêt physiopathologique et thérapeutique car de nouvelles options thérapeutiques pourraient être développées à partir de ces résultats.

### **Plusieurs gènes sont responsables des formes syndromiques d'Hypertension artérielle pulmonaire**

#### **La Maladie de Rendu-Osler ou hémorragie télangiectasique héréditaire**

Le gène *ACVRL1* (alias *ALK1*) code pour un récepteur de type I de la voie des BMPs qui forme des complexes avec BMPRII. Le gène *ACVRL1* est un des deux gènes majeurs responsables de la maladie de Rendu-Osler [37] (OMIM187300) et prédispose également à l'HTAP [38]. Il s'agit d'une complication rare mais grave de la maladie de Rendu-Osler. Les signes cliniques classiques d'HHT (épistaxis, télangiectasies, malformations artério-veineuses viscérales) associés à des antécédents familiaux évocateurs ne sont pas toujours présents au moment du diagnostic d'HTAP car la moyenne d'âge d'apparition de l'HTAP est encore plus jeune que chez les patients porteurs de mutation *BMPR2* en raison des formes pédiatriques qui sont plus rarement observées avec ce dernier gène [38]. Les cas sont également plus sévères que dans les formes liées à des mutations du gène *BMPR2* mais elles partagent avec ces dernières une insensibilité aux vasodilatateurs. Les mutations sont de type tronquantes ou faux-sens et, dans ce dernier cas, touchent préférentiellement le site catalytique. Chez les sujets atteints de la maladie de Rendu-Osler et ayant développé une HTAP, une fréquence particulière de mutations a été notée dans la NANDOR box d'*ACVRL1*, située dans la région carboxy-terminale du récepteur au niveau de l'exon 10 du gène (5 % en l'absence d'HTAP versus 33 % en



Représentation schématique des gènes (en gras) responsables de susceptibilité à l'hypertension pulmonaire et de leurs localisations cellulaires et de leurs modes d'action.

présence d'HTAP) [38]. Les mutations ont un effet d'inactivation du gène mais un effet dominant négatif a également été avancé pour certaines mutations du fait que les récepteurs se dimérisent et que le récepteur muté peut gêner la formation d'un dimère actif si la mutation n'empêche pas sa biosynthèse dans la cellule. Les mécanismes de développement de l'HTAP sont probablement similaires à ceux impliqués chez les porteurs de mutation *BMPR2*, et il a été montré que les mutations d'*ACVRL1* induisent une réponse déficiente à *BMP9* dans les cellules transfectées [39]. Dans de rares cas d'HTAP, ce sont des mutations du gène de l'*endogline* (un autre gène de prédisposition à la maladie de Rendu-Osler) codant pour un corécepteur des BMPs exprimés dans les CE et de la lignée myéloïde qui ont été décrites [40, 41].

### ***TBX4* et le syndrome Coxo-Podo-Patellaire (*Small Patella Syndrome*)**

Les mutations monoalléliques du gène *TBX4* sont connues pour être responsables d'anomalies du développement osseux, le syndrome coxo-podo-patellaire, qui associe des anomalies de développement osseux de la rotule, du bassin, des pieds et du fémur à des degrés variables [42]. En tirant profit d'une microdélétion en 17q23.2 englobant les gènes *TBX2* et *TBX4* à l'origine d'une HTAP familiale avec retard mental, Kerstjens-Frederickse et coll ont identifié par la suite des mutations ponctuelles de *TBX4* chez 30 % des patients dans une série d'HTAP à début pédiatrique.

En revanche le gène *TBX4* n'a été identifié par les mêmes auteurs que dans 2 % de formes d'HTAP de l'adulte. Une recherche systématique d'HTAP effectuée chez des sujets hétérozygotes pour une mutation de ce gène et présentant la symptomatologie osseuse a été totalement négative [42]. Dans une série pédiatrique d'HTAP, Levy et coll ont observé que les mutations *TBX4* sont identifiées dans 10 % des cas et représentent 25 % des mutations identifiées, ce qui est très supérieur à la proportion observée chez l'adulte [43].

