



**HAL**  
open science

**Les voies de signalisation calciques impliquées dans la  
réponse à l'étirement dans les artères intrapulmonaires.  
Modifications dans l'hypertension pulmonaire**

Guillaume Gilbert

► **To cite this version:**

Guillaume Gilbert. Les voies de signalisation calciques impliquées dans la réponse à l'étirement dans les artères intrapulmonaires. Modifications dans l'hypertension pulmonaire. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0179 . tel-01152567

**HAL Id: tel-01152567**

**<https://theses.hal.science/tel-01152567>**

Submitted on 18 May 2015

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

---

**Les voies de signalisations calciques impliquées dans la réponse  
à l'étirement au niveau des artères intrapulmonaires.  
Implication dans l'hypertension pulmonaire.**

---

**Guillaume GILBERT**

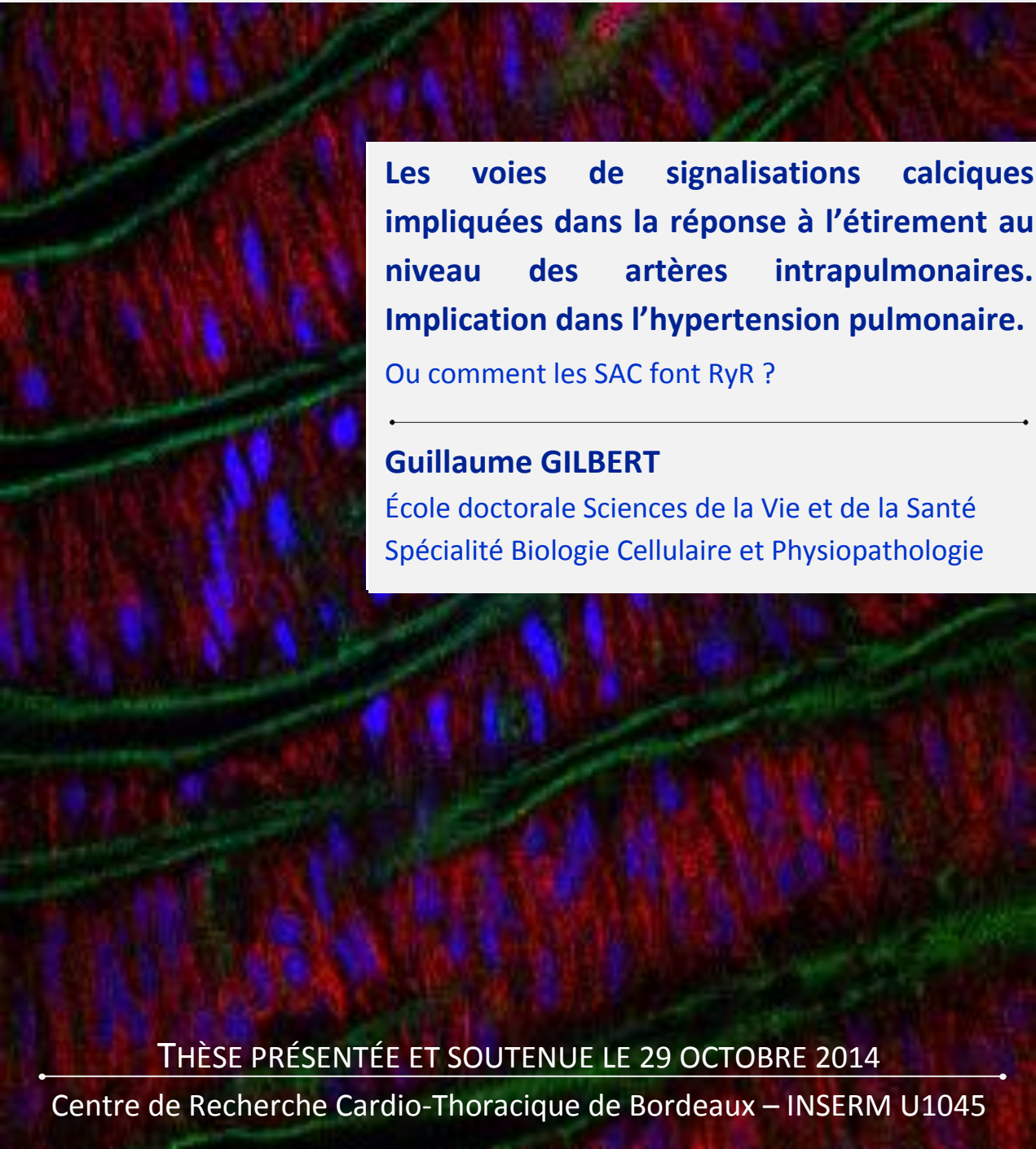
Né le 15 Juillet 1988

THÈSE PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 29 OCTOBRE 2014  
Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux – INSERM U1045

