



HAL
open science

Identification de cibles cellulaires impliquées dans l'hypertension artérielle pulmonaire induite par les inhibiteurs de protéines kinases par une analyse de pharmacovigilance / pharmacodynamie

Lucie Cornet

► **To cite this version:**

Lucie Cornet. Identification de cibles cellulaires impliquées dans l'hypertension artérielle pulmonaire induite par les inhibiteurs de protéines kinases par une analyse de pharmacovigilance / pharmacodynamie. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-02153482

HAL Id: dumas-02153482

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02153482>

Submitted on 12 Jun 2019

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

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

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

<http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur>

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES
UFR DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année : 2018

IDENTIFICATION DE CIBLES CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS
L'HYPERTENSION ARTÉRIELLE PULMONAIRE INDUITE PAR LES
INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES PAR UNE ANALYSE DE
PHARMACOVIGILANCE / PHARMACODYNAMIE.

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE
PHARMACIE HOSPITALIERE ET DES COLLECTIVITES

Conformément aux dispositions du décret N° 90-810 du 10 septembre 1990, tient lieu de

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ÉTAT

Lucie CORNET

[Données à caractère personnel]

MÉMOIRE SOUTENU PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE
GRENOBLE

Le : 26/04/2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Monsieur le Professeur Christophe RIBUOT

Membres : Monsieur le Professeur Michel TOD
Monsieur le Professeur Jean-Luc CRACOWSKI
Monsieur le Docteur Sébastien QUETANT

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Charles KHOURI

L'UFR de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les mémoires ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

Doyen de la Faculté : **M. le Pr. Michel SEVE**

Vice-doyen et Directrice des Etudes : **Mme Christine DEMEILLIERS**

Année 2017-2018

ENSEIGNANTS -CHERCHEURS

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	ALDEBERT	DELPHINE	LAPM-UMR CNRS 5163
PU-PH	ALLENET	BENOIT	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
PU	BAKRI	ABDELAZIZ	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MAST	BARDET	JEAN-DIDIER	-
MCU	BATANDIER	CECILE	LBFA – INSERM U1055
PU-PH	BEDOUC	PIERRICK	THEMAS TIMC-IMAG – UMR CNRS 5525
MCU	BELAIDI-CORSAT	ELISE	HP2 – INSERM U1042
MAST	BELLET	BEATRICE	-
MCU	BOUCHERLE	BENJAMIN	DPM
DCE	BOULADE	MARINE	SyMMES
PU	BOUMENDJEL	AHCENE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	BOURGOIN	SANDRINE	IAB – CRI INSERM U823
DCE	BOUVET	RAPHAEL	HP2
MCU	BRETON	JEAN	LCIB – UMR E3 CEA
MCU	BRIANCON-MARJOLLET	ANNE	HP2 – INSERM U1042
PU	BURMEISTER	WILHEM	UVHCI- UMI 3265 EMBL CNRS
MCU-PH	BUSSER	BENOIT	IAB – CRI INSERM U823
MCU	CAVAILLES	PIERRE	LAPM – UMR 5163 CNRS
AHU	CHANOINE	SEBASTIEN	THEMAS TIMC-IMAG UMR CNRS 5525
MCU	CHOISNARD	LUC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	CHOVELON	BENOIT	DPM – UMR 5063 CNRS
PU-PH	CORNET	MURIEL	THEREX TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
DCE	COUCHET	MORGANE	LBFA
Professeur Emérite	DANEL	VINCENT	-
PU	DECOUT	JEAN-LUC	DPM UMR 5063 CNRS
MCF	DEMEILLERS	CHRISTINE	TIMC-IMAG INSERM U1055
PU-PH	DROUET	CHRISTIAN	GREPI
PU	DROUET	EMMANUEL	UVHCI UMI 3265 EMBL CNRS
MCU	DURMORT	CLAIRE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
PU-PH	FAURE	PATRICE	HP2 – INSERM U1042
MCU	FAURE-JOYEUX	MARIE	HP2- INSERM U1042

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
PRCE	FITE	ANDREE	-
AHU	GARNAUD	CECILE	THEREX TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRAG	GAUCHARD	PIERRE-ALEXIS	-
MCU-PH	GERMI	RAPHAELLE	IBP-IBS UMI 3265 EMBL-CNRS
MCU	GEZE	ANNABELLE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	GILLY	CATHERINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	GODIN-RIBUOT	DIANE	HP2 INSERM U1042
Professeure Emérite	GRILLOT	Renée	-
MCU	GROSSET	CATHERINE	DPM UMR 5063 CNRS
MCU	GUIEU	VALERIE	DPM UMR 5063 CNRS
AHU	HENNEBIQUE	AURELIE	TIMC-IMAG
MCU	HININGER-FAVIER	ISABELLE	LBFA
MCU	KHALEF	NAWEL	TIMC-IMAG CNRS UMR 5525
MCU	KRIVOBOC	SERGE	LCBM IRTSV CEA
DCE	LE	CONG ANH KHANH	CERMA V
PU	LENORMAND	JEAN-LUC	THEREX TIMC-IMAG
PU	MARTIN	DONALD	TIMC-IMAG UMR 5525 CNRS
PRCE	MATTHYS	LAURENCE	-
AHU	MAZET	ROSELINE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	MELO DI LIMA	CHRISTELLE	LECA – UMR CNRS 5553
AHU	MINOVES	MELANIE	
PU	MOINARD	CHRISTOPHE	BFA INSERM U1055
DCE	MONTEMAGNO	CHRISTOPHE R	LRB
DCE	MOULIN	SOPHIE	HP2
PU-PH	MOSSUZ	PASCAL	
MCU	MOUHAMADOU	BELLO	LECA – UMR CNRS 5553
MCU	NICOLLE	EDWIGE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	OUKACINE	FARID	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	PERES	BASILE	DPM – UMR 5063 CNRS
MCU	PEUCHMAUR	MARINE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	PEYRIN	ERIC	DPM – UMR 5063 CNRS
AHU	PLUCHART	HELENE	
MCU	RACHIDI	WALID	LCIB – UMR E3 CEA
MCU	RAVELET	CORINNE	DPM – UMR 5063 CNRS
PU	RIBUOT	CHRISTOPHE	HP2 – INSERM U1042
PAST	RIEU	ISABELLE	-
Professeure Emérite	ROUSSEL	ANNE-MARIE	-
PU-PH	SEVE	MICHEL	IAB-CR INSERM – U823 IAB
MCU	SOUARD	FLORENCE	DPM – UMR 5063 CNRS

Mise à jour le 09/01/2018

STATUT	NOM	PRENOM	LABORATOIRE
MCU	SPANO	MONIQUE	IBS – UMR 5075 CEA CNRS
DCE	TAHER	RALEB	IBS
MCU	TARBOURIECH	NICOLAS	UVHCI – UMR 3265 EMBL CNRS
MCU	VANHAVERBEKE	CECILE	DPM – UMR 5063 CNRS
DCE	VERNET	CELINE	CRI-IAB
DCE	VRAGNIAU	CHARLES	UVHCI
PU	WOUESSIDJEWE	DENIS	DPM – UMR 5063 CNRS

AHU : Assistant Hospitalo-Universitaire
 ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
 BCI : Biologie du Cancer et de l'Infection
 CHU : Centre Hospitalier Universitaire
 CIB : Centre d'Innovation en Biologie
 CRI : Centre de Recherche INSERM
 CNRS : Centre National de Recherche Scientifique
 DCE : Doctorants Contractuels Enseignement
 DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire et de Cognition et Ontogenèse »
 HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
 IAB : Institut Albert Bonniot,
 IBS : Institut de Biologie Structurale
 LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
 LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
 LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
 LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
 LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
 LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
 MAST : Maître de Conférences Associé à Temps Partiel
 MCU : Maître de Conférences des Universités
 MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
 PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
 PRAG : Professeur Agrégé
 PRCE : Professeur certifié affecté dans l'enseignement
 PU : Professeur des Universités
 PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
 SyMMES : Systèmes Moléculaires et nanoMatériaux pour l'Energie et la Santé
 TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 09/01/2018

REMERCIEMENTS

A Messieurs les **Professeurs Jean-Luc CRACOWSKI** et **Michel TOD**,

ainsi qu'à Monsieur le **Docteur Sébastien QUETANT**,

Merci de m'avoir fait l'honneur d'évaluer mon travail.

A Monsieur le **Professeur Christophe RIBUOT**,

Merci d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

A Monsieur le **Docteur Charles Khouri**

Un grand merci de m'avoir proposé ce travail et de m'avoir permis de le réaliser.

Merci également pour ta disponibilité et tes conseils judicieux, c'est un réel plaisir de travailler avec toi.

Merci à tous ceux qui m'ont accueillie pendant 6 mois dans leur PUI, dans leur espace de pratique.

A Dreux, merci à Patricia qui m'a donné cette image du pharmacien hospitalier, merci à Christelle, à Claire, à Sandrine et à Marie-Claire. Merci à Joseph et Anne-So à qui je souhaite plein de bonheur, merci à Baptiste sans qui cela n'aurait pas été pareil.

A Vichy, Merci à Magali de m'avoir si bien encadrée. Merci à Françoise, à Mélanie, à Helena, et un immense merci à Jérôme. Merci aux agents de sté d'avoir fait de mon départ un moment inoubliable et à toute l'équipe de la pharmacie. Merci à Toto, Micka, Alex, Olivier, Vincent et tous les autres d'avoir fait de ce semestre un des meilleurs.

A Lyon Sud, merci de m'avoir montré l'excellence et l'exigence et de m'avoir permis de me rendre compte de ce que je voulais vraiment.

A Grenoble, un immense merci à Chacha, Loulou, Océ, Mélo-mélo, Morgane et Samia d'avoir tenu bon contre l'immensité du monde. Merci à Thomas pour ces discussions toujours plus intéressantes.

A Sainté, merci à Xavier, Fabien, Sandrine, Agnès, et un grand merci à Marion, vous êtes géniaux ! Merci aussi à Maellou, qui a rendu ce semestre d'une douceur inouïe. Merci à Caro¹, d'avoir tant fait pour moi, à Jean, Aurélie, Camille, Lucille, les sangsues, l'Euro 2016, et tout ce qui a fait que c'était quand même très cool.

A Grenoble again, merci à Jean-Luc de m'avoir permis de faire ce stage et ce master, j'en suis sortie plus grande. Merci à Bertrand, Hélène, Atanur, Marie-Claire, Yan, aux Apicuriens, à Dalil, à Toto, à Orianou et à Ben évidemment, merci pour ta présence, ton soutien et tes bons conseils.

Merci à Caro² pour tous ces moments partagés avec toi, ces tartes aux brocolis et ces tisanes quotidiennes.

Aux pharmacovigilants de Grenoble, merci à Brubru, Marion, Nath, Michel, vous m'avez fait aimer la biblio, et par-dessus tout merci à Charles, je n'aurais souhaité personne d'autre pour encadrer ma thèse.

A Grenoble again bis, merci à Isabelle d'avoir partagé ton savoir, merci à Dorothée, à Stéphanie, à Virginie, à Marion et à Anne-Laure et à Paupau pour avoir fait de ce semestre une fin en beauté.

Merci à mes colocos d'amour, Loulou, Soph', Thib (dit Titi) de m'avoir supportée et d'avoir rendu la vie si douce.

Enfin merci aux copains Oriane (re), Doudou, Etienne, Paupau, Laulau, Sylvette, Mimie, Titi et tous les autres. Merci à Alex pour la poule au pot dans le jardin et la course de roulades.

Merci à tous les internes avec qui j'ai un jour partagé un verre : Gwendal, Thomas, Clémence, Mathieu, Arnaud, Béné, Alicia, Julianne, Ariane, Elisa...

Merci à Marine pour ces soirées de debrief intense et ces saucissons partagés.

Merci à mon Doudou (Eddy pour les intimes), à Sarou, Rémos, Clem, Suze, Paul, Wiwi, et tant d'autres pour ces années pharmas et ces retrouvailles semestrielles.

Merci au Chèvre Show pour cette bouffée d'été. Merci à Laurent qui m'a éduquée et à Francis, qui m'a dés-éduquée.

Merci à LéaAu d'exister dans ma vie. Merci à Yo et Triphon de m'avoir accueillie.

Merci à mes parents Pascale et Daniel, de m'avoir soutenue jusqu'au bout, dans les doutes, les larmes, la joie, les rires, et tout le temps.

Merci à ma sœur Laure pour tout ce que tu es et ce que tu représentes pour moi, tu es merveilleuse.

Merci à mon frère Quentin, dit Roupet, toi aussi tu es fantastique.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisées durant mon parcours professionnel, qui m'ont donné envie de devenir comme eux, ou qui m'ont montré ce que je ne voulais pas devenir.

Merci à tous ceux qui ont participé, à faire de moi ce que je suis.

TABLE DES MATIERES

Introduction	5
HTAP	5
Définition	5
Classification.....	7
Physiopathologie.....	8
Epidémiologie	10
Traitement de l'HTAP	10
HTAP iatrogène/induite par les toxiques	12
Inhibiteurs de protéines kinases.....	13
Objectif	16
Identification of cellular targets involved in PAH induced by PKI by a pharmacovigilance / pharmacodynamics analysis	17
Abstract	18
Introduction	19
Methods.....	19
1. Data sources.....	19
Pharmacovigilance database	19
Selection of cases	19
Selection of protein kinase inhibitors.....	20
Identification of protein kinases involved in PAH.....	20
Affinity data	20
Co-medication of interest.....	20
2. Analysis	20
Disproportionality analysis	20
Correlation analysis.....	20
Results	21

Selection of cases	21
Description of PAH cases	21
Identification of protein kinases involved in PAH.....	21
Disproportionality analysis	21
Correlation analysis.....	22
Co-medication analysis	23
Clusters.....	23
Temporal analysis	23
Discussion	25
Conclusion.....	27
References	27
Supplementary Material	30
Appendix 1. Details of co-reported Meddra term excluded from the analysis.....	31
Appendix 2. Most relevant references about the protein kinases of interest	33
Appendix 3. Results of sensitivity analysis	35
Appendix 4. Correlation analysis	36
Appendix 5. Results of the co-medication analysis of dasatinib PAH cases.	38
Discussion	40
Conclusion	45
Références	47

INDEX DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure a. Cathétérisme cardiaque droit	6
Tableau a. Définition hémodynamique de l'hypertension pulmonaire.....	6
Tableau b. Classification de l'HTP.....	7
Figure b. Physiopathologie de l'HTAP.....	9
Figure c. Cancer-like théorie de l'HTAP.....	10
Figure d. Les trois voies de traitement de l'HTAP.....	11
Tableau c. Traitement des HTAP.....	12
Tableau d. Les inhibiteurs de protéines kinases, cibles et indications	13
Figure 1. Forest plot of the disproportionality analysis of PAH induced by PKI.....	22
Figure 2. Manhattan plot synthetizing the correlation analysis.....	23
Figure 3. Results of the co-medication analysis between PAH and non-PAH cases related to dasatinib in Vigibase®.....	24
Figure 4. Clusters dendrogram of protein kinases inhibitors based on their affinity profile. ..	24
Figure 5. Proportion of reported PAH cases for 1000 reported adverse events per year.....	25
Figure S1. Flow chart of PAH cases selection for analysis	31
Figure S2. Identification of protein kinases involved in pulmonary function.	32
Table S1. Most relevant references about target of interest	33
Figure S3. Disproportionality signal of PAH induce by PKI from the first five years after FDA approval versus all medication in pharmacovigilance database.....	35
Table S2. Correlation and p-value of all sensitivity analysis.....	36
Table S3. Result of co-medication analysis	38
Figure e. Targeting the kinome: bosutinib versus dasatinib.....	43
Figure f. Data mining in pharmacovigilance.....	44

LISTE DES ABREVIATIONS

DCI : Dénomination commune internationale

FDA : Food and Drug administration

HCP : hémangiomatose capillaire pulmonaire

HTAP: Hypertension artérielle pulmonaire

PAH : Pulmonary arterial hypertension

HTAPP : hypertension artérielle pulmonaire
persistante du nouveau-né

HTP : Hypertension pulmonaire

PHT : Pulmonary Hypertension

HTPC : HTP thromboembolique chronique

IPK: Inhibiteurs de protéines kinases

PKI : Protein Kinase Inhibitor

LMC : leucémie myéloïde chronique

CML: chronic myeloid leukemia

MeSH: Medical Subject Heading

MVO : maladies veino-occlusives

PAPm : pression artérielle pulmonaire moyenne

PAPm : mean Pulmonary arterial pressure

PAPo : pression artérielle pulmonaire d'occlusion

PAWP: pulmonary arterial wedge pressure

ROR: Reported Odds Ratio

RCP : Résumé des caractéristiques du produit

UW : unité Wood

WU: Wood unit

Identification de cibles cellulaires impliquées dans l'Hypertension artérielle pulmonaire, induite par les Inhibiteurs de Protéines Kinases par une analyse de pharmacovigilance / pharmacodynamie.

Introduction

HTAP

Définition

Les dernières recommandations relatives aux définitions, à la classification, au diagnostic et au traitement des patients atteints d'hypertension pulmonaire (HTP) ont été conjointement publiées par la Société européenne de cardiologie (European Society of Cardiology, ESC) et la Société européenne respiratoire (European Respiratory Society, ERS) en 2015 (Galiè et al., 2016). Ces mises à jour succèdent aux deux premières recommandations publiées en 2004 et 2009.