Le gène *TBX4* appartient à la famille des facteurs de transcription qui contiennent un motif de liaison à l'ADN séquence-spécifique de type domaine T (T Box) qui jouent un rôle majeur pendant le développement en modulant l'expression génique [44]. Son expression est détectée dans beaucoup de tissus dérivés du mésoderme, et en particulier le mésenchyme pulmonaire. Il est exprimé pendant le développement dans différents tissus dont le poumon et l'os, sous le contrôle d'enhancer (ou activateur) de transcription spécifiques pour chaque tissu. L'enhancer pulmonaire est situé dans l'intron 3 du gène et sa séquence est très conservée chez les vertébrés, en particulier une région centrale de 500 paires de base que l'on retrouve jusqu'aux cœlacanthes qui ont une ébauche de poumon. Cet enhancer est responsable d'une expression embryonnaire très précoce dans les CE et les CML pulmonaires chez la souris [45].

La pénétrance des mutations de *TBX4* pour l'HTAP semble faible car le parent qui transmet la mutation aux enfants diagnostiqués avec une mutation de *TBX4* et une HTAP ne présente le plus souvent pas d'HTAP. Plusieurs hypothèses sont donc possibles pour expliquer ce saut de pénétrance d'une génération à l'autre, avec des atteintes pédiatriques fréquentes qui peuvent évoquer un retentissement du déficit d'expression de *TBX4* survenant dès le développement intra-utérin. On peut spéculer sur la mise en jeu d'autres facteurs génétiques (comme un digénisme impliquant un variant sur un deuxième gène, variant non porté par le parent indemne et hérité du parent non porteur), épigénétiques ou encore environnementaux qui n'ont pas touché les parents porteurs indemnes. Il sera particulièrement important et difficile de rechercher ces facteurs modificateurs ou déclencheurs dans cette forme d'HTAP car la maladie est rare et les tissus atteints ne sont pas accessibles.

### **Autres syndromes responsables d'hypertension pulmonaire**

Des cas d'HTAP de l'enfant ont été décrits dans le cadre de maladies génétiques telles que la trisomie 21 [46]. Les shunts gauche-droit et l'obstruction des voies aériennes supérieures et l'apnée du sommeil peuvent favoriser la survenue de la maladie. Les autres syndromes parfois associés à une cardiopathie congénitale et une HTAP sont le syndrome de DiGeorge, le Scimitar syndrome et le syndrome de Noonan [47-49]. Les syndromes génétiques associés à une hypertension pulmonaire sans cardiopathie congénitale sont la neurofibromatose de type 1, la maladie de Gaucher, les maladies de stockage du collagène (GSDI et GSDIII) [50-52]. Le mécanisme de développement de l'hypertension pulmonaire dans ces syndromes



génétiques n'a pas été démontré mais pourrait impliquer les cardiopathies congénitales lorsqu'elle sont présentes, l'obstruction des voies aériennes, le remodelage vasculaire par prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (cas de la neurofibromatose de type 1 avec activation de la voie de signalisation mTOR) [50].

### ***EIF2AK4* est le seul gène responsable connu de la Maladie Veino-Occlusive Pulmonaire**

Selon la dernière classification internationale des hypertensions pulmonaires, la MVOP et l'hémangiomatose capillaire pulmonaire sont classées dans le même groupe des hypertensions pulmonaires (sous-groupe 1') [3]. Ces deux dénominations recouvrent en fait des lésions histo-pathologiques de la même maladie qui sont plus ou moins marquées d'un patient à l'autre mais induites par des mutations du gène *EIF2AK4*. La MVOP et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire associent en effet une fibrose de l'intima conduisant à l'occlusion fibreuse plus ou moins complète des veinules pré-septales, associée à une prolifération capillaire et un remodelage artérielle pulmonaire modéré [53]. L'incidence de la MVOP est de 0,1 à 0,5 cas par million d'adultes et par an [53].