Membres du jury :

M. Olivier Bernus	Professeur, Université de Bordeaux	Président
M. Daniel Henrion	Directeur de Recherche, Université d'Angers	Rapporteur
M. Stéphane Hatem	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Jérémy Fauconnier	Chargé de Recherche, Université Montpellier 1	Examineur
M. Jean-François Quignard	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX



**Les voies de signalisations calciques  
impliquées dans la réponse à l'étirement au  
niveau des artères intrapulmonaires.  
Implication dans l'hypertension pulmonaire.**

Ou comment les SAC font RyR ?

---

**Guillaume GILBERT**

École doctorale Sciences de la Vie et de la Santé  
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

---

THÈSE PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE 29 OCTOBRE 2014

Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux – INSERM U1045

Membres du jury :

M. Olivier Bernus	Professeur, Université de Bordeaux	Président
M. Daniel Henrion	Directeur de Recherche, Université d'Angers	Rapporteur
M. Stéphane Hatem	Professeur, Université Pierre et Marie Curie	Rapporteur
M. Jérémy Fauconnier	Chargé de Recherche, Université Montpellier 1	Examineur
M. Jean-François Quignard	Professeur, Université de Bordeaux	Directeur de thèse

# TABLE DES MATIÈRES





<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	i
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	vi
<b>LISTE DES PUBLICATIONS</b> .....	ix
<b>COMMUNICATIONS ORALES ET POSTERS</b> .....	x
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	xI
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	xIII
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b> .....	xiv
<b>PRÉFACE</b> .....	xvii
<b>INTRODUCTION</b>	
<b>LES ARTERES INTRAPULMONAIRES</b> .....	<b>1</b>
1. LA CIRCULATION PULMONAIRE .....	1
2. LA COMPOSITION DES ARTERES INTRAPULMONAIRES .....	2
A. L'adventice .....	3
B. L'endothélium .....	3
C. La média .....	3
<b>LA REACTIVITE DES ARTERES INTRAPULMONAIRES</b> .....	<b>4</b>
1. LA CONTRACTION/RELAXATION DES CML .....	4
A. Les mécanismes moléculaires de la contraction des CML .....	4
B. Les mécanismes moléculaires de la relaxation des CML .....	4
C. Sensibilisation de l'appareil contractile au $Ca^{2+}$ .....	5
2. DIVERS STIMULI POUR UNE CONTRACTION – FOCUS SUR LE TONUS MYOGENIQUE .....	6
A. Le tonus myogénique .....	6
a) Tonus myogénique isobarique et isométrique .....	7
b) Tonus myogénique et $Ca^{2+}$ .....	8
B. Les canaux mécanosensibles .....	8
a) Les canaux TRP .....	10
i. Les canaux TRP dans les CML d'AIP .....	10
ii. Les canaux TRP sensibles à l'étirement .....	10
b) Les canaux mécanosensibles Piezo .....	11
i. Les canaux Piezo dans les cellules neuronales et associées .....	12
ii. Les canaux Piezo dans les cellules non neuronales .....	12
iii. Les canaux Piezo dans le poumon et les vaisseaux .....	13
iv. Mutations chez l'homme des canaux Piezo .....	14
C. Les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) .....	15
a) Les différentes isoformes de CCDV dans les artères pulmonaires .....	15
b) Composition des CCDV .....	15
c) Le pore du canal .....	16
d) Le senseur du voltage .....	16
e) Les inhibiteurs des CCDV .....	16
D. Les canaux $K_{Ca}$ .....	17
a) Généralités sur les canaux $K_{Ca}$ .....	17
b) Les canaux $BK_{Ca}$ .....	17
i. Le domaine pore .....	18
ii. La sensibilité au $Ca^{2+}$ .....	18