La définition hémodynamique de l'hypertension pulmonaire est basée sur l'élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au-dessus de 25 mmHg (valeurs normales au repos = 14 ± 3 mmHg, et valeurs limite haute = 20 mmHg) mesurée par cathétérisme cardiaque droit. Le cathétérisme cardiaque droit est un examen invasif, permettant d'explorer les cavités cardiaques droites afin de mesurer les pressions de l'oreillette droite, du ventricule droit, de l'artère pulmonaire et des capillaires pulmonaires. Il consiste en l'introduction d'un cathéter relié à un manomètre jusqu'à une artère pulmonaire (Figure a).

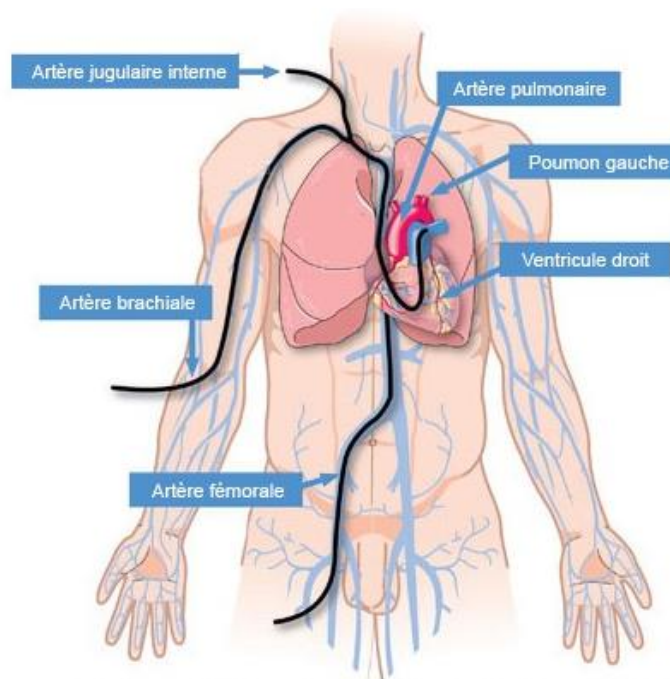


Figure a. Cathétérisme cardiaque droit

La distinction entre l’HTP pré-capillaire et post-capillaire est faite par la mesure de la pression artérielle pulmonaire d’occlusion (PAPO ou PAWP pulmonary arterial wedge pressure) ≤ 15 mmHg pour une HTP précapillaire ou > 15 mmHg pour une HTP postcapillaire (Tableau a).

Tableau a. Définition hémodynamique de l’hypertension pulmonaire

Table 3 Haemodynamic definitions of pulmonary hypertension^a

Definition	Characteristics ^a	Clinical group(s) ^b
PH	PAPm ≥ 25 mmHg	All
Pre-capillary PH	PAPm ≥ 25 mmHg PAWP ≤ 15 mmHg	1. Pulmonary arterial hypertension 3. PH due to lung diseases 4. Chronic thromboembolic PH 5. PH with unclear and/or multifactorial mechanisms
Post-capillary PH	PAPm ≥ 25 mmHg PAWP > 15 mmHg	2. PH due to left heart disease 5. PH with unclear and/or multifactorial mechanisms
Isolated post-capillary PH (Ipc-PH)	DPG < 7 mmHg and/or PVR ≤ 3 WU ^c	
Combined post-capillary and pre-capillary PH (Cpc-PH)	DPG ≥ 7 mmHg and/or PVR > 3 WU ^c	

CO = cardiac output; DPG = diastolic pressure gradient (diastolic PAP – mean PAWP); mPAP = mean pulmonary arterial pressure; PAWP = pulmonary arterial wedge pressure; PH = pulmonary hypertension; PVR = pulmonary vascular resistance; WU = Wood units.

^aAll values measured at rest; see also section 8.0.

^bAccording to Table 4.

^cWood Units are preferred to $\text{dynes}\cdot\text{cm}^{-5}$.

Classification

La classification de l'HTP vise à définir cinq groupes homogènes en regroupant plusieurs conditions physiopathologiques selon leurs présentations cliniques, leurs caractéristiques hémodynamiques et leurs traitements (Tableau b).

Tableau b. Classification de l'HTP

Table 4 Comprehensive clinical classification of pulmonary hypertension (updated from Simonneau et al.⁵)

I. Pulmonary arterial hypertension
<ul style="list-style-type: none"> I.1 Idiopathic I.2 Heritable <ul style="list-style-type: none"> I.2.1 BMPR2 mutation I.2.2 Other mutations I.3 Drugs and toxins induced I.4 Associated with: <ul style="list-style-type: none"> I.4.1 Connective tissue disease I.4.2 Human immunodeficiency virus (HIV) infection I.4.3 Portal hypertension I.4.4 Congenital heart disease (Table 6) I.4.5 Schistosomiasis
1'. Pulmonary veno-occlusive disease and/or pulmonary capillary haemangiomatosis
<ul style="list-style-type: none"> 1'.1 Idiopathic 1'.2 Heritable <ul style="list-style-type: none"> 1'.2.1 EIF2AK4 mutation 1'.2.2 Other mutations 1'.3 Drugs, toxins and radiation induced 1'.4 Associated with: <ul style="list-style-type: none"> 1'.4.1 Connective tissue disease 1'.4.2 HIV infection
1''. Persistent pulmonary hypertension of the newborn
2. Pulmonary hypertension due to left heart disease
<ul style="list-style-type: none"> 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 2.5 Congenital /acquired pulmonary veins stenosis
3. Pulmonary hypertension due to lung diseases and/or hypoxia
<ul style="list-style-type: none"> 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 (Web Table III)
4. Chronic thromboembolic pulmonary hypertension and other pulmonary artery obstructions
<ul style="list-style-type: none"> 4.1 Chronic thromboembolic pulmonary hypertension 4.2 Other pulmonary artery obstructions <ul style="list-style-type: none"> 4.2.1 Angiosarcoma 4.2.2 Other intravascular tumors 4.2.3 Arteritis 4.2.4 Congenital pulmonary arteries stenoses 4.2.5 Parasites (hydatidosis)
5. Pulmonary hypertension with unclear and/or multifactorial mechanisms
<ul style="list-style-type: none"> 5.1 Haematological disorders: chronic haemolytic anaemia, 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: pulmonary tumoral thrombotic microangiopathy, fibrosing mediastinitis, chronic renal failure (with/without dialysis), segmental pulmonary hypertension

BMPR2 = bone morphogenetic protein receptor, type 2; EIF2AK4 = eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4; HIV = human immunodeficiency virus.

Le groupe 1 caractérise les HTAP pour lesquelles les changements pathologiques affectent préférentiellement les artères pulmonaires distales (<500 µm). L'hypertension artérielle pulmonaire regroupe les HTAP idiopathiques, héritable, induites par des médicaments / toxiques, et les HTAP associées aux connectivites, au VIH, à l'hypertension portale, aux maladies cardiaques congénitales et aux schistosomiasis. Le groupe 1' inclut principalement les maladies veino-occlusives (MVO) pulmonaires et hémangiomatoses capillaires pulmonaires (HCP) et le groupe 1'' regroupe les hypertensions artérielles pulmonaires persistantes du nouveau-né (HTAPP).

Le groupe 2 décrit les HTP associées à une pathologie du cœur gauche, le groupe 3 caractérise les HTP liées aux maladies pulmonaires chroniques et/ou à l'hypoxie et le groupe 4 se rapporte aux HTP thromboembolique chronique (HTPC) impliquant une obstruction chronique des artères pulmonaires. Le groupe 5 caractérise les HTP de mécanisme incertain ou multifactoriel (Galiè et al., 2016).

La définition de l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP, groupe 1 de la classification impliquant les HTAP iatrogènes) inclut une résistance vasculaire pulmonaire (RVP) de > 3 unités Wood (UW). Ce qui permet de la distinguer des situations entraînant une augmentation de la PAPm par élévation du débit cardiaque sans remodelage vasculaire pulmonaire spécifique.

Le terme HTAP désigne ainsi un sous-groupe de patients présentant

- pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) ≥ 25 mmHg
- une HTP précapillaire (PAPO ou PAWP) ≤ 15 mmHg
- et une élévation des résistances vasculaires pulmonaires (RVP > 3 UW),
- en l'absence d'autres causes d'HTP précapillaire (maladies respiratoires chroniques et l'HTP thromboembolique chronique).

Physiopathologie

La physiopathologie de l'HTAP reste encore incertaine, plusieurs concepts émergent quant aux origines de cette pathologie. L'origine semble multifactorielle avec l'intervention de multiples voies dérégulées. Un aspect génétique est retrouvé avec la découverte de nombreuses mutations permissives mais non suffisantes de la maladie. Une dysfonction endothéliale associée à une augmentation de l'inflammation et une vasoconstriction semble également intervenir (Figure b).

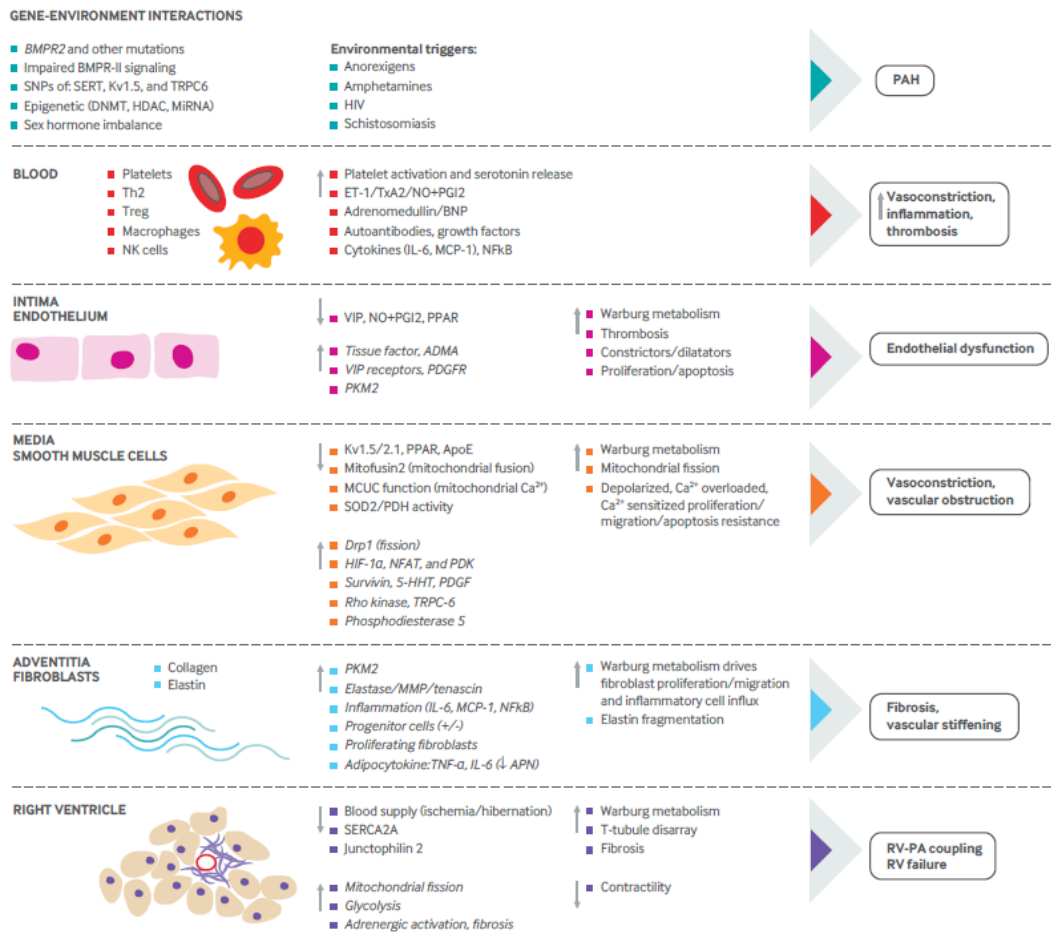


Fig 7 | Mechanisms implicated in pathogenesis of pulmonary arterial hypertension (PAH). PAH is a panvasculopathy, meaning that all layers of the vascular wall are involved. PAH is also reflective of gene environment interactions and has important genetic and epigenetic mechanisms. This figure shows abnormalities in the gene and environment, blood, and each layer of the pulmonary artery, from intima (endothelial cells), to media (pulmonary arterial smooth muscle cells—PASMCS) to adventitia (fibroblasts). Because of the many reports that inform this composite figure, individual sources for the information are not referenced. The normal state is shown on the left side, the abnormalities that occur in PAH are highlighted in the middle section, and the consequences of these abnormalities are shown on the right. The net effect of these abnormalities is a state of vasoconstriction and inflammation, thrombosis with a hyperproliferative, apoptosis resistant PSMC population, which promotes vasoconstriction and vascular obstruction, and excessive fibrosis, which reduces vascular compliance. These vascular changes ultimately increase right ventricular (RV) afterload and impair RV-pulmonary artery coupling, leading to RV failure. 5-HHT=5 hydroxytryptamine; ADMA= asymmetric dimethylarginine; APN= adiponectin; BMPR2= bone morphogenetic protein receptor 2; BNP= brain natriuretic peptide; Ca²⁺=calcium; DNMT= DNA methyltransferase; Drp-1= dynamin related protein 1; ET1= endothelin; HDAC= histone deacetylase; HIF= hypoxia inducible factor; IL= interleukin; MCP-1= monocyte chemoattractant protein-1; MCUC= mitochondrial calcium uniporter complex; miRNA= micro RNA; MMP= matrix metalloproteinase; NFAT= nuclear factor of activated T cells; NF-κB= nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells; NK= natural killer cells; NO= nitric oxide; PDGFR= platelet derived growth factor receptor; PDGR= platelet derived growth factor; PDH= pyruvate dehydrogenase; PDK= pyruvate dehydrogenase kinase; PGI2= prostacyclin; PKM-2= pyruvate kinase M2; PPAR= peroxisome proliferator activated receptor; SERCA= sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase; SERT= serotonin transporter; SNP= single nucleotide polymorphism; SOD= superoxide dismutase; Th2= T helper cells; TNF= tumor necrosis factor; TRPC= transient receptor potential cation channel; T-reg= regulatory T cells; TxA2= thromboxane A2; VIP= vasoactive intestinal peptide

Figure b. Physiopathologie de l'HTAP. Extrait de Thenappan et al., 2018

Un parallèle avec le phénotype de cancer a également été réalisé (cancer-like theory ou théorie du cancer) associant remodelage vasculaire et prolifération cellulaire associée à une dérégulation de l'apoptose de l'endothélium vasculaire (Figure c. Boucherat et al., 2017).

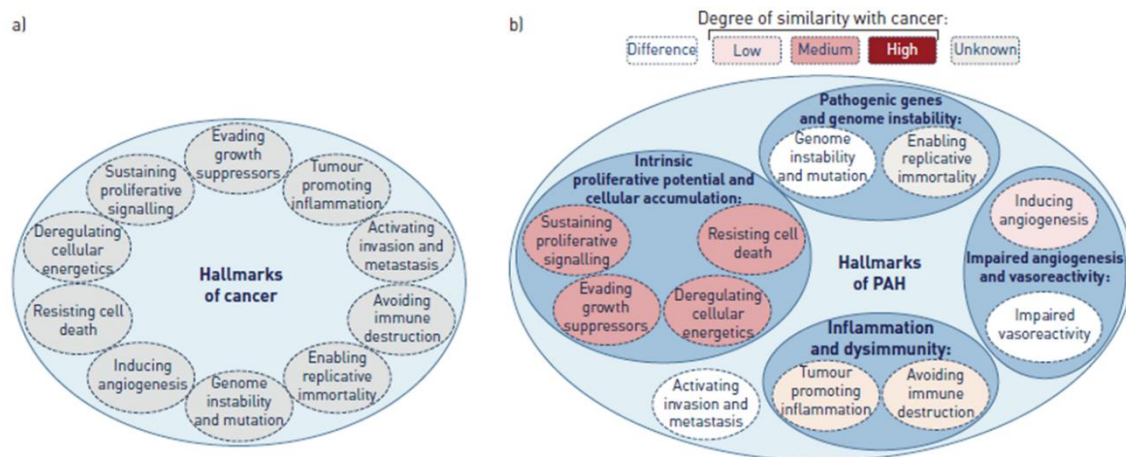


FIGURE 1 The “hallmarks of cancer” proposed by HANAHAN and WEINBERG [20, 21]. a) The six hallmark capabilities originally proposed in 2000 together with the four additional hallmarks proposed in 2011. b) Although pulmonary arterial hypertension (PAH) shares several cancer capabilities, the degree of similarity varies. Furthermore, these capabilities can be markedly different to those observed in cancer; in particular, neither invasion nor metastasis has been observed in PAH. In addition, these features found in PAH also appear to contribute to the disease pathogenesis with different levels of importance.

Figure c. Cancer-like théorie de l’HTAP. Extrait de Guignabert et al., 2013

Epidémiologie

La prévalence de l’HTP atteint 97 cas par million de personnes avec un ratio femme/homme de 1,8. La prévalence de l’HTAP représente quant à elle 15 à 60 cas par million de personne (Galiè et al., 2016). L’HTAP peut être idiopathique (30 à 50%) incluant 15 à 20% de forme héritable, liées aux connectivites (15 à 30%), au VIH (1 à 6,2%), aux maladies cardiaques congénitales (10 à 43%) ou iatrogènes (3 à 9,5%) avec une distinction selon la zone géographique (Prins and Thenappan, 2016 ; Lau et al., 2017).