Les formes familiales de la maladie qui ont été décrites dans la littérature ont évoqué une transmission autosomique récessive [54-55]. Des mutations bi-alléliques du gène *EIF2AK4*, ont été identifiées par séquençage d'exome dans des familles présentant des signes évocateurs de MVOP et/ou hémangiomatose capillaire pulmonaire [56-57]. Ces données ont confirmé que la MVOP et l'hémangiomatose pulmonaire sont deux présentations de la même maladie. Les signes cliniques de la maladie sont similaires à ceux de l'HTAP et l'hémodynamique montre une hypertension pulmonaire de type pré-capillaire [53]. Plusieurs signes font suspecter la maladie tels que des signes radiologiques au scanner thoracique (ganglions lymphatiques médiastinaux élargis, opacités en verre dépoli ou épaississement des septa interlobulaires) et la baisse de la capacité de diffusion du monoxyde de carbone (DLCO < 60 %) [53]. Comparé aux formes sporadiques sans mutation du gène *EIF2AK4*, les formes héréditaires avec mutations bi-alléliques d'*EIF2AK4* sont plus précoces et entraînent le décès ou la transplantation à un âge plus jeune [58]. La proportion de sujets porteurs de mutations bi-alléliques du gène *EIF2AK4* qui développent la maladie n'est pas connue mais elle semble très élevée, le début de la maladie se situant entre la naissance et 50 ans. Dans notre laboratoire, le diagnostic moléculaire a permis de rétablir le diagnostic de MVOP héritable dans deux cas sur 200 HTAP testées et de montrer une mutation délétère chez une apparentée de deux patients décédés de MVOP chez qui le diagnostic moléculaire n'avait pu être effectué de leur vivant (résultats non publiés). Cela souligne l'intérêt diagnostique de la recherche de mutations de gènes prédisposant à l'HTAP et la MVO dans ces formes rares d'hypertension pulmonaire souvent difficiles à diagnostiquer.

Les mécanismes du remodelage vasculaire pulmonaire à prédominance veinulaire induit par les mutations bi-alléliques du gène *EIF2AK4* n'est pas connu. *EIF2AK4* code pour la kinase *GCN2*, l'une des quatre kinases du facteur d'initiation de la

traduction eIF2 (eukaryotic initiation factor 2). En phosphorylant sa sous-unité alpha, GCN2 inactive eIF2, ce qui induit l'augmentation de la traduction d'ATF4, un facteur de transcription qui active ses cibles transcriptionnelles, telles que CHOP, un autre facteur de transcription. L'ensemble des modifications induites constitue la « réponse intégrée au stress » (ISR) de la cellule [59]. Dans le cas de GCN2, cette kinase est sensible au stress nutritionnel que représente un déficit en acide aminé essentiel, tel que leucine ou valine. Cette réponse comprend une baisse généralisée de la traduction, une induction de l'autophagie, une résistance au stress oxydant, une inhibition de la voie mTOR et la mise en jeu d'un rétrocontrôle par la phosphatase GAD34 [60]. Pour expliquer le remodelage veineux induit par la perte de fonction de GCN2, qui joue donc un rôle protecteur contre le remodelage, on peut faire plusieurs hypothèses : la perte de fonction complète de GCN2 peut induire des effets directs car la cellule n'est plus capable de répondre à ce stress nutritionnel, ou bien il se produit une surcompensation délétère par les autres kinases, ou bien c'est l'absence de phosphorylation d'autres substrats non identifiés de GCN2 qui induit le remodelage. Selon les résultats de notre laboratoire, la souris invalidée pour *Eif2ak4* (*Eif2ak4<sup>-/-</sup>*) ne développe pas de MVOP, ni en conditions basales, ni dans des conditions de stress (résultats non publiés). La compréhension des liens physiopathologiques est un élément essentiel pour la mise au point de traitements de cette maladie pour laquelle il n'y a pas de traitement efficace disponible hormis la transplantation pulmonaire pour les patients éligibles.

### **Les découvertes de la génétique et les cellules souches pluripotentes induites offrent des perspectives thérapeutiques nouvelles**

L'identification des gènes responsables de la maladie dans des familles évocatrices de formes monogéniques d'hypertension pulmonaire, ont permis de la démembrer en entités distinctes dont la présentation clinique, l'évolution, le pronostic et la réponse au traitement sont différentes selon la présence de mutations sur les différents gènes.

L'analyse moléculaire, au niveau tissulaire et cellulaire, de ces formes monogéniques hérissables a permis de montrer des similitudes entre les formes non hérissables, et sporadiques des mêmes maladies. Ainsi, dans l'HTAP, il a été montré que la baisse de l'expression vasculaire pulmonaire de BMPRII n'est pas uniquement observée dans les formes associées à des mutations de *BMPR2* mais qu'elle est également présente dans les formes sans mutation [61]. De même, dans la MVO, il a été montré que dans les formes expérimentales de la maladie secondaires à la prise d'agents alkylants, une baisse de l'expression de GCN2, dont le gène est muté sur les deux allèles dans les formes hérissables chez l'homme, était observée dans les poumons [62].