iii. La sensibilité au voltage.....	18
iv. Les inhibiteurs des $K_{Ca}$ .....	18
v. La modulation des $BK_{Ca}$ .....	18
E. Le tonus myogénique dans la circulation systémique .....	19
a) Artère cérébrale.....	19
b) Artère mésentérique .....	20
c) Autres artères systémiques .....	20
F. Tonus myogénique et SAC dans les artères pulmonaires.....	22
a) Les SAC dans les CML d'AIP de rats .....	22
b) Tonus myogénique et canaux TRPV4 dans les AIP .....	22
c) Tonus myogénique et endothélium.....	22
3. L'ENDOTHELIUM ET LES CELLULES ENDOTHELIALES .....	23
A. Les cellules endothéliales et la vasodilatation flux-dépendante .....	23
a) Voie du monoxyde d'azote (NO).....	23
b) Voie de l'EDHF.....	23
B. Les cellules endothéliales dans l'inflammation .....	24
4. LES ARTERES INTRAPULMONAIRES ET LA VASOCONSTRICTION HYPOXIQUE.....	26
5. LES CAVEOLES .....	27
A. La cavéoline : la protéine qui structure les cavéoles .....	28
a) Synthèse de la cavéoline et formation des cavéoles.....	28
i. Les isoformes de cavéoline.....	29
ii. Les souris KO pour la cavéoline .....	30
iii. Les cavéolines intracellulaires dans le trafic cellulaire .....	30
B. Les cavéoles comme réserve calcique .....	30
C. Cavéoles et mécanotransduction .....	31
a) Flux et cavéoles.....	31
b) Etirement et cavéoles .....	31
c) Ce mécanisme est-il présent dans les artères ?.....	32
d) Cavéoles et SAC.....	32
D. Expression de la cavéoline dans les CML d'AIP .....	33
<b>LES RESERVES CALCIQUES INTRACELLULAIRES .....</b>	<b>35</b>
1. LE $Ca^{2+}$ DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE .....	35
A. Les récepteurs à la ryanodine (RyR).....	35
a) Structure et fonction des RyR.....	35
b) Les différentes isoformes de RyR.....	36
c) La régulation des RyR.....	37
i. Le $Ca^{2+}$ : un activateur et un inhibiteur des RyR .....	37
ii. Les activateurs des RyR.....	39
iii. Les inhibiteurs des RyR .....	40
d) Les souris KO des RyR .....	40
e) Les pathologies associées aux RyR .....	40
B. Les récepteurs à l' $IP_3$ .....	40
C. Les pompes SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase) .....	42
a) Structure et fonction des SERCA.....	42
b) Les propriétés des différentes SERCA.....	42

c) Les souris KO pour les SERCA.....	44
d) Les activateurs et les inhibiteurs des SERCA.....	44
e) Les pathologies associées aux SERCA .....	44
D. Le système STIM/Orai pour la recharge du RE en $Ca^{2+}$ .....	45
2. LE $Ca^{2+}$ MITOCHONDRIAL .....	45
3. LE $Ca^{2+}$ DES LYSOSOMES .....	46
A. Les lysosomes dans l'homéostasie calcique .....	46
B. Les two-pore channels (TPC).....	47
C. Couplage calcique entre lysosomes et RE/RS .....	47
D. La recharge des lysosomes en $Ca^{2+}$ .....	48
E. Les inhibiteurs des TPC .....	49
4. LES RESERVES CALCIQUES DANS LES CML D'AIP.....	49
5. LES AGONISTES VASOCONSTRICTEURS.....	49
A. La sérotonine ou 5-HT.....	49
B. L'endothéline-1, un agoniste au centre des échanges calciques.....	50
a) Effet de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses.....	50
b) Effet de l'endothéline-1 sur les cellules endothéliales .....	50
6. CONCLUSION .....	51
<b>L'HYPERTENSION PULMONAIRE.....</b>	<b>52</b>
1. CLASSIFICATION DES HYPERTENSIONS PULMONAIRES.....	52
A. L'hypertension artérielle pulmonaire du groupe 1.....	54
a) HTAP héritable associée à une mutation génique.....	54
b) HTAP associées à une drogue ou à une toxine .....	54
B. L'hypertension pulmonaire du groupe 3 due à une hypoxémie.....	54
2. LE DIAGNOSTIC DE L'HTP, UN PROCESSUS A PLUSIEURS ETAPES .....	55
3. LES ALTERATIONS DU VENTRICULE CARDIAQUE DROIT DANS L'HTP .....	55
4. LES MODELES ANIMAUX D'HTP .....	56
A. HTP induite par la monocrotaline.....	56
B. HTP induite par une hypoxie chronique .....	56
C. Autres modèles animaux .....	57
5. LE PARADOXE DES HORMONES DANS L'HTP .....	57
6. LES CARACTERISTIQUES DE L'HTP .....	59
A. Les caractéristiques hémodynamiques.....	59
B. Le remodelage des AIP dans l'HTP .....	59
C. La dysfonction endothéliale.....	60
a) Les lésions endothéliales .....	60
b) Les lésions plexiformes .....	60
c) La néointima .....	61
d) La dysfonction endothéliale.....	61
D. Prolifération et migration des CML.....	62
E. Contraction des AIP dans l'HTP.....	64
a) Modification de la signalisation calcique dans l'HTP.....	64
i. Les canaux $K^+$ et CCDV dans l'HTP .....	64
ii. Les canaux TRP et l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}$ dans l'HTP.....	64
iii. L'homéostasie du RS des CML dans l'HTP .....	65