Traitement de l’HTAP

Actuellement, le traitement de l’HTAP repose sur trois approches thérapeutiques :

- Les mesures générales incluant l’activité physique, la réhabilitation, l’immunisation contre la grippe et le pneumocoque et les soins de soutiens (anticoagulants oraux, diurétiques, oxygénothérapie)
- Les traitements pharmacologiques de l’HTAP incluent plusieurs classes thérapeutiques (Figure d) :

- Les antagonistes des récepteurs à l'endothéline (ambrisentan, bosentan, macitentan) reversent la vasoconstriction et les effets mitogènes de l'endothéline sur les tissus pulmonaires des patients.
- Les inhibiteurs de la phosphodiésterase-5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil) et un stimulateur direct de la guanylate cyclase soluble (riociguat) induisent une vasodilatation via la voie monoxyde d'azote (NO) / GMPc.
- Les analogues de la prostacycline (betaprost, epoprostenol, iloprost, treprostnil) et les agonistes des récepteurs IP aux prostacyclines (selexipag) entraînent une vasodilatation du lit vasculaire (Hoepfer et al., 2016; Galiè et al., 2016).

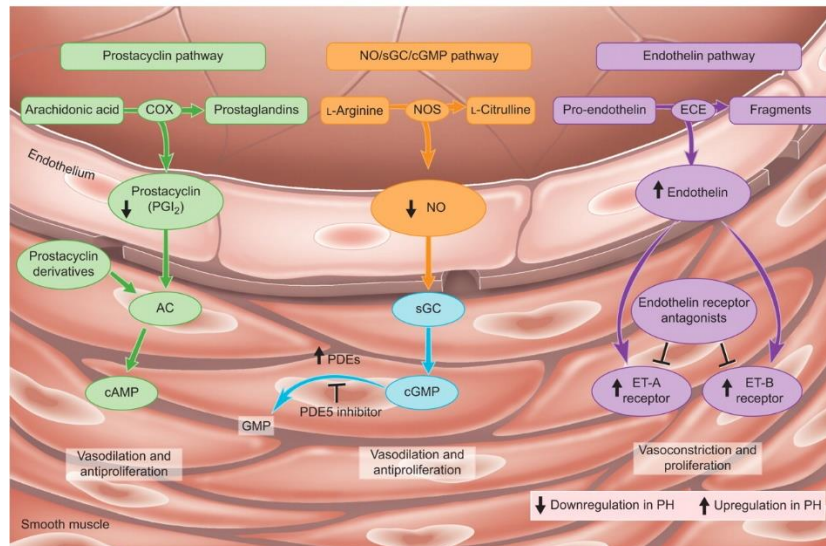


Figure d. Les trois voies de traitement de l'HTAP. Extrait de Humbert, 2010

De fortes doses d'inhibiteurs calciques sont également utilisées chez les patients répondeurs, dans le cadre d'HTAP idiopathique. Étonnamment, certains IPK ont été testés comme traitement des HTAP (Mucke, 2013; Kimura et al., 2017). De nouvelles molécules telles que l'olaparib (PARP-1 inhibiteurs), l'anakinra (inhibiteur de l'interleukine-1alpha et -12beta), le fulvestrant (antagoniste compétitif des récepteurs aux estrogènes) ou le fasudil (Rho-kinase inhibiteur utilisé pour favoriser l'apoptose cellulaire) sont en cours d'essais tandis que d'autres ont été arrêtés à cause de résultats décevants (ubenix, cicletanine). De nouvelles approches

telles que la combinaison de thérapeutiques ou l'utilisation de nouvelles molécules agissant sur les voies de signalisation de l'HTAP sont également en cours d'investigation (Vaidya et al., 2017).

Tableau c. Traitement des HTAP

Spécialité	DCI	mode d'action
UPTRAVI	selexipag	Agoniste sélectif du récepteur de la prostacycline (IP)
EPOPROSTENOL	epoprostenol	Analogues des prostaglandines
FLOLAN		
REMODULIN	treprostinil	
VELETRI	epoprostenol	
VENTAVIS	iloprost	
BOSENTAN	bosentan	Antagonistes des récepteurs de l'endothéline
TRACLEER		
VOLIBRIS	ambrisentan	
ADCIRCA	tadalafil	Inhibiteurs de la phosphodiesterase 5
MYSILDECARD	sildenafil	
REVATIO		
REVATIO		
TADALAFIL	tadalafil	
ADEMPAS	riociguat	Stimulateur direct de la guanylate cyclase soluble (sGC)
INOMAX	monoxyde d'azote	Vasodilatateur par relaxation des muscles lisses par activation de la guanylate cyclase
KINOX		
MONOXYDE D'AZOTE		
NOXAP		

HTAP iatrogène/induite par les toxiques

Plusieurs molécules sont connues pour induire des HTAP. Les amphétamines et leurs dérivés, tels que l'aminorex, la fenfluramine, la dexfenfluramine, le benfluorex, la phentermine, et le mazindol, ainsi que les interférons alpha et beta sont connus pour induire des HTAP. Plus récemment, un lien entre le dasatinib et la survenue de modifications vasculaires réversibles a été mis en évidence, suite à plusieurs cas d'HTAP attribués à cet inhibiteur multikinase indiqué dans la leucémie myéloïde chronique (Quintás-Cardama et al., 2007) ; (Mattei et al., 2009). Par la suite, des cas d'HTAP ont été décrits avec d'autres IPK, comme le bosutinib, le ponatinib ou le lapatinib, cependant la physiopathologie reste incertaine (Weatherald et al., 2017).

Inhibiteurs de protéines kinases

Les inhibiteurs de protéines kinases sont des petites molécules conçues pour interférer avec une cible moléculaire spécifique qui jouerait un rôle crucial dans la croissance ou la progression tumorale (Sawyers, 2004). De nombreuses molécules sont maintenant approuvées dans plusieurs maladies. Chaque IPK se lie à un profil unique de cibles moléculaires plus ou moins sélectives sur PK d'intérêt.

Tableau d. Les inhibiteurs de protéines kinases, cibles et indications

DCI	Specialité	Laboratoire	Date d'autorisation par la FDA	Cible d'action selon les RCP (Résumé de caractéristique du produit)	Indications
Afatinib	GIOTRIF	Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals	12-Jul-2013	ErbB - EGFR (ErbB1=HER1) - HER2 (ErbB2) - ErbB3 - ErbB4	cancer bronchique non à petites cellules
Axitinib	INLYTA	Pfizer	27-Jan-2012	VEGFR - VEGFR-1 - VEGFR-2 - VEGFR-3	adénocarcinome rénal
Bosutinib	BOSULIF	Pfizer	4-Sep-2012	Bcr-Abl Src, Lyn, Hck PDGF c-kit c-Fms EphA et B Trk, Axl et Tec ErbB Csk Ste20 PK dépendantes de la calmoduline.	Leucémie myéloïde chronique
Cabozantinib	CABOMETYX	Ipsen	29-Nov-2012	MET VEGF GAS6 (AXL), RET, ROS1, TYR03, MER KIT, TRKB Fms-3 (FLT3) TIE-2.	adénocarcinome rénal carcinome thyroïdien
Ceritinib	ZYKADIA	Novartis	29-Apr-2014	ALK	cancer bronchique non à petites cellules
Cobimetinib	COTELLIC	Roche	10-Nov-2015	MEK1 et MEK2	mélanome

Crizotinib	XALKORI	Pfizer	26-Aug-2011	ALK RTK HGFR, c-Met ROS1 (c-ros) (RON) RTK	cancer bronchique non à petites cellules
Dabrafenib	TAFINLAR	GlaxoSmithKline, Pharmaceuticals	29-May-2013	RAF RAS/RAF/MEK/ERK	cancer bronchique non à petites cellules mélanome malin
Dasatinib	SPRYCEL	Bristol-Myers Squibb Co	28-Jun-2006	BCR-ABL SRC family (LYN, HCK) c-KIT EPH PDGFbeta	Leucémie myéloïde chronique
Erlotinib	TARCEVA	Roche	18-Nov-2004	EGFR (ErbB1=HER1)	cancer bronchique non à petites cellules cancer du pancréas
Gefitinib	IRESSA	AstraZeneca	1-Jan-2003	EGFR (ErbB1=HER1)	cancer bronchique non à petites cellules
Ibrutinib	IMBRUVICA	Janssen Cilag	13-Nov-2013	BTK	Leucémie myéloïde chronique
Imatinib	GLIVEC	Novartis	1-Jan-2001	Bcr-Abl Kit DDR1 -DDR2 CSFR1 PDGFalpha, beta	Leucémie myéloïde chronique
Lapatinib	TYVERB	Novartis	13-Mar-2007	ErbB - EGFR (ErbB1=HER1) - HER2 (ErbB2)	cancer du sein
Lenvatinib	LENVIMA	Eisai	13-Feb-2015	VEGF - VEGFR1 (FLT1) - VEGFR2 (KDR) - VEGFR3 (FLT4) FGF - FGFR1, 2, 3 et 4 PDGF - PDGFR alpha KIT RET	carcinome thyroïdien
Lestaurtinib		Teva Pharmaceutical Industries (Cephalon)	1-Oct-2003	FLT3	Leucémie myéloïde chronique

Lorlatinib		Pfizer	1-Oct-2016	ALK/ROS1	cancer bronchique non à petites cellules
Nilotinib	TASIGNA	Novartis Pharmaceuticals Corporation	29-Oct-2007	Bcr-Abl PDGFR Kit Ephrine	Leucémie myéloïde chronique
Osimertinib	TAGRISSE	AstraZeneca Pharmaceuticals	13-Nov-2015	EGFR muté : -EGFRm et T790M	cancer bronchique non à petites cellules
palbociclib	IBRANCE	Pfizer	3-Feb-2015	CDK4/6	cancer du sein
Pazopanib	VOTRIENT	GlaxoSmithKline, Pharmaceuticals	19-Oct-2009	VEGFR-1, VEGFR-2 VEGFR-3 PDGFR- α et PDGFR- β c-KIT	carcinome rénal
Ponatinib	ICLUSIG	Ariad pharmaceuticals	11-Dec-2012	Bcr-Abl RET, FLT3 et KIT FGFR, PDGFR, VEGFR.	Leucémie myéloïde chronique
Regorafenib	STIVARGA	Bayer HealthCare Pharmaceuticals	27-Sep-2012	VEGFR1, 2, 3 TIE2 KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAFV600E PDGFR FGFR CSF1R	cancer colorectal GIST (tumeurs stromales gastro-intestinales) carcinome hépatocellulaire
Ruxolitinib	JAKAVI	Novartis	16-Nov-2011	JAK1 et JAK2	myélofibrose (MF) et maladie de Vaquez
Sorafenib	NEXAVAR	Bayer HealthCare Pharmaceuticals	20-Dec-2005	CRAF, BRAF, V600E BRAF, c-KIT, et FLT-3) VEGFR-2, VEGFR-3, et PDGFR-bêta c-KIT, FLT-3	carcinome rénal
Sunitinib	SUTENT	Pfizer	26-Jan-2006	PDGFR alpha et bêta VEGFR1/2/3 KIT FLT3 CSF-1R RET	GIST, carcinome rénal, cancer du pancréas

Trametinib	MEKINIST	GlaxoSmithKline, Pharmaceuticals	29-May-2013	MEK1 et MEK2	cancer bronchique non à petites cellules mélanome malin
Vandetanib	CAPRELSA	AstraZeneca, Pharmaceuticals	6-Apr-2011	VEGFR-2 VEGFR-23 EGFR RET	carcinome thyroïdien
Vemurafenib	ZELBORAF	Genentech	17/08/2011	BRAF	mélanome malin

Objectif

Nous avons cherché à identifier les cibles cellulaires impliquées dans la physiopathologie des HTAP induites par les IPK, via une analyse de corrélation entre l'affinité des IPK sur certaines cibles impliquées dans la physiologie de l'HTAP, et les signaux de disproportionnalité, calculés à partir de la base mondiale de pharmacovigilance.

Identification of cellular targets involved in Pulmonary Arterial Hypertension induced by Protein Kinase Inhibitors by a pharmacovigilance / pharmacodynamics analysis.

Abstract

Pulmonary arterial hypertension (PAH) remains a rare and incurable, life-threatening disease, induced by several etiologies. Few drugs are known to induce PAH. Among them, the multi tyrosine kinase inhibitor dasatinib was recently linked to PAH followed by some other protein kinases inhibitors (PKI) (e.g. bosutinib, ponatinib, nilotinib). Nevertheless the pathophysiology of PAH induced by PKI remains unclear. To gain knowledge into this rare and severe pathology we performed a study combining a pharmacovigilance approach (disproportionality analysis on the WHO pharmacovigilance database) and the pharmacodynamics properties of PKI. A positive disproportionality signal was found for dasatinib, bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, nilotinib and imatinib. Four non-receptors proteins kinase disclosed a significant correlation with the development of PAH: c-src ($r= 0.85$ and $p= 0.00003$), c-yes ($r= 0.82$ and $p= 0.00012$), Lck ($r= 0.8$ and $p= 0.00038$) and Lyn ($r= 0.80$ and $p= 0.00023$), all belonging to the SRC family kinases. Kinases of the BMP signaling seems also to play a role in the pathophysiology of PAH induced by PKI. Moreover, a co-medication analysis revealed that diuretics, insulins, statins and antihypertensive drugs are more frequently associated in dasatinib PAH cases compared to other adverse event cases. Interestingly, the dasatinib profile seems different from other PKI in the results of the cluster analysis. Consistently and based on in vitro and in vivo findings, PKI increase the risk of developing PAH but require a comparable genetic, epigenetic or environmental “second hit”. This is to our knowledge, the first pharmacovigilance analysis which investigate the risk of PAH associated with PKI. The study highlights the role of SRC protein kinases family in PAH induced by PKI. This approach combining pharmacovigilance and pharmacodynamics data allowed us to generate some hypothesis about the pathophysiology of the disease, however the results have to be confirmed by further studies. Overall, this study contributes to a better understanding of PAH induced by PKI.

Introduction

Pulmonary hypertension (PH) is defined as an increase in mean arterial pressure (PAPm) ≥ 25 mmHg assessed by right heart catheterization (RHC) (1). Pathophysiology is characterized by remodeling processes through an increased migration and proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells leading to vascular remodeling (2). The classification proposed by the Fifth World Symposium on Pulmonary Hypertension defines five groups of different pathological features which characterize the diverse clinical PH groups (3). Group 1 characterize pulmonary arterial hypertension (PAH). PAH has multifactorial pathobiology leading to pulmonary remodeling of pulmonary arteries (4). PAH may be idiopathic (30-50%) including 15-20% of heritable PAH, associated with conditions like connective tissue disease (15-30%), HIV infection (1-6.2%), congenital heart disease (in 10-43%) or drug and toxin induced (3-9.5%) with worldwide distinctions (5,6). Among drug induced PAH, the multi tyrosine kinase inhibitor dasatinib was recently linked to PAH (5,6). Several other cases reported induction or aggravation of PAH with several protein kinases inhibitors (PKI) such as ponatinib, bosutinib, and lapatinib but the pathophysiology remains unclear (7). To gain knowledge into this rare and severe adverse event we performed a study mixing a pharmacovigilance approach and pharmacodynamics properties of PKI. We used a disproportionality analysis from pharmacovigilance data of the WHO pharmacovigilance database Vigibase as a proxy of the risk of ADR (8). In a second step we identified cellular target of interest

through a systematic literature review. Finally, we correlated the pharmacovigilance signals with the affinity for the different PKI.

Methods

1. Data sources

Pharmacovigilance database

VigiBase® is the WHO (World Health Organization) global database of individual case safety reports (ICSRs). This database contained at the time of extraction approximately 16 million reports of suspected adverse effects of medicines, from more than 150 countries since 1968. VigiBase® provide ICSRs with patient information such as gender, age, medical history, country, drug and concomitant drug taken with chronological information, indication of the drug, adverse effects and its severity and outcomes.

Selection of cases

We use the standardized High Level Term (HLT) “Pulmonary Hypertensions” of MedDRA (Medical Dictionary for Regulatory Activities) terminology to identify PH cases from Vigibase®. To select drug induced type 1 PAH we excluded all ICSRs of PH associated with cardiac, pulmonary or thrombotic disorders, connective tissue disease, HIV infection, congenital heart disease or schistosomiasis. Details are available on supplementary appendix 1.

Then, ICSRs containing drugs or toxins known to induce PAH (aminorex, fenfluramine, dexfenfluramine, benfluorex, amphetamines (dexamfetamine), phentermine, mazindol, and IFN alpha and beta) were also excluded.

Selection of protein kinase inhibitors

To get enough data on each PKI, we included in the analysis PKI with more than 100 reports in the WHO pharmacovigilance database between January 1st 2002 and December 31 2017: Afatinib, Alectinib, Axitinib, Bosutinib, Cabozantinib, Ceritinib, Cobimetinib, Crizotinib, Dabrafenib, Dasatinib, Erlotinib, Gefitinib, Ibrutinib, Imatinib, Lapatinib, Lenvatinib, Lestaurinib, Osimertinib, Nilotinib, Palbociclib, Pazopanib, Ponatinib, Regorafenib, Ruxolitinib, Sorafenib, Sunitinib, Trametinib, Vandetanib and Vemurafenib.