Ces observations issues des formes monogéniques ne donnent pas toutes les clefs sur le plan physiopathologique mais éclairent sur des mécanismes qui n'auraient pas été suspectés autrement, et qui mettent la voie sur des traitements. Ainsi, Spiekerkoetter et al ont criblé des molécules activatrices de l'expression de *BMPR2 in vitro* [63].

Parmi les molécules testées, le tacrolimus, déjà autorisé dans d'autres indications, s'est montré efficace chez l'homme atteint d'HTAP, selon les résultats préliminaires d'un essai incluant trois patients.

L'utilisation de modèles cellulaires dérivés d'iPSC (*induced pluripotent stem cells*) [64] reproduisant de façon fidèle les cellules endothéliales, principales cellules concernées dans les vaisseaux pulmonaires, va permettre d'avancer sur les mécanismes moléculaires les plus intimes de la maladie. C'est ce que suggère l'article récemment publié par Gu et al sur des CE dérivées d'iPSC [65]. En effet, ces auteurs ont mis en évidence des mécanismes moléculaires compensateurs aux anomalies de la fonction endothéliale et à la baisse de la signalisation BMP chez les porteurs sains de mutations de *BMPR2*, en comparaison des sujets porteurs et atteints de la même famille et de sujets contrôles. La comparaison au niveau du génome, du transcriptome et du protéome d'iPSC issus de patients mutés *TBX4*, atteints ou indemnes d'HTAP, et redifférenciées en cellules vasculaires pourraient apporter des informations importantes sur l'origine du saut de pénétrance entre générations [66].

On peut également envisager dans l'avenir de faire un phénotypage moléculaire des patients à partir des iPSC afin d'ajuster au mieux leur traitement en fonction des anomalies identifiées.

L'ensemble de ces résultats montre que le traitement de l'hypertension pulmonaire bénéficiera largement des avancées de la génétique, mais aussi de la biologie cellulaire et moléculaire pour la mise au point de traitements adaptés à chaque patient dans le cadre d'une médecine de précision.

## RÉFÉRENCES

- [1] Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, et al. Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43(12 Suppl S):25S-32S.
- [2] Farber HW, Loscalzo J. Pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med*. 2004;351(16):1655-65.
- [3] Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, et al. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(25 Suppl):D34-41.
- [4] Hoepfer MM, Humbert M, Souza R, Idrees M, Kawut SM, Sliwa-Hahnle K, et al. A global view of pulmonary hypertension. *Lancet Respir Med*. 2016;4(4):306-22.
- [5] Lane KB, Machado RD, Pauculo MW, Thomson JR, Phillips JA, Loyd JE, et al. Heterozygous germline mutations in *BMPR2*, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet*. 2000;26(1):81-4.
- [6] Machado RD, Southgate L, Eichstaedt CA, Aldred MA, Austin ED, Best DH, et al. Pulmonary Arterial Hypertension: A Current Perspective on Established and Emerging Molecular Genetic Defects. *Hum Mutat*. 2015;36(12):1113-27.
- [7] Larkin EK, Newman JH, Austin ED, Hemnes AR, Wheeler L, Robbins IM, et al. Longitudinal analysis casts doubt on the presence of genetic anticipation in heritable pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012;186(9):892-6.