iv. Les CaSR dans l'HTP .....	65
b) Les agonistes vasoconstricteurs .....	66
c) L'endothéline-1 dans l'HTP .....	67
7. TONUS MYOGENIQUE DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE .....	68
8. LES CAVEOLES DANS L'HTP.....	69
9. LES TRAITEMENTS ACTUELS.....	71
A. Traitements symptomatiques.....	71
B. Les inhibiteurs calciques .....	72
C. Voie du NO .....	72
D. Voie de l'ET-1 .....	72
E. Voie de la prostacycline .....	73
F. Nouvelles cibles thérapeutiques.....	73
G. Transplantation pulmonaire et atrioseptostomie .....	74
<b>OBJECTIFS DE LA THÈSE.....</b>	<b>75</b>
<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	
1. LES RATS HYPOXIQUES CHRONIQUES (HC) ET MONOCROTALINES (MCT) : DEUX MODELES D'HTP.....	81
2. ISOLEMENT DES CELLULES MUSCULAIRES LISSES D'ARTERES INTRAPULMONAIRES DE RAT (CML D'AIP) .....	81
3. LES SONDAS CALCIQUES FLUORESCENTES, DES OUTILS POUR SUIVRE EN DIRECT LES FLUX CALCIQUES INTRACELLULAIRES .....	83
4. LES SONDAS FLUORESCENTES POUR LA DETECTION D'ORGANITES.....	85
5. ELECTROPHYSIOLOGIE PAR LA TECHNIQUE DE PATCH-CLAMP .....	85
A. Mesure des courants ioniques en mode voltage imposé.....	85
a) L'étirement par une pipette de patch-clamp .....	86
b) L'étirement par un choc osmotique .....	86
B. Mesure des variations de potentiel de membrane en mode courant imposé.....	87
6. LA MICROSPECTROFLUORIMETRIE EN INDO-1 EN SIMULTANE AVEC L'ELECTROPHYSIOLOGIE .....	87
7. CONTRACTION ISOMETRIQUES .....	88
8. IMMUNOFLUORESCENCE .....	88
A. Immunofluorescence sur cellules isolées .....	89
B. Immunofluorescence sur artère entière en « en face » .....	89
C. Immunofluorescence sur coupes d'artères .....	91
9. ANALYSE DE LA DISTRIBUTION ET DE LA COLOCALISATION DES PROTEINES .....	91
10. WESTERN BLOT (WB) .....	92
11. LES DIFFERENTS INHIBITEURS UTILISES .....	94
12. TESTS STATISTIQUES .....	94
<b>RÉSULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>ÉTUDE DES VOIES DE SIGNALISATION CALCIQUES INDUITES PAR L'ÉTIREMENT DANS LES CML D'AIP.....</b>	<b>97</b>
1. ACTIVITE DES SAC ET DES BK <sub>Ca</sub> EN FONCTION DU DEGRE D'ÉTIREMENT .....	122
2. IMMUNOMARQUAGES .....	123
A. Localisation des récepteurs à l'IP <sub>3</sub> sur les CML d'AIP.....	123
B. Marquage des RyR et SERCA2 sur artères entières .....	124
3. REPONSES CALCIQUES SANS CA <sup>2+</sup> EXTRACELLULAIRES CHEZ LES RATS MCT.....	125
4. DISCUSSION : LES SAC FONT RYR, UNE HISTOIRE DE LOCALISATION .....	126
<b>LES SERCA3 DANS LES ARTERES INTRAPULMONAIRES.....</b>	<b>129</b>