Identification of protein kinases involved in PAH

Cellular targets of interest involved in PAH pathophysiology were identified through a systematic literature review in Medline with the Medical Subject Headings ("Familial Primary Pulmonary Hypertension"[Mesh]) AND "Protein Kinases"[Mesh].

Affinity data

Affinity data for the targets of interest were extracted from the IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY 2018 developed by the « International Union of Basic and Clinical Pharmacology » and the « British Pharmacological Society » (9).

Co-medication of interest

To better characterize patient profiles at risk of developing PAH, we extracted all drugs other than PKI associated with dasatinib ICSRs. Then we compared the proportion of cases associated with some drug classes of interest (e.g. diuretics, beta-blockers, calcium antagonists, statin, proton pump

inhibitors, insulins, corticoids, bronchodilators, ACEi/ARB) between PAH cases and all other adverse events.

2. Analysis

Disproportionality analysis

We first performed a disproportionality analysis with the Reporting Odds Ratio (ROR) method for each PKI of interest considered as suspect or concomitant (10). We compared the proportion of PAH reported for each PKI with the proportion of PAH associated with all other drugs used as non-cases. The cut-off for signal detection was defined as a ROR lower boundary 95% confidence interval greater or equal to 1 and number of cases (n) greater or equal to 3. Results are expressed as ROR (95% CI). We also performed a temporal analysis to assess the influence of media safety alerts on reporting rate of PAH among reported adverse events.

Correlation analysis

To assess the link between the identified cellular targets of interest and pharmacovigilance signals, we calculated the Pearson correlation coefficients (r) using pKd, (negative logarithm of the dissociation constant Kd) and ROR.

We assumed that higher the affinity for the cellular target was, higher was the 'risk' of drug-induced PAH. From multiple comparisons, the threshold P-value of the test was adapted using a Bonferroni correction (11).

Secondary analyses were performed to assess the robustness of the results: i) A sensitivity analysis excluding PKI which had less than 3 cases of PAH; ii) standardizing

the time on the market of the different PKI at six years after FDA approval date, corresponding to the time between dasatinib approval and the first published safety alert; iii) performing the correlation analysis among PKI used in hematological pathologies.

Finally, we performed a hierarchical cluster analysis to assess the similarity among receptor binding affinity profile of the included PK.

All analyses were performed using R statistical software (version 3.2.3).

Results

Selection of cases

To December 31 2017, among more than 16 million ADR were reported in Vigibase®, a total of 286 834 ICSRs were related to the 29 selected PKI (suspected or concomitant). Among them, 733 cases of pulmonary hypertension were extracted. The exclusion of cases associated with other PAH etiologies and concomitant drugs led to 482 final ICSRs included in the analysis (Figure S1).

Description of PAH cases

482 cases of PAH were included in analysis, 222 were women (44.2%), 230 men (45.8%) and 50 had an unknown status (10%). The mean age was 58.2 ± 16.1 years (median = 60) with 58.6 ± 15.1 years for women and 58.02 ± 16.2 years for men. Among 78 cases, a pleural effusion was associated with PAH

(15.5%). PAH emerged approximately 28 months after beginning of PKI (data available for 197 ICSRs, 6 months for bosutinib, 24 months for dasatinib, 14 months for nilotinib, 10 months for ponatinib and 21 months for ruxolitinib).

Identification of protein kinases involved in PAH

36 PKs involved in PAH pathophysiology were identified through the literature review (Figure S2): ALK1/5, AMPKa1/2, BMPR-1/2, B-Raf, c-yes, DDR1, EIF2K4, ERB-b1, FAK, FGFR1/2, HER2, IGF-1R, JAK1/2, JNK1/2, KIT, Lck, Lyn, HGF, p38MAPK, PDGFR α/β , PKG, RAF1, ROCK-2, Src, TEC, TIE2, and VEGFR-1/2/3. Most relevant references about target of interest are reported in Appendix 2.

Disproportionality analysis

A positive disproportionality signal was found for dasatinib, bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, nilotinib and imatinib, with a ROR of 28.55 (25.53, 31.93), 13.43 (8.65, 20.87), 3.73 (1.86, 7.46), 3.71 (2.44, 5.65), 3.39 (2.43, 4.73), and 1.97 (1.50, 2.57) respectively. ROR are represented in Figure 1. Results of the sensibility analysis (standardizing on time on the market) are presented in Supplementary Material (Appendix 3. Figure S3). The results were consistent with the main analysis except for imatinib, indeed the signal for imatinib disappeared in the sensibility analysis standardizing on time on the market.

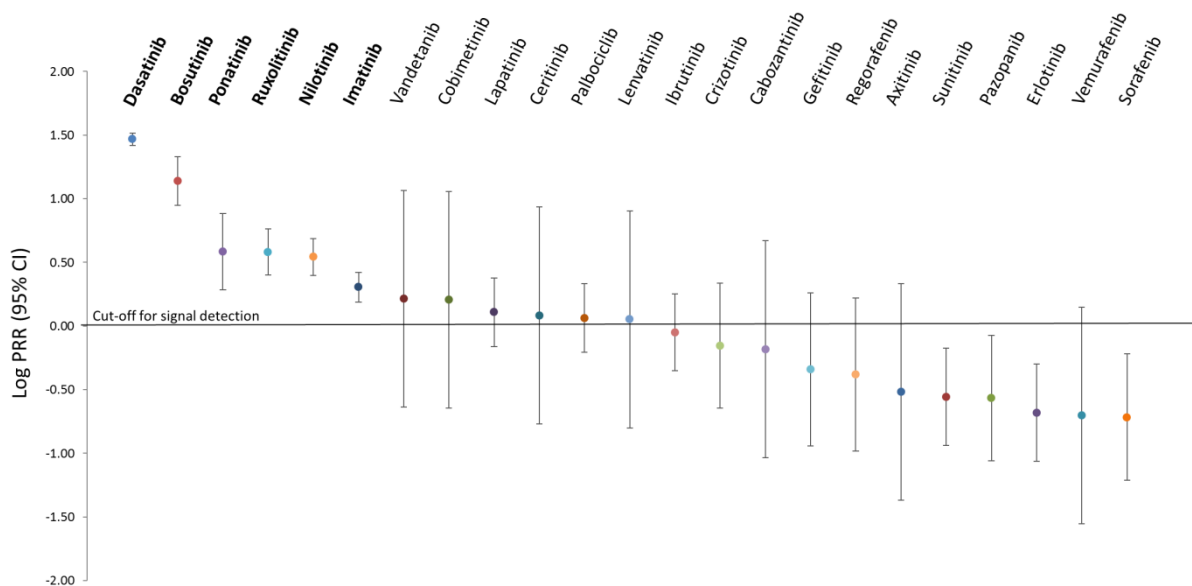


Figure 1. Forest plot of the disproportionality analysis of PAH induced by PKI showing the ROR (95% CI) for included PKI. Results were log transformed for drawing purpose. PKI associated with positive disproportionality signals are triangle, others are circles and PKI without PAH cases are lines.

Correlation analysis

Correlation results are presented in Figure 2. Four non-receptors proteins kinase disclosed a significant correlation with the development of PAH: c-src ($r = 0.85$ and $p = 0.00003$), c-yes ($r = 0.82$ and $p = 0.00012$), Lck ($r = 0.8$ and $p = 0.00038$) and Lyn ($r = 0.80$ and $p = 0.00023$). Proportion of variance (r^2) explained by the model were respectively 0.72, 0.67, 0.64 and 0.64 for c-src, c-yes, Lck and Lyn. In sensitivity analysis (see Appendix 4) standardizing the time on the market of the different PKI at six years ($r_{c-src} = 0.88$, $r_{c-yes} = 0.83$, $r_{Lyn} = 0.83$ and $r_{Lck} =$

0.82) and including only PKI which had more than 3 cases of PAH ($r_{c-src} = 0.89$, $r_{c-yes} = 0.87$, $r_{Lyn} = 0.85$) showed comparative result of correlation with a high but non-significant correlation for Lck ($r_{Lck} = 0.82$; $p = 0.0037$). In sensitivity analysis including only PKI used in hematology the SRC family protein kinases remained highly correlated ($r_{c-src} = 0.92$, $r_{c-yes} = 0.94$, $r_{Lyn} = 0.87$) but non-significantly. Similarly, ALK5, TEC and HER2 were also highly correlated ($r = 0.99$, 0.97 and 0.96) with non-significant p-values.

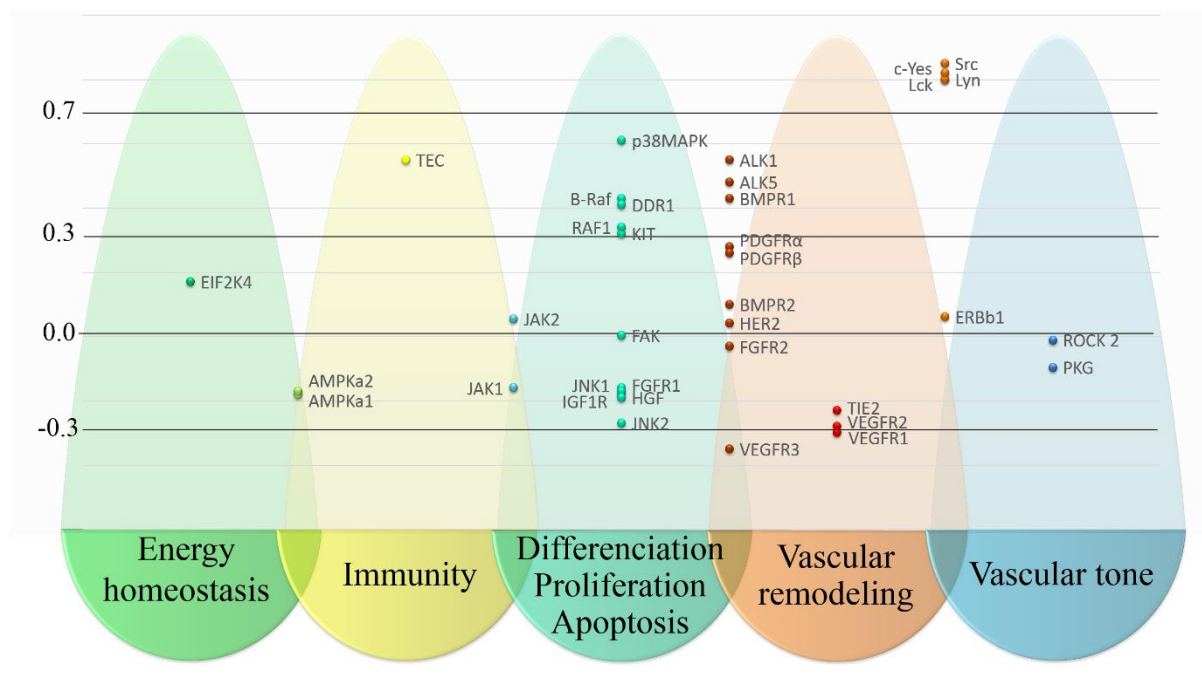


Figure 2. Manhattan plot synthesizing the correlation analysis. Pearson coefficients of each target classified according to their cellular function.

Co-medication analysis

In the co-medication analysis we found that diuretics, insulins, statins and antihypertensive drugs are more frequently associated in dasatinib PAH cases compared to other adverse event cases. Incidence of co-medication are represented in Figure 3 (details are available on supplementary appendix 5).

Clusters

Results of hierarchical clustering are presented in Figure 4.

Temporal analysis

Results of the temporal analysis associated with firsts publications reporting an

association between a PKI and PAH is presented in Figure 5. Notably, a huge increase in the rate of notification for dasatinib can be seen after first media alert.

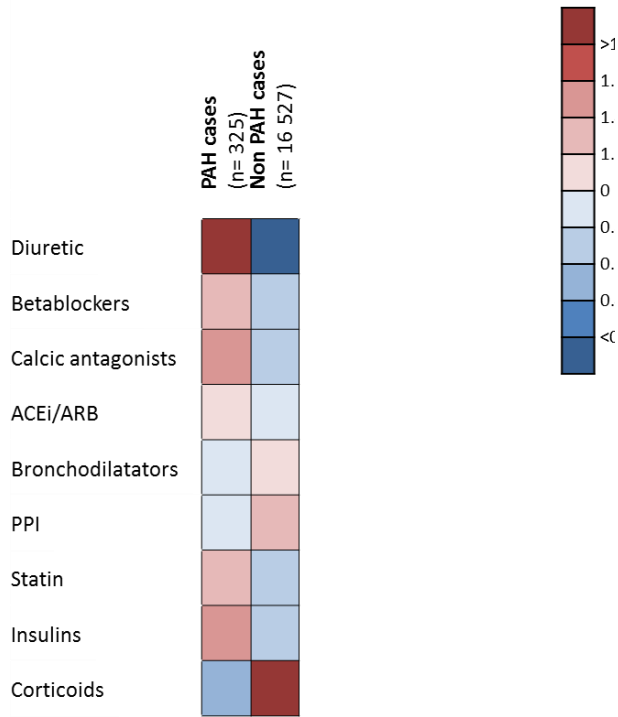


Figure 3. Results of the co-medication analysis between PAH and non-PAH cases related to dasatinib in Vigibase®.

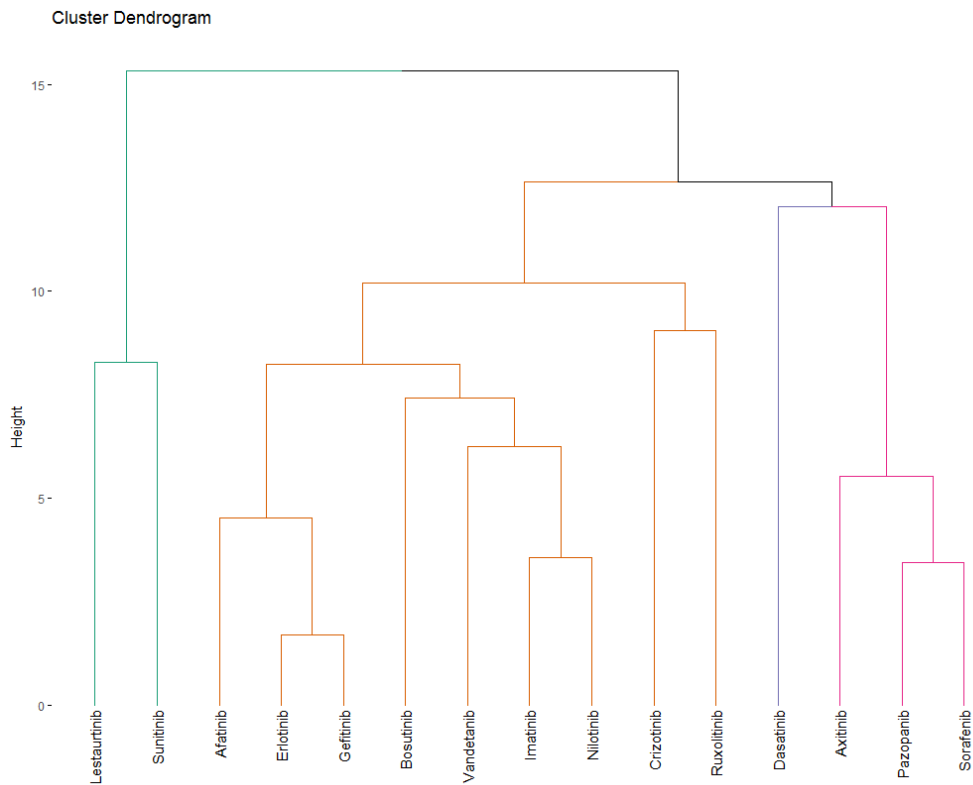


Figure 4. Clusters dendrogram of protein kinases inhibitors based on their affinity profile.

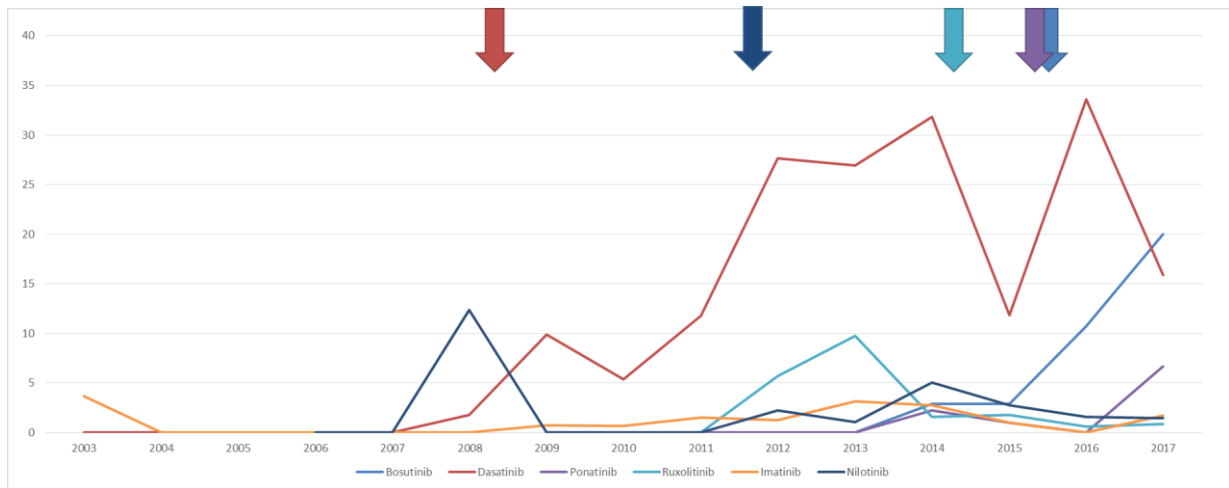


Figure 5. Proportion of reported PAH cases for 1000 reported adverse events per year.