- [8] Evans JDW, Girerd B, Montani D, Wang X-J, Galiè N, Austin ED, et al. BMPR2 mutations and survival in pulmonary arterial hypertension: an individual participant data meta-analysis. *Lancet Respir Med.* 2016;4(2):129-37.
- [9] Girerd B, Montani D, Eyries M, Yaici A, Sztrymf B, Coulet F, et al. Absence of influence of gender and BMPR2 mutation type on clinical phenotypes of pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2010;11:73.
- [10] Girerd B, Coulet F, Jaïs X, Eyries M, Van Der Bruggen C, De Man F, et al. Characteristics of pulmonary arterial hypertension in affected carriers of a mutation located in the cytoplasmic tail of bone morphogenetic protein receptor type 2. *Chest.* 2015;147(5):1385-94.
- [11] David L, Mallet C, Mazerbourg S, Feige JJ, Bailly S. Identification of BMP9 and BMP10 as functional activators of the orphan activin receptor-like kinase 1 (ALK1) in endothelial cells. *Blood.* 2007;109(5):1953-61.
- [12] Cai J, Pardali E, Sánchez-Duffhues G, ten Dijke P. BMP signaling in vascular diseases. *FEBS Lett.* 2012;586(14):1993-2002.
- [13] Long L, Ormiston ML, Yang X, Southwood M, Gräf S, Machado RD, et al. Selective enhancement of endothelial BMPR-II with BMP9 reverses pulmonary arterial hypertension. *Nat Med.* 2015;21(7):777-85.
- [14] Teichert AM, Karantzoulis-Fegaras F, Wang Y, Mawji IA, Bei X, Gnanapandithen K, et al. Characterization of the murine endothelial nitric oxide synthase promoter. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1443(3):352-7.
- [15] Yang X, Long L, Southwood M, Rudarakanchana N, Upton PD, Jeffery TK, et al. Dysfunctional Smad signaling contributes to abnormal smooth muscle cell proliferation in familial pulmonary arterial hypertension. *Circ Res.* 2005;96(10):1053-63.
- [16] Ciumas M, Eyries M, Poirier O, Maugey S, Dierick F, Gambaryan N, et al. Bone morphogenetic proteins protect pulmonary microvascular endothelial cells from apoptosis by upregulating alpha-B-crystallin. *Arter Thromb Vasc Biol.* 2013;33(11):2577-84.
- [17] Rabinovitch M. Molecular pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Clin Invest.* 2008;118(7):2372-9.
- [18] Stacher E, Graham BB, Hunt JM, Gandjeva A, Groshong SD, McLaughlin VV, et al. Modern age pathology of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 août 2012 ; 186(3):261-72.
- [19] Poirier O, Ciumas M, Eyries M, Montagne K, Nadaud S, Soubrier F. Inhibition of apelin expression by BMP signaling in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 ; 303(11):C1139-45.
- [20] Eyries M, Siegfried G, Ciumas M, Montagne K, Agrapart M, Lebrin F, et al. Hypoxia-induced apelin expression regulates endothelial cell proliferation and regenerative angiogenesis. *Circ Res.* 2008;103(4):432-40.
- [21] Ola R, Dubrac A, Han J, Zhang F, Fang JS, Larrivé B, et al. PI3 kinase inhibition improves vascular malformations in mouse models of hereditary haemorrhagic telangiectasia. *Nat Commun.* 2016;7:13650.
- [22] Graupera M, Potente M. Regulation of angiogenesis by PI3K signaling networks. *Exp Cell Res.* 2013;319(9):1348-55.
- [23] Shintani M, Yagi H, Nakayama T, Saji T, Matsuoka R. A new nonsense mutation of SMAD8 associated with pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet.* 2009;46(5):331-7.
- [24] Wang G, Fan R, Ji R, Zou W, Penny DJ, Varghese NP, et al. Novel homozygous BMP9 nonsense mutation causes pulmonary arterial hypertension: a case report. *BMC Pulm Med.* 2016;16:17.
- [25] Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, et al. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med.* 2013;369(4):351-61.