Discussion

To our knowledge this is the first pharmacovigilance analysis assessing the reporting risk of PAH associated with PKI use. Among more than 16 million ADR reported in the WHO pharmacovigilance database Vigibase® at the date of the extraction, 286 834 ICSRs were associated the 29 selected PKI including 482 PAH cases. Disproportionality analysis showed that dasatinib, bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, nilotinib and imatinib had a significant pharmacovigilance signal. Those signals remained positive in sensitivity analysis except for imatinib (supplementary material). Those results are mainly in accordance with the literature data about PKI inducing PAH. Dasatinib is commonly implicated in induction or aggravation of PAH (6,12)(13)(14). More recently, bosutinib, imatinib, ponatinib and ruxolitinib were linked to PAH (15,16). A recent published case series suggested that lapatinib, a PKI used in breast cancer with human epidermal growth factor receptor mutations, might also cause PAH, but only one of the six patients presented in this article

had RHC confirming precapillary PAH (17). In our study, lapatinib showed a weak and non-significant disproportionality signal with a ROR of 1.13 (0.61, 2.10). To date, there is no publication linking imatinib to PAH, imatinib has even been tested as a potential therapy in patients with PAH with an unfavorable benefit-to-risk balance (18). The pharmacovigilance signal found in our analysis for imatinib may be provoked by confusion bias owing to the higher prevalence of PAH in patients with a myeloproliferative disease (19). Accordingly, the signal for imatinib disappeared in a sensitivity analysis. In pharmacodynamic correlation analysis, c-src, c-yes, lck and lyn were highly correlated to the PAH reporting risk. The Src tyrosine kinases family contain nine members: three of them (Src, Fyn and Yes) are ubiquitously distributed and six (Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck and Lyn) are variously expressed depending on tissues. It has been shown that Src tyrosine kinases are crucial for TWIK-related acid sensitive potassium 1 (TASK-1) potassium channel functioning, acting as a cofactor (7). Mimicking hypoxia condition, inhibition of SRC kinases decrease TASK-1 activity result in intracellular calcium level

increase thus enhancing vasoconstriction and vascular remodeling (7). However, beyond inhibition of such protein kinases, it has recently been shown that dasatinib might induce apoptosis and endothelial cell dysfunction through an increase of mitochondrial reactive oxygen species that is independent from Src family kinases inhibition (14).

Members of the BMP signaling pathway showed heterogeneous results in our study.

Whereas ALK1, ALK5 and BMPR-1 showed positive correlation in the main or in sensitivity analysis, BMPR-2, the first cause of heritable PAH, does not show any correlation in our study. The BMP signaling pathway is involved in cell proliferation, mitochondrial dysfunction and inflammation (20). Mutation of *BMPR2* the gene coding for the receptor BMPR2 account for 70-80% of heritable PAH, furthermore BMPR2 concentration has also been shown to be reduced in lung tissue from patients with PAH (21). However, estimates indicate that only approximately 20% of individuals with a known genetic mutation in BMPR2 will develop PAH during their life, thus, *BMPR2* mutation is required but is not sufficient alone for phenotypic expression and increase an individual's chance of developing PAH (22)(20). Interestingly, it has recently been shown that BMPR2 reduction, through micro-RNA 124, lead to mitochondrial Warburg phenotype, thus should explain the mitochondrial increased of reactive oxygen species found by Guinabert et al (14,23). Overall, we cannot exclude that BMP signaling pathway may participate to PAH induced by PKI but it seems not primarily involved in the pathophysiology. Other target such as TEC and p38MAPK showed

moderate correlation ($0.3 < p < 0.7$) with non-significant results within adjusted analysis considering only PKI with more than three cases; their implication remains to be further elucidated.

The absence of association between PDGF and VEGF protein kinases reinforce the fact that vascular remodeling is not a major component of PAH induced by PKI; which is consistent with the observations of PAH reversal upon PKI discontinuation.

Genetic mutations are considered to be permissive of disease, and require additional epigenetic, inflammatory or environmental factors for the development of PAH in people with those mutations (24). Consistently and based on in vitro and in vivo findings, PKI increase the risk of developing PAH but require a comparable genetic, epigenetic or environmental "second hit" (14). Our exploration of associated co-medication found that antihypertensive drugs (diuretics, beta-blockers, ACEi/ARB and calcium antagonists), statins and insulins are more represented in PAH patients. This result suggest the possibility that diabetes, hypercholesterolemia and arterial hypertension would be a risk factor for dasatinib induced PAH. We could hypothesize that endothelial dysfunction and cellular hypoxia associated with diabetes, dyslipidemia and arterial hypertension could trigger PAH in those patients (25). Accordingly to published cases series, a higher proportion of men may develop PKI induced PAH whereas the incidence of PAH is fourfold higher in the general population (20). It is known that men have worse prognostic mainly because of a maladaptive response of the right ventricle to PAH, we

thus cannot exclude a participation of hormones and sex in triggering PAH (26).

Another interesting point is that a PKI such as vandetanib which have a similar affinity profile to bosutinib, nilotinib and imatinib (Figure 4) but indicated in prostatic cancer do not provoke PAH. Such observation strongly highlights the role of the hematological underlying pathology in the genesis of PAH.

The results of the cluster analysis are mainly in accordance with the literature data, such as the analogy between imatinib and nilotinib (27). Interestingly the dasatinib profile seems different from other PKI. Given that pharmacovigilance notifications are based on a spontaneous reporting system, amount and proportion of cases reported for a medicinal product may variate depending of many factors such as media safety alerts, time since marketing or selective notification. Illustrating this variability, the time trend analysis showed a dramatic increase in rate of reporting after the firsts case-series and case-reports publications (Figure 5). However, despite those bias a correlation between relative risks and measure of disproportionality was found (8). Moreover, despite the case selection performed for this study (Figure S1) we cannot exclude that spurious PAH were included, indeed only two cases the results of right heart catheterization were reported. For this analysis, we assumed that PAH was caused by a single PK and that the pathophysiological mechanism is the same for all PKI. Our study was not able to detect co-inhibition of multiple pKs or inhibition/activation of non-PK cellular targets (e.g. proteasomes, G protein-coupled receptors, voltage-gated ion channels or ligand-gated ion channels). Therefore the

implication of other target in the pathogenesis of PKI-induced PAH cannot be ruled out.

Conclusion

This is to our knowledge, the first pharmacovigilance analysis to investigate the risk of PAH associated with PKI. The disproportionality analysis showed that dasatinib, but also bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, and nilotinib had a significant disproportionality signal. This study highlights the role of SRC protein kinases family in PAH induced by PKI. Given the biased nature of the pharmacovigilance data, the results have to be confirmed by further analysis. Overall, this study contributes to a better understanding of PAH induced PKI.

References

1. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, et al. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016 Jan 1;37(1):67–119.
2. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular remodeling in pulmonary hypertension. *J Mol Med*. 2013 Mar;91(3):297–309.

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 Dec 24;62(25 Suppl):D34-41.
4. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun;43(12):S13-24.
5. Mattei D, Feola M, Orzan F, Mordini N, Rapezzi D, Gallamini A. Reversible dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricle failure in a previously allografted CML patient. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jun;43(12):967-8.
6. Rasheed W, Flaim B, Seymour JF. Reversible severe pulmonary hypertension secondary to dasatinib in a patient with chronic myeloid leukemia. *Leuk Res*. 2009 Jun;33(6):861-4.
7. Nagaraj C, Tang B, Balint Z, Wygrecka M, Hrzencak A, Kwapiszewska G, et al. Src tyrosine kinase is crucial for potassium channel function in human pulmonary arteries. *Eur Respir J*. 2013 Jan 1;41(1):85-95.
8. Maciá-Martínez M-A, de Abajo FJ, Roberts G, Slattery J, Thakrar B, Wisniewski AFZ. An Empirical Approach to Explore the Relationship Between Measures of Disproportionate Reporting and Relative Risks from Analytical Studies. *Drug Saf*. 2016 Jan;39(1):29-43.
9. Harding SD, Sharman JL, Faccenda E, Southan C, Pawson AJ, Ireland S, et al. The IUPHAR/BPS Guide to PHARMACOLOGY in 2018: updates and expansion to encompass the new guide to IMMUNOPHARMACOLOGY. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D1091-106.
10. van Puijenbroek EP, Bate A, Leufkens HGM, Lindquist M, Orre R, Egberts ACG. A comparison of measures of disproportionality for signal detection in spontaneous reporting systems for adverse drug reactions. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*. 2002 Jan;11(1):3-10.
11. Bland JM, Altman DG. Multiple significance tests: the Bonferroni method. 1995. *BMJ : British Medical Journal*.
12. Mattei D, Feola M, Orzan F, Mordini N, Rapezzi D, Gallamini A. Reversible dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricle failure in a previously allografted CML patient. *Bone Marrow Transplant*. 2009 Jun;43(12):967-8.
13. Hennigs JK, Keller G, Baumann HJ, Honecker F, Kluge S, Bokemeyer C, et al. Multi tyrosine kinase inhibitor dasatinib as novel cause of severe pre-capillary pulmonary hypertension? *BMC Pulm Med* [Internet]. 2011 Dec [cited 2017 Nov 21];11(1). Available from: <http://bmcpulmmed.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2466-11-30>
14. Guignabert C, Phan C, Seferian A, Huertas A, Tu L, Thuillet R, et al. Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J Clin Invest*. 2016 Aug 2;126(9):3207-18.
15. Low AT, Howard L, Harrison C, Tulloh RMR. Pulmonary arterial hypertension exacerbated by ruxolitinib. *Haematologica*. 2015 Jun 1;100(6):e244-5.
16. Weatherald J, Chaumais M-C, Montani D. Pulmonary arterial hypertension induced by tyrosine kinase inhibitors: *Curr Opin Pulm Med*. 2017 Jul;1.
17. Alkhatib Y, Albashaireh D, Al-Aqtash T, Awdish R. The role of tyrosine kinase inhibitor “Lapatinib” in pulmonary

- hypertension. *Pulm Pharmacol Ther.* 2016 Apr;37:81–4.
18. Frost AE, Barst RJ, Hoeper MM, Chang H-J, Frantz RP, Fukumoto Y, et al. Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J Heart Lung Transplant.* 2015 Nov;34(11):1366–75.
 19. Cortelezzi A, Gritti G, Del Papa N, Pasquini MC, Calori R, Gianelli U, et al. Pulmonary arterial hypertension in primary myelofibrosis is common and associated with an altered angiogenic status. *Leukemia.* 2008 Mar;22(3):646–9.
 20. Thenappan T, Ormiston ML, Ryan JJ, Archer SL. Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ.* 2018 Mar 14;j5492.
 21. 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 Apr 9;105(14):1672–8.
 22. Austin ED, Loyd JE. Genetics and Mediators in Pulmonary Arterial Hypertension. *Clin Chest Med.* 2007 Mar;28(1):43–57.
 23. Caruso P, Dunmore BJ, Schlosser K, Schoors S, Dos Santos CC, Perez-Iratxeta C, et al. Identification of miR-124 as a Major Regulator of Enhanced Endothelial Cell Glycolysis in Pulmonary Arterial Hypertension via PTBP1 and PKM2. *Circulation.* 2017 Sep 26;CIRCULATIONAHA.117.028034.
 24. Pousada G, Balreira A, Valverde D. Complex inheritance in Pulmonary Arterial Hypertension patients with several mutations. *Sci Rep [Internet].* 2016 Dec [cited 2018 Mar 12];6(1). Available from: <http://www.nature.com/articles/srep33570>
 25. Sada K, Nishikawa T, Kukidome D, Yoshinaga T, Kajihara N, Sonoda K, et al. Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. Essop MF, editor. *PLOS ONE.* 2016 Jul 6;11(7):e0158619.
 26. Shapiro S, Traiger GL, Turner M, McGoon MD, Wason P, Barst RJ. Sex differences in the diagnosis, treatment, and outcome of patients with pulmonary arterial hypertension enrolled in the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Chest.* 2012 Feb;141(2):363–73.
 27. Green MR, Newton MD, Fancher KM. Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors: *Am J Clin Oncol.* 2016 Feb;39(1):76–84.

Identification of cellular targets involved in Pulmonary Arterial Hypertension induced by Protein Kinase Inhibitors by a pharmacovigilance / pharmacodynamics analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Appendix 1. Details of co-reported Meddra term excluded from the analysis

-**cardiac disorders** (from MeDDRA classification: Cardiac disorders SOC - Cardiac and vascular disorder congenital HGLT - Cardiac and vascular investigation HGLT).

- **pulmonary disorders** (respiratory and mediastinal neoplasms malignant and unspecified HGLT - bronchial disorders (excl neoplasms) HGLT - lower respiratory tract inflammatory and immunologic conditions HLT– parenchymal lung disorders HLT - pulmonary thrombotic and embolic conditions HLT - respiratory tract disorders NEC HLT – tumour embolism / tumour thrombosis PT) and

-**thrombotic disorders** (embolism and thrombosis HGLT).

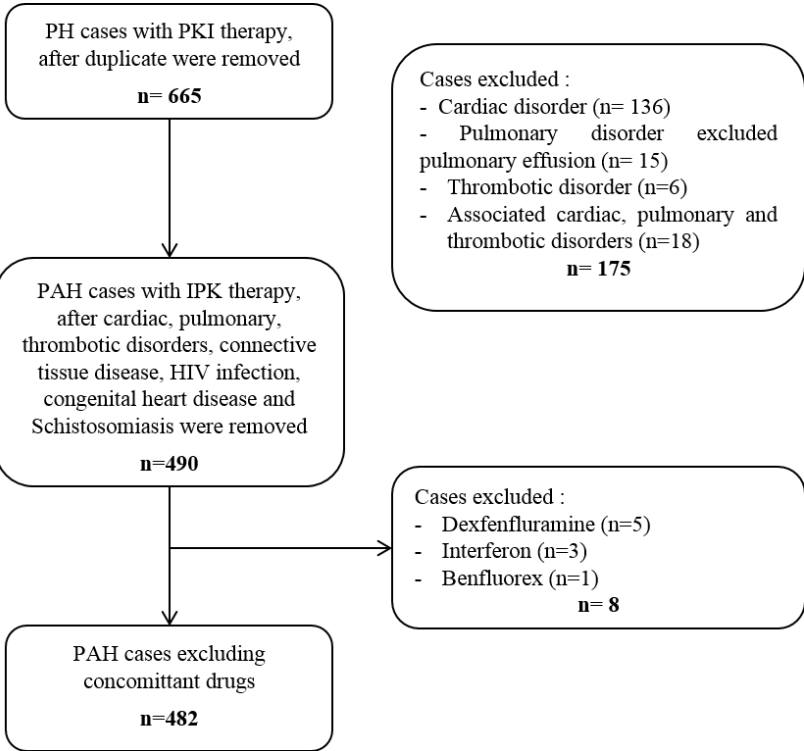


Figure S1. Flow chart of PAH cases selection for analysis

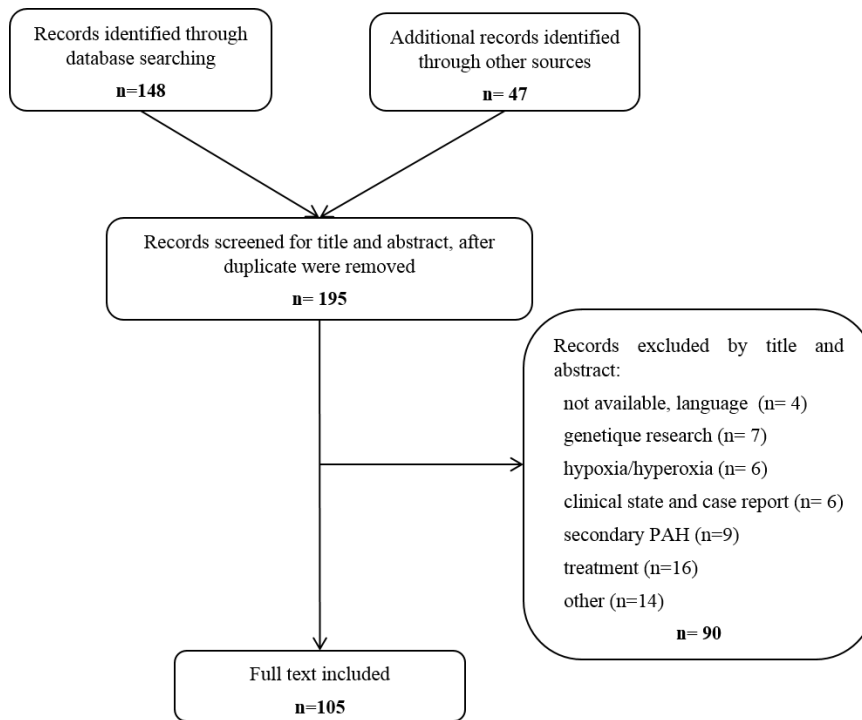


Figure S2. Identification of protein kinases involved in pulmonary function through a literature review.