- [26] Antigny F, Hautefort A, Meloche J, Belacel-Ouari M, Manoury B, Rucker-Martin C, et al. Potassium Channel Subfamily K Member 3 (KCNK3) Contributes to the Development of Pulmonary Arterial Hypertension. *Circulation*. 2016;133(14):1371-85.
- [27] Navas Tejedor P, Tenorio Castaño J, Palomino Doza J, Arias P, Gordo G, López Meseguer M, et al. An homozygous mutation in *kcnk3* is associated with an aggressive form of hereditary pulmonary arterial hypertension. *Clin Genet*. 2017;91(3):453-457.
- [28] Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA 3rd, et al. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circ Cardiovasc Genet*. 2012;5(3):336-43.
- [29] Cao H, Alston L, Ruschman J, Hegele RA. Heterozygous *CAV1* frameshift mutations (MIM 601047) in patients with atypical partial lipodystrophy and hypertriglyceridemia. *Lipids Health Dis*. 2008;7:3.
- [30] Kim CA, Delépine M, Boutet E, El Mourabit H, Le Lay S, Meier M, et al. Association of a homozygous nonsense caveolin-1 mutation with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(4):1129-34.
- [31] Maniatis NA, Shinin V, Schraufnagel DE, Okada S, Vogel SM, Malik AB, et al. Increased pulmonary vascular resistance and defective pulmonary artery filling in caveolin-1<sup>-/-</sup> mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008;294(5):L865-873.
- [32] Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, et al. Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science*. 2001 ; 293(5539):2449-52.
- [33] Zhao Y-Y, Liu Y, Stan R-V, Fan L, Gu Y, Dalton N, et al. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(17):11375-80.
- [34] Wertz JW, Bauer PM. Caveolin-1 regulates BMPRII localization and signaling in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;375(4):557-61.
- [35] Han B, Copeland CA, Kawano Y, Rosenzweig EB, Austin ED, Shahmirzadi L, et al. Characterization of a caveolin-1 mutation associated with both pulmonary arterial hypertension and congenital generalized lipodystrophy. *Traffic Cph Den*. 2016;17(12):1297-312.
- [36] Forrester SJ, Elliott KJ, Kawai T, Obama T, Boyer MJ, Preston KJ, et al. Caveolin-1 Deletion Prevents Hypertensive Vascular Remodeling Induced by Angiotensin II. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2017;69(1):79-86.
- [37] Trembath RC, Thomson JR, Machado RD, Morgan NV, Atkinson C, Winship I, et al. Clinical and molecular genetic features of pulmonary hypertension in patients with hereditary hemorrhagic telangiectasia. *N Engl J Med*. 2001;345(5):325-34.
- [38] Girerd B, Montani D, Coulet F, Sztrymf B, Yaici A, Jaïs X, et al. Clinical outcomes of pulmonary arterial hypertension in patients carrying an *ACVRL1* (ALK1) mutation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;181(8):851-61.
- [39] Ricard N, Bidart M, Mallet C, Lesca G, Giraud S, Prudent R, et al. Functional analysis of the BMP9 response of ALK1 mutants from HHT2 patients: a diagnostic tool for novel *ACVRL1* mutations. *Blood*. 2010;116(9):1604-12.
- [40] Chaouat A, Coulet F, Favre C, Simonneau G, Weitzenblum E, Soubrier F, et al. Endoglin germline mutation in a patient with hereditary haemorrhagic telangiectasia and dexfenfluramine associated pulmonary arterial hypertension. *Thorax*. 2004;59(5):446-8.
- [41] Harrison RE, Berger R, Haworth SG, Tulloh R, Mache CJ, Morrell NW, et al. Transforming growth factor-beta receptor mutations and pulmonary arterial hypertension in childhood. *Circulation*. 2005;111(4):435-41.