Appendix 2. Most relevant references about the protein kinases of interest

Table S1. Most relevant references about target of interest

Target involved in pulmonary pathophysiology	Sources
ALK1 Activin receptor-like kinase-1	(Star et al., 2010) ; (Girerd et al., 2017) ; (Gore et al., 2014)
ALK5 transforming growth factor-β1 (TGFβ1)	(Tojais et al., 2017) (Upton and Morrell, 2013)
AMPKa1 (AMP-activated protein kinase)	(Ibe et al., 2013) (Omura et al., 2016)
AMPKa2	(Ibe et al., 2013)
BMPR-1 = ALK6	(Chida et al., 2012)
BMPR-2	(Tojais et al., 2017)
B-Raf (Rapidly Accelerated Fibrosarcoma)	(Awad et al., 2016)
C-Raf = Raf1	(Hopper et al., 2015)
DDR1 Discoidin domain receptor	(Sakamoto et al., 2001)
EIF2AK4 eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 4	(Tenorio et al., 2015) (Eichstaedt et al., 2016) (Best et al., 2017)
ERB-b1 = EGFR = Her1	(Dahal et al., 2010)
ERB-b2 = HER2	(Dahal et al., 2010)
focal adhesion kinase FAK	(Paulin et al., 2014)
FGFR1	(Zheng et al., 2015) (Kim, 2014) (Izikki et al., 2009)
FGFR2	(Schermuly et al., 2011)
IGF-1R (insulin like growth factor)	(Sun et al., 2016) (Baumgart et al., 2017) (Dewachter et al., 2014)

JAK 1	(Lachmann et al., 2017)
JAK2	(Mattar et al., 2016)
JNK1/2 (c-Jun N-terminal kinase) = mitogen-activated protein kinase 9	(Wilson et al., 2015) (Das et al., 2016)
c-kit = KIT stem cell growth factor receptor (SCFR)	(Montani et al., 2014) (Farha et al., 2014)
Lck Leukocyte C-terminal Src kinase	(Andruska et al., 2017)
lyn	(Pullamsetti et al., 2012a)
c MET = HGF	(Schermuly et al., 2011)
p38 MAPK = mitogen-activated protein kinase 14	(Wilson et al., 2015) (Church et al., 2015)
PDGFRα	(Berghausen et al., 2013) (Schermuly, 2005)
PDGFRβ	(Cai et al., 2017) (Weatherald et al., 2017)
PKG cGMP-dependent protein kinase	(Patel et al., 2014)
ROCK-2	(Shimizu et al., 2013)
Tyrosine-protein kinase c-Src	(Guignabert et al., 2016)
TEC	(de Lavallade et al., 2008)
TEK receptor tyrosine kinase TIE2	(Guignabert et al., 2016)
VEGFR-1	(Derrett-Smith et al., 2013)
VEGFR-2	(Nicolls et al., 2012)
VEGFR-3	(Hwangbo et al., 2017)
c-yes	(Pullamsetti et al., 2012b)

Appendix 3. Results of sensitivity analysis

Sensitivity analysis were performed to compare the proportion of PAH reported for each PKI with the proportion of PAH reported for all other PKI.

We performed an analysis using only reported cases from the first six years after the FDA approval. A positive disproportionality signal was found for dasatinib with a ROR of 13.32 (8.56; 20.72), bosutinib 10.30 (6.63; 16.00), ponatinib 2.83 (1.41; 5.66), ruxolitinib 1.94 (1.20; 3.12) and nilotinib 2.07 (0.78; 5.53). Logarithmic value are represented in Figure S3.

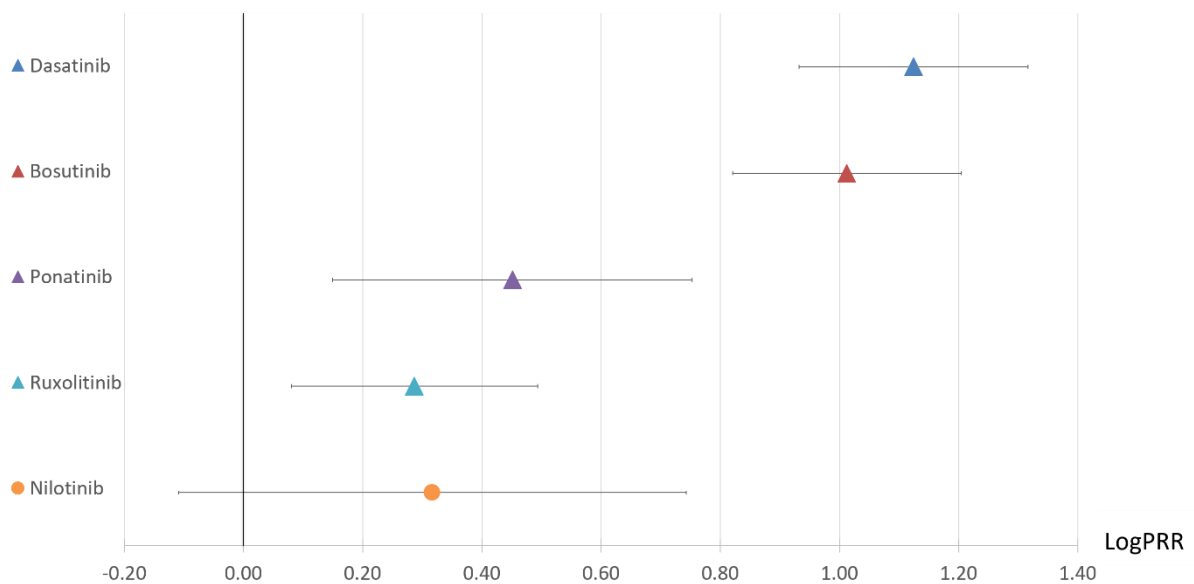


Figure S3. Disproportionality signal of PAH induced by PKI from the first six years after FDA approval versus all medication in pharmacovigilance database. PRR and 95% CI were log transformed.

Appendix 4. Correlation analysis

In sensitivity analysis standardizing the time on the market of the different PKI at six years ($r_{c\text{-src}} = 0.90$. $r_{c\text{-yes}} = 0.89$. $r_{Lyn} = 0.83$) and including only PKI which had more than 3 cases of PAH ($r_{c\text{-src}} = 0.89$. $r_{c\text{-yes}} = 0.87$. $r_{Lyn} = 0.84$) showed comparative result of correlation with a high but non-significant correlation for Lck ($r_{Lck} = 0.85$; $p = 0.0021$ and $r_{Lck} = 0.82$; $p = 0.037$ respectively).

Table S2. Correlation and p-value of all sensitivity analysis.

Target	6 year after approval		More than 3 cases		PKI used in haematology	
	r	p-value	r	p-value	r	p-value
ACVRL1	0.46	0.08400	0.90	0.00018	0.91	0.03000
ALK5	0.40	0.13000	0.76	0.00620	0.99	0.00074
AMPKa1	-0.18	0.52000	-0.16	0.63000	0.16	0.80000
AMPKa2	-0.21	0.44000	-0.18	0.60000	NA	NA
B_Raf	0.36	0.19000	0.35	0.29000	0.58	0.31000
BMPR_1	0.29	0.30000	0.59	0.05700	0.83	0.08000
BMPR_2	0.19	0.50000	0.08	0.82000	-0.096	0.88000
c_yes	0.83	0.00013	0.87	0.00047	0.94	0.01800
c-src	0.88	0.00002	0.89	0.00021	0.92	0.02800
DDR1	0.40	0.14000	0.38	0.25000	0.26	0.68000
EIF2K4	0.19	0.49000	0.42	0.20000	0.62	0.27000
ERB_b1	0.15	0.59000	0.24	0.49000	0.79	0.11000
FAK	0.07	0.80000	-0.04	0.91000	0.16	0.80000
FGFR1	-0.22	0.43000	-0.07	0.83000	0.91	0.03000
FGFR2	-0.11	0.69000	0.07	0.83000	0.91	0.03000
HER2	0.13	0.63000	0.15	0.66000	0.96	0.00960
HGF	-0.19	0.50000	-0.17	0.63000	0.16	0.80000
IGF_1R	-0.23	0.41000	-0.23	0.49000	NA	NA

JAK1	-0.22	0.43000	-0.20	0.56000	-0.32	0.60000
JAK2	0.00	0.99000	0.07	0.83000	-0.14	0.83000
JNK1	-0.22	0.43000	-0.17	0.61000	-0.55	0.34000
JNK2	-0.28	0.32000	-0.23	0.50000	-0.34	0.58000
KIT	0.25	0.36000	0.32	0.34000	0.56	0.33000
Lck	0.82	0.00030	0.82	0.00370	0.81	0.09700
Lyn	0.83	0.00013	0.85	0.00094	0.87	0.05500
p38_MAPK	0.56	0.02900	0.61	0.04400	0.73	0.16000
PDGFRalfa	0.17	0.54000	0.32	0.34000	0.59	0.29000
PDGFRbeta	0.20	0.47000	0.29	0.38000	0.62	0.26000
PKG	-0.15	0.60000	-0.05	0.90000	-0.32	0.59000
RAF1	0.30	0.28000	0.26	0.44000	0.57	0.32000
ROCK_2	0.02	0.94000	-0.01	0.97000	-0.21	0.73000
TEC	0.47	0.06800	0.55	0.06300	0.97	0.00640
TIE2	-0.24	0.38000	-0.22	0.52000	-0.28	0.65000
VEGFR_1	-0.34	0.21000	-0.33	0.32000	0.91	0.03000
VEGFR_2	-0.34	0.21000	-0.29	0.38000	0.91	0.03000
VEGFR_3	-0.32	0.23000	-0.38	0.25000	NA	NA

Appendix 5. Results of the co-medication analysis of dasatinib PAH cases.

Table S3. Result of co-medication analysis

Co-medication of interest	PAH cases (n= 325)		Non PAH cases (n=16 527)		Ratio
Diuretic	45	13.8%	783	4.74%	2.92
Furosemide	29	8.9%	610	3.69%	2.42
Spirolactone	9	2.8%	102	0.62%	4.49
Hydrochlorothiazide	7	2.2%	71	0.43%	5.01
Betablockers	17	5.2%	634	3.84%	1.36
Metoprolol	4	1.2%	345	2.09%	0.59
Bisoprolol	8	2.5%	116	0.70%	3.51
Atenolol	2	0.6%	127	0.77%	0.80
Nebivolol	3	0.9%	29	0.18%	5.26
Propranolol	0	0.0%	17	0.10%	0.00
Calcic antagonists	13	4.0%	444	2.69%	1.49
Amlodipine	8	2.5%	330	2.00%	1.23
Diltiazem	1	0.3%	70	0.42%	0.73
Nifedipine	1	0.3%	30	0.18%	1.70
Nisoldipine	1	0.3%	0	0.00%	NA
Lercanidipine	2	0.6%	15	0.09%	6.78
Nicardpine	0	0.0%	0	0.00%	NA
IEC/ARA2	18	5.5%	805	4.87%	1.14
Lisinopril	1	0.3%	281	1.70%	0.18
Perindopril	3	0.9%	32	0.19%	4.77
Losartan	1	0.3%	130	0.79%	0.39
Ramipril	6	1.8%	95	0.57%	3.21
Valsartan	3	0.9%	90	0.54%	1.70
Telmisartan	1	0.3%	30	0.18%	1.70
Olmesartan	0	0.0%	47	0.28%	0.00
Candesartan	1	0.3%	62	0.38%	0.82
Irbesartan	2	0.6%	38	0.23%	2.68
Bronchodilatators	6	1.8%	315	1.91%	0.97
Budesonide	2	0.6%	43	0.26%	2.37
Fluticasone	1	0.3%	144	0.87%	0.35
Salbutamol	1	0.3%	26	0.16%	1.96

Salmeterol	0	0.0%	72	0.44%	0.00
Formoterol	2	0.6%	30	0.18%	3.39
PPI	12	3.7%	755	4.57%	0.81
Lansoprazole	5	1.5%	106	0.64%	2.40
Omeprazole	2	0.6%	276	1.67%	0.37
Rabeprazole	1	0.3%	34	0.21%	1.50
Pantoprazole	1	0.3%	235	1.42%	0.22
Esomeprazole	3	0.9%	104	0.63%	1.47
Statin	11	3.4%	428	2.59%	1.31
Simvastatin	3	0.9%	216	1.31%	0.71
Atorvastatin	2	0.6%	1	0.01%	101.70
Rosuvastatin	4	1.2%	106	0.64%	1.92
Pravastatin	2	0.6%	80	0.48%	1.27
Pitavastatin	0	0.0%	7	0.04%	0.00
Lovastatin	0	0.0%	18	0.11%	0.00
Insulins	5	1.5%	174	1.05%	1.46
Insulin aspart	1	0.3%	38	0.23%	1.34
Insulin glulisine	1	0.3%	0	0.00%	NA
Insulin	1	0.3%	46	0.28%	1.11
Insulin detemir	2	0.6%	0	0.00%	NA
Insulin lispro	0	0.0%	0	0.00%	NA
Insulin human	0	0.0%	21	0.13%	0.00
Insulin glargine	0	0.0%	72	0.44%	0.00
Corticoids	4	1.2%	455	2.75%	0.45
Prednisolone	2	0.6%	158	0.96%	0.64
Prednisone	2	0.6%	222	1.34%	0.46
Methylprednisolone	0	0.0%	75	0.45%	0.00
Vasodilatators	2	0.6%	12	0.07%	8.48
Sildenafil	2	0.6%	9	0.05%	11.30
Tadalafil	0	0.0%	3	0.02%	0.00
Other			0		
Levothyroxine	10	3.1%	419	2.49%	1.24
Allopurinol	8	2.5%	438	2.60%	0.95
Acetylsalicylicacid	8	2.5%	585	3.47%	0.71
Metformine	4	1.2%	242	1.44%	0.86
Digoxin	2	0.6%	54	0.32%	1.92

DISCUSSION

Il s'agit, à notre connaissance, de la première analyse de pharmacovigilance évaluant le risque d'HTAP associé à l'utilisation des IPK. Parmi plus de 16 millions d'effets indésirables rapportés dans la base de données internationales de pharmacovigilance de l'OMS, 286 834 effets indésirables étaient rapportés sous IPK dont 482 cas d'HTAP qui ont été extraits. L'analyse de disproportionnalité a montré que le dasatinib, mais aussi le bosutinib, le ponatinib, le ruxolitinib, le nilotinib et l'imatinib possédaient un signal de disproportionnalité significatif. Les analyses de sensibilité confirment ces résultats (à l'exception de l'imatinib pour lequel le signal de disproportionnalité disparaît) et sont en accord avec la littérature (Moguillansky et al., 2017 ; Minami et al., 2017 ; Low et al., 2015). Une série de cas publiés récemment suggère que le lapatinib, un ITK utilisé dans le cancer du sein, pourrait également être à l'origine d'HTAP iatrogènes, mais un seul des six patients inclus dans cette série de cas présentait une HTP précapillaire confirmée (Alkhatib et al., 2016). Dans notre étude, le lapatinib a montré un signal de disproportionnalité faible et non significatif avec un ROR de 1,13 (0,61; 2,10). À ce jour, il n'existe aucune publication liant l'imatinib à l'HTAP, l'imatinib ayant même été testé comme traitement potentiel chez les patients atteints d'HTAP avec un rapport bénéfice / risque défavorable (Frost et al., 2015). Le signal de pharmacovigilance pour l'imatinib révélé par notre étude, est probablement induit par un biais de confusion attribuable à la prévalence plus élevée de l'HTAP chez les patients atteints de maladie myéloproliférative (Cortelezzi et al., 2008 ; Guilpain et al., 2008).

L'analyse de corrélation pharmacodynamique, révèle une forte corrélation entre l'affinité pour c-src, c-yes, lck et lyn et la disproportionnalité du signal de pharmacovigilance. La famille des Src tyrosine kinases contient neuf membres : trois d'entre elles (Src, Fyn et Yes) sont ubiquitaires et six (Blk, Yrk, Fgr, Hck, Lck et Lyn) sont exprimées différemment selon les tissus. Il a été montré que les tyrosines kinases Src sont cruciales pour le fonctionnement du

canal potassique lié à TWIK 1 (TASK-1), agissant comme un cofacteur. Imitant un état d'hypoxie, l'inhibition des SRC tyrosines kinases diminue l'activité de TASK-1 entraînant une augmentation du calcium intracellulaire, aggravant la vasoconstriction et le remodelage vasculaire. Cependant, il a récemment été montré que le dasatinib pouvait induire une apoptose et une dysfonction des cellules endothéliales par une augmentation mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène, qui est indépendante de l'inhibition des kinases de la famille Src. De plus, l'absence de corrélation entre les récepteurs PDGF et VEGF renforce l'hypothèse d'un remodelage vasculaire au second plan dans la physiopathologie des HTAP aux IPK ; hypothèse confortée par le fait que ces HTAP régressent lors de l'arrêt des IPK.