- [42] Kerstjens-Frederikse WS, Bongers EMHF, Roofthoof MTR, Leter EM, Douwes JM, Dijk AV, et al. TBX4 mutations (small patella syndrome) are associated with childhood-onset pulmonary arterial hypertension. *J Med Genet.* 2013;50(8):500-6.
- [43] Levy M, Eyries M, Szezepanski I, Ladouceur M, Nadaud S, Bonnet D, et al. Genetic analyses in a cohort of children with pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2016;48(4):1118-26.
- [44] Papaioannou VE. The T-box gene family: emerging roles in development, stem cells and cancer. *Dev Camb Engl.* 2014;141(20):3819-33.
- [45] Zhang W, Menke DB, Jiang M, Chen H, Warburton D, Turcatel G, et al. Spatial-temporal targeting of lung-specific mesenchyme by a Tbx4 enhancer. *BMC Biol.* 2013;11:111.
- [46] Greenwood RD, Nadas AS. The clinical course of cardiac disease in Down's syndrome. *Pediatrics.* 1976;58(6):893-7.
- [47] Pfarr N, Fischer C, Ehlken N, Becker-Grunig T, Lopez-Gonzalez V, Gorenflo M, et al. Hemodynamic and genetic analysis in children with idiopathic, heritable, and congenital heart disease associated pulmonary arterial hypertension. *Respir Res.* 2013;14:3.
- [48] Vida VL, Padalino MA, Boccuzzo G, Tarja E, Berggren H, Carrel T, et al. Scimitar syndrome: a European Congenital Heart Surgeons Association (ECHSA) multicentric study. *Circulation.* 2010;122(12):1159-66.
- [49] Tinker A, Uren N, Schofield J. Severe pulmonary hypertension in Ullrich-Noonan syndrome. *Br Heart J.* 1989;62(1):74-7.
- [50] Montani D, Coulet F, Girerd B, Eyries M, Bergot E, Mal H, et al. Pulmonary hypertension in patients with neurofibromatosis type I. *Med Baltim.* 2011;90(3):201-11.
- [51] Lo SM, Liu J, Chen F, Pastores GM, Knowles J, Boxer M, et al. Pulmonary vascular disease in Gaucher disease: clinical spectrum, determinants of phenotype and long-term outcomes of therapy. *J Inherit Metab Dis.* 2011;34(3):643-50.
- [52] Lee TM, Berman-Rosenzweig ES, Slonim AE, Chung WK. Two Cases of Pulmonary Hypertension Associated with Type III Glycogen Storage Disease. *JIMD Rep.* 2011;1:79-82.
- [53] Montani D, Lau EM, Dorfmueller P, Girerd B, Jaïs X, Savale L, et al. Pulmonary veno-occlusive disease. *Eur Respir J.* 2016;47(5):1518-34.
- [54] Davies P, Reid L. Pulmonary veno-occlusive disease in siblings: case reports and morphometric study. *Hum Pathol.* 1982;13(10):911-5.
- [55] Voordes CG, Kuipers JR, Elema JD. Familial pulmonary veno-occlusive disease: a case report. *Thorax.* 1977;32(6):763-6.
- [56] Eyries M, Montani D, Girerd B, Perret C, Leroy A, Lonjou C, et al. EIF2AK4 mutations cause pulmonary veno-occlusive disease, a recessive form of pulmonary hypertension. *Nat Genet.* 2014;46(1):65-9.
- [57] Best DH, Sumner KL, Austin ED, Chung WK, Brown LM, Borczuk AC, et al. EIF2AK4 mutations in pulmonary capillary hemangiomatosis. *Chest.* 2014;145(2):231-6.
- [58] Montani D, Girerd B, Jaïs X, Levy M, Amar D, Savale L, et al. Clinical phenotypes and outcomes of heritable and sporadic pulmonary veno-occlusive disease: a population-based study. *Lancet Respir Med.* 2017;5(2):125-134
- [59] Castilho BA, Shanmugam R, Silva RC, Ramesh R, Himme BM, Sattlegger E. Keeping the eIF2 alpha kinase Gcn2 in check. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1843(9):1948-68.
- [60] Kilberg MS, Shan J, Su N. ATF4-dependent transcription mediates signaling of amino acid limitation. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20(9):436-43.
- [61] Atkinson C, Stewart S, Upton PD, Machado R, Thomson JR, Trembath RC, et al. Primary pulmonary hypertension is associated with reduced pulmonary vascular expression of type II bone morphogenetic protein receptor. *Circulation.* 2002;105(14):1672-8.

- [62] Perros F, Günther S, Ranchoux B, Godinas L, Antigny F, Chaumais M-C, et al. Mitomycin-Induced Pulmonary Veno-Occlusive Disease: Evidence From Human Disease and Animal Models. *Circulation*. 2015;132(9):834-47.
- [63] Spiekerkoetter E, Tian X, Cai J, Hopper RK, Sudheendra D, Li CG, et al. FK506 activates BMPR2, rescues endothelial dysfunction, and reverses pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2013;123(8):3600-13.
- [64] Taura D, Sone M, Homma K, Oyamada N, Takahashi K, Tamura N, et al. Induction and isolation of vascular cells from human induced pluripotent stem cells-brief report. *Arter Thromb Vasc Biol*. 2009;29(7):1100-3.
- [65] Gu M, Shao N-Y, Sa S, Li D, Termglinchan V, Ameen M, et al. Patient-Specific iPSC-Derived Endothelial Cells Uncover Pathways that Protect against Pulmonary Hypertension in BMPR2 Mutation Carriers. *Cell Stem Cell*. 2017;20(4):490-504.e5.
- [66] Patsch C, Challet-Meylan L, Thoma EC, Urich E, Heckel T, O'Sullivan JF, et al. Generation of vascular endothelial and smooth muscle cells from human pluripotent stem cells. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):994-1003.