Les membres de la voie de signalisation BMP montrent des résultats hétérogènes dans notre étude. Alors qu'ALK1, ALK5 et BMPR-1 ont montré une corrélation positive dans l'analyse principale ou dans l'analyse de sensibilité, BMPR-2, première mutation génétique découverte à l'origine d'HTAP héréditaires, ne montre, dans notre étude, aucune corrélation. La voie de signalisation BMP est impliquée dans la prolifération cellulaire, le dysfonctionnement mitochondrial et l'inflammation. Une mutation de BMPR2, le gène codant pour le récepteur BMPR2, représente 70-80% des HTAP héréditaires. Cependant, seulement 20% des personnes ayant une mutation génétique connue de BMPR2 développeront une HTAP au cours de leur vie. La mutation de BMPR2 constitue donc un facteur de risque mais n'est pas suffisante pour induire une HTAP. Nous ne pouvons néanmoins pas exclure que la voie de signalisation BMP participe à la physiopathologie des HTAP induite par les PK, mais elle ne semble pas être principalement impliquée. D'autres cibles telles que TEC et p38MAPK ont montré une corrélation modérée ($0,3 < p < 0,7$) avec des résultats non significatifs dans l'analyse de sensibilité considérant uniquement les IPK ayant plus de trois cas d'HTAP ; leur implication reste donc à élucider.

Les mutations génétiques sont dites « permissives » de la maladie mais nécessitent des facteurs épigénétiques, inflammatoires ou environnementaux supplémentaires pour le développement d'une HTAP chez les sujets présentant ces mutations génétiques. De manière cohérente, et selon des données *in vitro* et *in vivo*, les IPK augmentent le risque de développer une HTAP mais nécessitent de la même façon, un « second hit » génétique, épigénétique ou environnemental (Guignabert et al., 2016). Notre étude des co-médications associées a révélé que certaines classes médicamenteuses telles que les médicaments antihypertenseurs (diurétiques, bêta-bloquants, IEC/ARA2 et antagonistes du calcium), les statines et les insulines sont plus représentés chez les patients ayant développés une d'HTAP que les autres. Ceci suggère que le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension artérielle sont surreprésentés et constituent peut-être un facteur de risque dans la population de patients HTAP. Ainsi, la dysfonction endothéliale et l'hypoxie cellulaire induites par le diabète, la dyslipidémie et l'hypertension artérielle pourraient favoriser le déclenchement d'une HTAP chez ces patients (Sada et al., 2016). D'après les séries de cas publiées et nos résultats, la proportion d'hommes déclarant une HTAP sous IPK est plus élevée, hors, l'incidence d'HTAP est quatre fois plus élevée chez les femmes que chez les hommes dans la population générale (Thenappan et al., 2018). Il est cependant connu que les hommes ont un moins bon pronostic, principalement en raison d'une réponse inadaptée du ventricule droit, nous ne pouvons donc pas exclure une participation des hormones et du sexe dans le déclenchement de l'HTAP aux IPK (Shapiro et al., 2012).

Un autre point intéressant est que le vandétanib, IPK possédant un profil d'affinité similaire au bosutinib, au nilotinib et à l'imatinib (Figure 4), mais indiqué dans le cancer de la prostate ne provoque pas d'HTAP. Une telle observation met en évidence le rôle de la pathologie hématologique sous-jacente dans la survenue des HTAP.

Les résultats de l'analyse en cluster sont en accord avec les données de la littérature, ou l'on retrouve une analogie entre l'imatinib et le nilotinib et des profils significativement différents

entre le dasatinib et le bosutinib (Figure e ; Green et al., 2016). Il est ainsi intéressant de noter que le profil du dasatinib semble différent de tous les autres IPK.

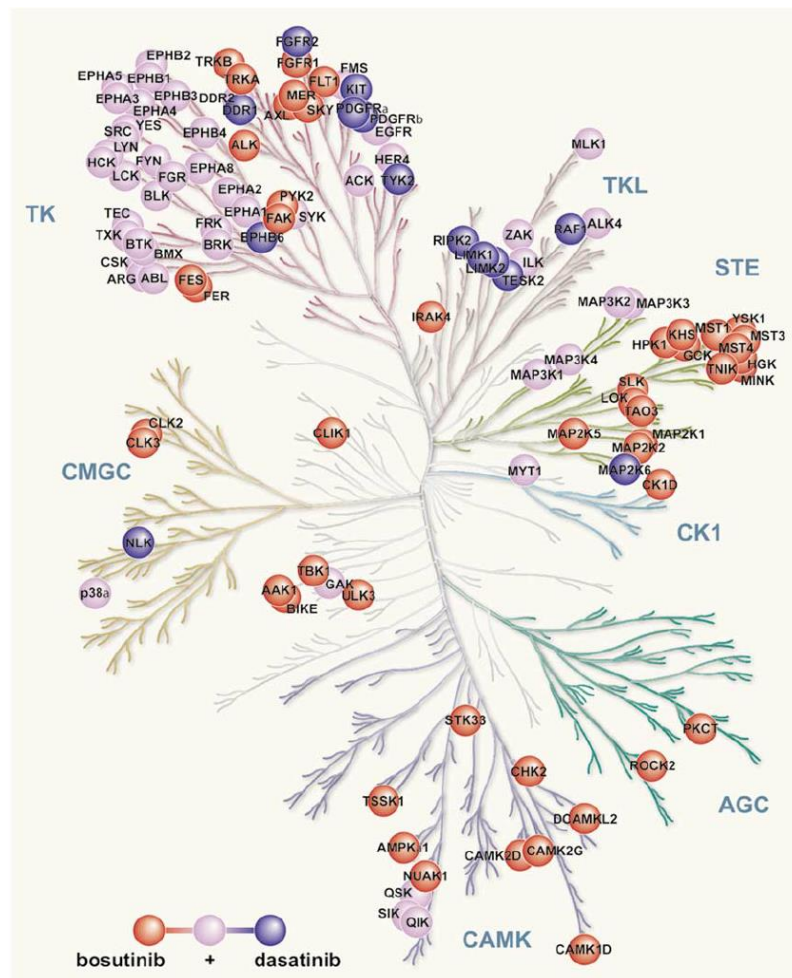


Figure e. Extrait de Remsing Rix et al., 2009, Targeting the kinome: bosutinib versus dasatinib

Les bases de pharmacovigilance reposant sur un système de notification spontanée, l'exactitude, la précision et le nombre de cas signalés varient en fonction de nombreux facteurs. La forte augmentation du taux de signalement après les alertes de sécurité des médias, dans notre analyse temporelle, illustre très bien cette variabilité (biais de média ou biais de notoriété, Figure 5).

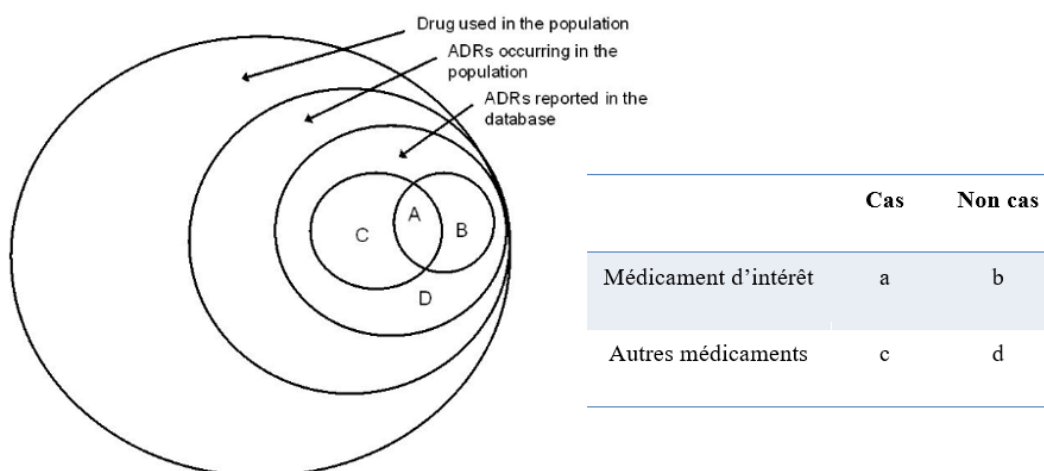


FIGURE 1.
Relationships among patients exposed to drugs, experiencing ADRs and actual reporting (used to calculate disproportionality). Areas of circles do not necessarily reflect the precise proportion and relationships existing among circles.

Figure f. Extrait de Poluzzi et al., 2012. Data mining in pharmacovigilance

Cela pourrait également mener à une mauvaise classification des cas (biais de classification), en particulier entre les pays, ou différentes catégories professionnelles gèrent la caractérisation et l'enregistrement des cas dans les bases de données nationales de pharmacovigilance. Pour cette analyse, nous avons également supposé que les HTAP induites par les IPK étaient causées par une seule protéine kinase cible. Nous n'avons pas été en mesure de détecter l'influence de co-inhibition ou les conséquences de l'hypothèse du second événement (« second hit »). Nous avons aussi présumé que le mécanisme physiopathologique est le même pour toutes les IPK.

Nous avons choisi de sélectionner toutes les IPK ayant plus de 100 ICRS dans la base de données de pharmacovigilance, et l'affinité des IPK sur les cibles cellulaires provient de plusieurs publications, toutes extraites du Guide IUPHAR / BPS de PHARMACOLOGIE développé par l'« Union Internationale de Pharmacologie fondamentale et clinique » (IUPHAR) et la « British Pharmacological Society » (BPS). L'analyse de disproportionnalité est basée sur le calcul du ROR en utilisant la base de données de pharmacovigilance internationale Vigibase®, recensant les événements indésirables de plus de 120 pays.

THÈSE SOUTENUE PAR : Lucie CORNET

TITRE : IDENTIFICATION DE CIBLES CELLULAIRES IMPLIQUÉES DANS L'HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE INDUITE PAR LES INHIBITEURS DE PROTEINES KINASES PAR UNE ANALYSE DE PHARMACOVIGILANCE / PHARMACODYNAMIE.

CONCLUSION :

Les inhibiteurs de protéines kinases (IPK) sont une classe thérapeutique en plein essor dans la prise en charge de diverses pathologies cancéreuses et en développement dans les maladies auto-immunes. Ils sont administrés par voie orale et agissent en interférant avec des cibles moléculaires spécifiques principalement exprimées par les tissus cancéreux et impliquées dans la croissance et la progression tumorale. Chaque IPK se lie à un profil unique de cibles moléculaires plus ou moins sélectives sur des protéines kinases d'intérêt (« on-target » et « off-target »).

Certaines molécules sont historiquement connues pour induire des hypertensions artérielles pulmonaires (HTAP), notamment les amphétamines et leurs dérivés. Plus récemment, un lien entre le dasatinib et la survenue de modifications vasculaires réversibles a été mis en évidence, suite à plusieurs cas d'HTAP attribués à cet inhibiteur multikinase indiqué dans la leucémie myéloïde chronique. Nous avons réalisé une analyse de disproportionnalité à partir de la base de pharmacovigilance de l'Organisation Mondiale de la Santé, afin de préciser le rôle des IPK dans cet événement indésirable. Cette analyse a montré que le dasatinib, mais aussi le bosutinib, le ponatinib, le ruxolitinib, le nilotinib et l'imatinib possédaient un signal de disproportionnalité significatif. Nous avons ensuite cherché à identifier les cibles cellulaires impliquées dans la physiopathologie des HTAP induites par les IPK, via une analyse de corrélation entre l'affinité des IPK sur certaines cibles impliquées dans la physiologie de l'HTAP, et les signaux de disproportionnalité. L'analyse de corrélation pharmacodynamique révèle une forte corrélation entre l'affinité pour des membres de la famille des Src tyrosine kinases et la disproportionnalité du signal de pharmacovigilance. Les co-médications et pathologies associées ont également été étudiées et montrent que les insulines, les statines et les antihypertenseurs (diurétiques, bêta-bloquants, IEC et ARA2) sont plus représentés dans les cas d'HTAP par rapport aux autres cas

d'effets indésirables. Nous suggérons donc la possibilité que le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension représentent des facteurs de risque de développer une HTAP induite par le dasatinib probablement via des mécanismes de dysfonction endothéliale et d'hypoxie cellulaire. Une analyse en cluster des différents IPK a également permis de les classer selon leur profil d'inhibition sur les cibles impliquées dans la physiopathologie de l'HTAP.

Cette étude permet d'éclaircir plusieurs points importants sur la physiopathologie de l'HTAP induite par les IPK. Elle met également en exergue les conséquences potentielles de l'inhibition de cibles cellulaires encore méconnues sur la survenue d'évènements indésirables rares mais graves tel que l'HTAP.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le :

LE DOYEN

Pr. Michel SEYE



LE PRÉSIDENT DU JURY

Pr. Christophe RIBUOT

A handwritten signature in black ink, corresponding to the name Pr. Christophe RIBUOT.

RÉFÉRENCES

- Alkhatib, Y., Albashaireh, D., Al-Aqtash, T., and Awdish, R. (2016). The role of tyrosine kinase inhibitor “Lapatinib” in pulmonary hypertension. *Pulm. Pharmacol. Ther.* *37*, 81–84.
- Andruska, A., Dannewitz, S., Sudheendra, D., Tian, X., Nagendran, M., Spiekerkoetter, E., Harbury, P., and Desai, T. (2017). Lymphocyte Specific Protein Tyrosine Kinase (LCK), a Novel BMPR2 Modulator, Validated by In Situ Transcriptome Profiling.
- Awad, K.S., Elinoff, J.M., Wang, S., Gairhe, S., Ferreyra, G.A., Cai, R., Sun, J., Solomon, M.A., and Danner, R.L. (2016). Raf/ERK drives the proliferative and invasive phenotype of BMPR2-silenced pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *310*, L187–L201.
- Baumgart, B., Guha, M., Hennan, J., Li, J., Woicke, J., Simic, D., Graziano, M., Wallis, N., Sanderson, T., and Bunch, R.T. (2017). In vitro and in vivo evaluation of dasatinib and imatinib on physiological parameters of pulmonary arterial hypertension. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *79*, 711–723.
- Berghausen, E., ten Freyhaus, H., and Rosenkranz, S. (2013). Targeting of Platelet-Derived Growth Factor Signaling in Pulmonary Arterial Hypertension. In *Pharmacotherapy of Pulmonary Hypertension*, M. Humbert, O.V. Evgenov, and J.-P. Stasch, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 381–408.
- Best, D.H., Sumner, K.L., Smith, B.P., Damjanovich-Colmenares, K., Nakayama, I., Brown, L.M., Ha, Y., Paul, E., Morris, A., Jama, M.A., et al. (2017). EIF2AK4 Mutations in Patients Diagnosed With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* *151*, 821–828.
- Boucherat, O., Vitry, G., Trinh, I., Paulin, R., Provencher, S., and Bonnet, S. (2017). The cancer theory of pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Circ.* *7*, 285–299.
- Cai, P., Kovacs, L., Dong, S., Wu, G., and Su, Y. (2017). BMP4 inhibits PDGF-induced proliferation and collagen synthesis via PKA-mediated inhibition of calpain-2 in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* *312*, L638–L648.
- Chida, A., Shintani, M., Nakayama, T., Furutani, Y., Hayama, E., Inai, K., Saji, T., Nonoyama, S., and Nakanishi, T. (2012). Missense mutations of the BMPR1B (ALK6) gene in childhood idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc.* *76*, 1501–1508.
- Church, A.C., Martin, D.H., Wadsworth, R., Bryson, G., Fisher, A.J., Welsh, D.J., and Peacock, A.J. (2015). The reversal of pulmonary vascular remodeling through inhibition of p38 MAPK-alpha: a potential novel anti-inflammatory strategy in pulmonary hypertension. *Am. J. Physiol.-Lung Cell. Mol. Physiol.* *309*, L333–L347.
- Cortezzi, A., Gritti, G., Del Papa, N., Pasquini, M.C., Calori, R., Gianelli, U., Cortiana, M., Parati, G., Onida, F., Sozzi, F., et al. (2008). Pulmonary arterial hypertension in primary myelofibrosis is common and associated with an altered angiogenic status. *Leukemia* *22*, 646–649.
- Dahal, B.K., Cornitescu, T., Tretyn, A., Pullamsetti, S.S., Kosanovic, D., Dumitrascu, R., Ghofrani, H.A., Weissmann, N., Voswinckel, R., Banat, G.-A., et al. (2010). Role of Epidermal Growth Factor Inhibition in Experimental Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* *181*, 158–167.
- Das, M., Zawada, M., West, J., and Stenmark, K. (2016). JNK2 Regulates Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension.
- Derrett-Smith, E.C., Dooley, A., Gilbane, A.J., Trinder, S.L., Khan, K., Baliga, R., Holmes, A.M., Hobbs, A.J., Abraham, D., and Denton, C.P. (2013). Endothelial Injury in a Transforming Growth Factor

β -Dependent Mouse Model of Scleroderma Induces Pulmonary Arterial Hypertension: PAH in a Mouse Model of Scleroderma. *Arthritis Rheum.* 65, 2928–2939.

Dewachter, L., Dewachter, C., Belhaj, A., Lalande, S., Rondelet, B., R Emmelink, M., Vachiéry, J.-L., and Naeije, R. (2014). Insulin-like growth factor-1 contributes to the pulmonary artery smooth muscle cell proliferation in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 44, 316.

Eichstaedt, C.A., Song, J., Benjamin, N., Harutyunova, S., Fischer, C., Grünig, E., and Hinderhofer, K. (2016). EIF2AK4 mutation as “second hit” in hereditary pulmonary arterial hypertension. *Respir. Res.* 17.

Farha, S., Dweik, R., Rahaghi, F., Benza, R., Hassoun, P., Frantz, R., Torres, F., Quinn, D.A., Comhair, S., Erzurum, S., et al. (2014). Imatinib in Pulmonary Arterial Hypertension: C-Kit Inhibition. *Pulm. Circ.* 4, 452–455.

Frost, A.E., Barst, R.J., Hoeper, M.M., Chang, H.-J., Frantz, R.P., Fukumoto, Y., Galié, N., Hassoun, P.M., Klose, H., Matsubara, H., et al. (2015). Long-term safety and efficacy of imatinib in pulmonary arterial hypertension. *J. Heart Lung Transplant.* 34, 1366–1375.

Galié, N., Humbert, M., Vachiery, J.-L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., Simonneau, G., Peacock, A., Vonk Noordegraaf, A., Beghetti, M., et al. (2016). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur. Heart J.* 37, 67–119.

Girerd, B., Weatherald, J., Montani, D., and Humbert, M. (2017). Heritable pulmonary hypertension: from bench to bedside. *Eur. Respir. Rev.* 26, 170037.

Gore, B., Izikki, M., Mercier, O., Dewachter, L., Fadel, E., Humbert, M., Darteville, P., Simonneau, G., Naeije, R., Lebrin, F., et al. (2014). Key Role of the Endothelial TGF- β /ALK1/Endoglin Signaling Pathway in Humans and Rodents Pulmonary Hypertension. *PLoS ONE* 9, e100310.

Green, M.R., Newton, M.D., and Fancher, K.M. (2016). Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors. *Am. J. Clin. Oncol.* 39, 76–84.

Guignabert, C., Phan, C., Seferian, A., Huertas, A., Tu, L., Thuillet, R., Sattler, C., Le Hires, M., Tamura, Y., Jutant, E.-M., et al. (2016). Dasatinib induces lung vascular toxicity and predisposes to pulmonary hypertension. *J. Clin. Invest.* 126, 3207–3218.

Guilpain, P., Montani, D., Damaj, G., Achouh, L., Lefrère, F., Le Pavec, J., Marfaing-Koka, A., Darteville, P., Simonneau, G., Humbert, M., et al. (2008). Pulmonary Hypertension Associated with Myeloproliferative Disorders: A Retrospective Study of Ten Cases. *Respiration* 76, 295–302.

Hoeper, M.M., McLaughlin, V.V., Dalaan, A.M.A., Satoh, T., and Galié, N. (2016). Treatment of pulmonary hypertension. *Lancet Respir. Med.* 4, 323–336.

Hopper, R.K., Feinstein, J.A., Manning, M.A., Benitz, W., and Hudgins, L. (2015). Neonatal pulmonary arterial hypertension and Noonan syndrome: Two fatal cases with a specific *RAF1* mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* 167, 882–885.

Humbert, M. (2010). Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology. *Eur. Respir. Rev.* 19, 59–63.

Hwangbo, C., Lee, H.-W., Kang, H., Ju, H., Wiley, D.S., Papangeli, I., Han, J., Kim, J.-D., Dunworth, W.P., Hu, X., et al. (2017). Modulation of Endothelial Bone Morphogenetic Protein Receptor Type 2

Activity by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 in Pulmonary Arterial Hypertension Clinical Perspective. *Circulation* 135, 2288–2298.

Ibe, J.C.F., Zhou, Q., Chen, T., Tang, H., Yuan, J.X.-J., Raj, J.U., and Zhou, G. (2013). Adenosine Monophosphate-Activated Protein Kinase Is Required for Pulmonary Artery Smooth Muscle Cell Survival and the Development of Hypoxic Pulmonary Hypertension. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 49, 609–618.

Izikki, M., Guignabert, C., Fadel, E., Humbert, M., Tu, L., Zadigue, P., Dartevelle, P., Simonneau, G., Adnot, S., Maitre, B., et al. (2009). Endothelial-derived FGF2 contributes to the progression of pulmonary hypertension in humans and rodents. *J. Clin. Invest.* 119, 512–523.

Kim, J. (2014). Apelin-APJ Signaling: a Potential Therapeutic Target for Pulmonary Arterial Hypertension. *Mol. Cells* 37, 196–201.

Kimura, G., Kataoka, M., Inami, T., Fukuda, K., Yoshino, H., and Satoh, T. (2017). Sorafenib as a potential strategy for refractory pulmonary arterial hypertension. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 44, 46–49.

Lachmann, M.J., Yuasa, S., and Fukuda, K. (2017). 5024JAK1/2 inhibitor ruxolitinib restores the responsiveness to hypoxia in pulmonary arterial hypertension-iPSC-derived endothelial cells. *Eur. Heart J.* 38.

Lau, E.M.T., Giannoulatou, E., Celermajer, D.S., and Humbert, M. (2017). Epidemiology and treatment of pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* 14, 603–614.

de Lavallade, H., Punnialingam, S., Milojkovic, D., Bua, M., Khorashad, J.S., Gabriel, I.H., Chaidos, A., Olavarria, E., Goldman, J.M., Apperley, J.F., et al. (2008). Pleural effusions in patients with chronic myeloid leukaemia treated with dasatinib may have an immune-mediated pathogenesis. *Br. J. Haematol.* 141, 745–747.

Low, A.T., Howard, L., Harrison, C., and Tulloh, R.M.R. (2015). Pulmonary arterial hypertension exacerbated by ruxolitinib. *Haematologica* 100, e244–e245.

Mattar, M.M., Morad, M.A.K., El Husseiny, N.M., Ali, N.H., and El Demerdash, D.M. (2016). Correlation between JAK2 allele burden and pulmonary arterial hypertension and hematological parameters in Philadelphia negative JAK2 positive myeloproliferative neoplasms. An Egyptian experience. *Ann. Hematol.* 95, 1611–1616.

Mattei, D., Feola, M., Orzan, F., Mordini, N., Rapezzi, D., and Gallamini, A. (2009). Reversible dasatinib-induced pulmonary arterial hypertension and right ventricle failure in a previously allografted CML patient. *Bone Marrow Transplant.* 43, 967–968.

Minami, M., Arita, T., Iwasaki, H., Muta, T., Aoki, T., Aoki, K., Yamasaki, S., Matsushima, T., Kato, K., Takenaka, K., et al. (2017). Comparative analysis of pulmonary hypertension in patients treated with imatinib, nilotinib and dasatinib. *Br. J. Haematol.* 177, 578–587.

Moguillansky, N.I., Fakih, H.A.M., and Wingard, J.R. (2017). Bosutinib induced pleural effusions: Case report and review of tyrosine kinase inhibitors induced pulmonary toxicity. *Respir. Med. Case Rep.* 21, 154–157.

Montani, D., Chaumais, M.-C., Guignabert, C., Günther, S., Girerd, B., Jaïs, X., Algalarrondo, V., Price, L.C., Savale, L., Sitbon, O., et al. (2014). Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol. Ther.* 141, 172–191.

Mucke, H. (2013). The role of imatinib in the treatment of pulmonary hypertension. *Drugs Today Barc. Spain* 49, 203–211.

- Nicolls, M.R., Mizuno, S., Taraseviciene-Stewart, L., Farkas, L., Drake, J.I., Husseini, A.A., Gomez-Arroyo, J.G., Voelkel, N.F., and Bogaard, H.J. (2012). New Models of Pulmonary Hypertension Based on VEGF Receptor Blockade-Induced Endothelial Cell Apoptosis. *Pulm. Circ.* 2, 434–442.
- Omura, J., Satoh, K., Kikuchi, N., Satoh, T., Kurosawa, R., Nogi, M., Otsuki, T., Kozu, K., Numano, K., Suzuki, K., et al. (2016). Protective Roles of Endothelial AMP-Activated Protein Kinase Against Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice Novelty and Significance. *Circ. Res.* 119, 197–209.
- Patel, D., Alhawaj, R., and Wolin, M.S. (2014). Exposure of mice to chronic hypoxia attenuates pulmonary arterial contractile responses to acute hypoxia by increases in extracellular hydrogen peroxide. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* 307, R426–R433.
- Paulin, R., Meloche, J., Courboulin, A., Lambert, C., Haromy, A., Courchesne, A., Bonnet, P., Provencher, S., Michelakis, E.D., and Bonnet, S. (2014). Targeting cell motility in pulmonary arterial hypertension. *Eur. Respir. J.* 43, 531–544.
- Poluzzi, E., Raschi, E., Piccinni, C., and De, F. (2012). Data Mining Techniques in Pharmacovigilance: Analysis of the Publicly Accessible FDA Adverse Event Reporting System (AERS). In *Data Mining Applications in Engineering and Medicine*, A. Karahoca, ed. (InTech), p.
- Prins, K.W., and Thenappan, T. (2016). World Health Organization Group I Pulmonary Hypertension. *Cardiol. Clin.* 34, 363–374.
- Pullamsetti, S.S., Berghausen, E.M., Dabral, S., Tretyn, A., Butrous, E., Savai, R., Butrous, G., Dahal, B.K., Brandes, R.P., Ghofrani, H.A., et al. (2012a). Role of Src Tyrosine Kinases in Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1354–1365.
- Pullamsetti, S.S., Berghausen, E.M., Dabral, S., Tretyn, A., Butrous, E., Savai, R., Butrous, G., Dahal, B.K., Brandes, R.P., Ghofrani, H.A., et al. (2012b). Role of Src Tyrosine Kinases in Experimental Pulmonary Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 32, 1354–1365.
- Quintás-Cardama, A., Kantarjian, H., O'Brien, S., Borthakur, G., Bruzzi, J., Munden, R., and Cortes, J. (2007). Pleural Effusion in Patients With Chronic Myelogenous Leukemia Treated With Dasatinib After Imatinib Failure. *J. Clin. Oncol.* 25, 3908–3914.
- Remsing Rix, L.L., Rix, U., Colinge, J., Hantschel, O., Bennett, K.L., Stranzl, T., Müller, A., Baumgartner, C., Valent, P., Augustin, M., et al. (2009). Global target profile of the kinase inhibitor bosutinib in primary chronic myeloid leukemia cells. *Leukemia* 23, 477–485.
- Sada, K., Nishikawa, T., Kukidome, D., Yoshinaga, T., Kajihara, N., Sonoda, K., Senokuchi, T., Motoshima, H., Matsumura, T., and Araki, E. (2016). Hyperglycemia Induces Cellular Hypoxia through Production of Mitochondrial ROS Followed by Suppression of Aquaporin-1. *PLOS ONE* 11, e0158619.
- Sakamoto, O., Suga, M., Suda, T., and Ando, M. (2001). Expression of discoidin domain receptor 1 tyrosine kinase on the human bronchial epithelium. *Eur. Respir. J.* 17, 969–974.
- Sawyers, C. (2004). Targeted cancer therapy. *Nature* 432, 294–297.
- Schermuly, R.T. (2005). Reversal of experimental pulmonary hypertension by PDGF inhibition. *J. Clin. Invest.* 115, 2811–2821.
- Schermuly, R.T., Ghofrani, H.A., Wilkins, M.R., and Grimminger, F. (2011). Mechanisms of disease: pulmonary arterial hypertension. *Nat. Rev. Cardiol.* 8, 443–455.
- Shapiro, S., Traiger, G.L., Turner, M., McGoan, M.D., Wason, P., and Barst, R.J. (2012). Sex differences in the diagnosis, treatment, and outcome of patients with pulmonary arterial hypertension

enrolled in the registry to evaluate early and long-term pulmonary arterial hypertension disease management. *Chest* 141, 363–373.

Shimizu, T., Fukumoto, Y., Tanaka, S. -i., Satoh, K., Ikeda, S., and Shimokawa, H. (2013). Crucial Role of ROCK2 in Vascular Smooth Muscle Cells for Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 33, 2780–2791.

Star, G.P., Giovinazzo, M., and Langleben, D. (2010). Bone morphogenic protein-9 stimulates endothelin-1 release from human pulmonary microvascular endothelial cells: A potential mechanism for elevated ET-1 levels in pulmonary arterial hypertension. *Microvasc. Res.* 80, 349–354.

Sun, M., Ramchandran, R., Chen, J., Yang, Q., and Raj, J.U. (2016). Smooth Muscle Insulin-Like Growth Factor-1 Mediates Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension in Neonatal Mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 55, 779–791.

Tenorio, J., Navas, P., Barrios, E., Fernández, L., Nevado, J., Quezada, C.A., López-Meseguer, M., Arias, P., Mena, R., Lobo, J.L., et al. (2015). A founder *EIF2AK4* mutation causes an aggressive form of pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies: *EIF2AK4* mutation causing pulmonary arterial hypertension in Iberian Gypsies. *Clin. Genet.* 88, 579–583.

Thenappan, T., Ormiston, M.L., Ryan, J.J., and Archer, S.L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: pathogenesis and clinical management. *BMJ* j5492.

Tojais, N.F., Cao, A., Lai, Y.-J., Wang, L., Chen, P.-I., Alcazar, M.A.A., de Jesus Perez, V.A., Hopper, R.K., Rhodes, C.J., Bill, M.A., et al. (2017). Codependence of Bone Morphogenetic Protein Receptor 2 and Transforming Growth Factor- β in Elastic Fiber Assembly and Its Perturbation in Pulmonary Arterial Hypertension. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 1559–1569.

Upton, P.D., and Morrell, N.W. (2013). The transforming growth factor- β -bone morphogenetic protein type signalling pathway in pulmonary vascular homeostasis and disease: Signalling pathways in pulmonary vasculature. *Exp. Physiol.* 98, 1262–1266.

Vaidya, B., Pangallo, M., Ruffenach, G., Cunningham, C.M., Perron, J.C., Kolluru, S., Eghbali, M., and Gupta, V. (2017). Advances in treatment of pulmonary arterial hypertension: patent review. *Expert Opin. Ther. Pat.* 27, 907–918.

Weatherald, J., Chaumais, M.-C., and Montani, D. (2017). Pulmonary arterial hypertension induced by tyrosine kinase inhibitors: *Curr. Opin. Pulm. Med.* 1.

Wilson, J.L., Yu, J., Taylor, L., and Polgar, P. (2015). Hyperplastic Growth of Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Subjects with Pulmonary Arterial Hypertension Is Activated through JNK and p38 MAPK. *PLOS ONE* 10, e0123662.

Zheng, Y., Ma, H., Hu, E., Huang, Z., Cheng, X., and Xiong, C. (2015). Inhibition of FGFR Signaling With PD173074 Ameliorates Monocrotaline-induced Pulmonary Arterial Hypertension and Rescues BMPR-II Expression: *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 66, 504–514.



Serment de Galien



« Je jure en présence des Maîtres de la Faculté, des Conseillers de l'Ordre des Pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque ».

RESUME

L'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP) est une maladie rare et incurable d'étiologies multiples. Plusieurs médicaments sont connus pour induire des HTAP. Parmi eux, un inhibiteur multi-kinase indiqué dans la LMC : le dasatinib, a récemment été relié à l'HTAP, ainsi que plusieurs autres inhibiteurs de protéines kinases (IPK); de nombreux éléments concernant la physiopathologie et les facteurs de risques de ces HTAP restent à élucider. Pour progresser sur cette pathologie, nous avons réalisé une étude combinant une approche de pharmacovigilance avec les propriétés pharmacodynamiques des IPK. L'analyse de disproportionnalité a montré que le dasatinib, mais aussi le bosutinib, le ponatinib, le ruxolitinib, le nilotinib et l'imatinib possédaient un signal de disproportionnalité significatif. L'analyse de corrélation pharmacodynamique, révèle une forte corrélation entre l'affinité pour c-src, c-yes, lck et lyn et la disproportionnalité du signal de pharmacovigilance. De plus, l'analyse des co-médications a révélé que les diurétiques, les insulines, les statines et les antihypertenseurs sont plus fréquemment associés aux cas d'HTAP sous dasatinib que les autres cas d'HTAP. C'est, à notre connaissance, la première analyse de pharmacovigilance qui étudie le risque d'HTAP associé aux utilisations IPK. L'étude met en évidence le rôle de la famille des protéines kinases SRC. Cette approche combinant les données pharmacovigilance et pharmacodynamique des médicaments permet la formulation d'hypothèses précoces sur la physiopathologie de la maladie, mais ces résultats doivent être confirmés. Ainsi, cette étude contribue à une meilleure compréhension de l'HTAP induite par les IPK.

ABSTRACT

Pulmonary arterial hypertension (PAH) remains a rare and incurable, life-threatening disease, induced by several etiologies. Few drugs are known to induce PAH. Among them, the multi tyrosine kinase inhibitor dasatinib was recently linked to PAH followed by other protein kinases inhibitors (PKI). Nevertheless the pathophysiology of PAH induced by PKI remains unclear. To gain knowledge into this pathology we performed a study combining a pharmacovigilance approach (disproportionality analysis) and the pharmacodynamics properties of PKI. A positive disproportionality signal was found for dasatinib, bosutinib, ponatinib, ruxolitinib, nilotinib and imatinib. Four non-receptors proteins kinase disclosed a significant correlation with the development of PAH: c-src, c-, Lck and Lyn, all belonging to the SRC family kinases. Moreover, a co-medication analysis revealed that diuretics, insulins, statins and antihypertensive drugs are more frequently associated in dasatinib PAH cases compared to other adverse event cases. Interestingly, in a cluster analysis the dasatinib profile seems different from other PKI. Consistently and based on in vitro and in vivo findings, PKI increase the risk of developing PAH but require a comparable genetic, epigenetic or environmental "second hit". This is to our knowledge, the first pharmacovigilance analysis which investigate the risk of PAH associated with PKI. The study highlights the role of SRC protein kinases family in PAH induced by PKI. These results have to be confirmed by further studies. Overall, this study contributes to a better understanding of PAH induced by PKI.