1. MISE EN EVIDENCE DES SERCA3 DANS LES AIP PAR WESTERN BLOT.....	129
2. MISE EN EVIDENCE DES SERCA3 DANS LES AIP PAR IMMUNOMARQUAGES.....	130
A. Immunomarquages sur coupes d'AIP .....	130
B. Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées et sur AIP en <i>en face</i> .....	130
3. LES SERCA3 DANS L'HOMÉOSTASIE CALCIQUE DES CML D'AIP.....	131
4. DISCUSSION AUTOUR DES SERCA3.....	133
<b>LES CAVEOLES SONT DES RESERVES CALCIQUES IMPLIQUEES DANS LA MECANOTRANSDUCTION DANS</b>	
<b>L'HYPERTENSION PULMONAIRE .....</b>	<b>135</b>
1. LA CAVEOLINE-1 EST EXPRIMEE DANS LES CML D'AIP ET FORME DES CAVEOLES.....	135
A. Immunomarquages de la Cav-1 .....	135
B. Expression de la Cav-1 dans l'AIP.....	135
C. Présence de cavéoles en microscopie électronique.....	135
2. EXPRESSION DE LA CAV-1 DANS LES AIP DE RATS HTP.....	137
A. Immunomarquages de la Cav-1 .....	137
B. Expression de la Cav-1 en western blot.....	139
3. LES CAVEOLES PARTICIPENT A LA SENSIBILITE A L'ETIREMENT DES CML D'AIP .....	140
4. LES CAVEOLES, UNE SOURCE DE $Ca^{2+}$ POUR LES CELLULES ?.....	142
A. Réponses à l'étirement en absence de $Ca^{2+}$ extracellulaire chez les rats HC .....	142
B. La source de ce $Ca^{2+}$ : un lien étroit entre cavéoles et réticulum sarcoplasmique.....	142
a) Cavéoles, réticulum et mitochondries.....	142
b) Cavéoline et RyR .....	144
5. DISCUSSION .....	146
A. Présence de cavéoles et expression de la Cav-1 dans les CML d'AIP .....	146
B. Les cavéoles comme réserves de membrane plasmique .....	147
C. Les cavéoles dans l'HTP, une histoire de $Ca^{2+}$ .....	147
a) Plus ou moins de cavéoles dans l'HTP ? .....	147
b) Cavéoles et mécanotransduction dans l'HTP .....	148
c) Les cavéoles comme réserve calcique.....	148
D. Les cavéoles sont-elles protectrices ou délétères dans l'HTP ?.....	149
E. Conclusion.....	149
<b>LES CANAUX MECANOSENSIBLES PIEZO DANS LE POU MON.....</b>	<b>151</b>
1. LES CANAUX PIEZO1 SONT EXPRIMES DANS LE PARENCHYME, L'AIP ET LA BRONCHE.....	151
A. Quel anticorps utiliser pour détecter Piezo1 ? .....	151
B. Piezo1 dans le poumon de rat .....	151
C. Expression de Piezo1 dans l'artère intrapulmonaire .....	152
2. CONCLUSION .....	154
A. Piezo1 dans le parenchyme pulmonaire.....	154
B. Piezo1 dans les bronches.....	154
C. Piezo1 au niveau des AIP .....	154
D. Limites de cette étude .....	154
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>156</b>
<b>VERS DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES.....</b>	<b>158</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>160</b>
<b>ANNEXES .....</b>	<b>189</b>

## Remerciements

---

La thèse est une expérience à la fois scientifique et humaine. Je tiens donc à remercier dans cette partie toutes les personnes qui ont compté pour moi depuis mon arrivée au laboratoire, du LPCR au CRCTB.

Tout d'abord mon directeur de thèse, le Professeur **Jean-François Quignard**, pour les connaissances que tu m'as apprises, tout ce que tu m'as apporté, sur le plan scientifique, humain et sur l'enseignement. Merci pour ton soutien, tes conseils, ta disponibilité, je garderai toujours un bon souvenir de toutes ces discussions qui font RyR, où l'on a essayé de garder la tête hors du SAC. La thèse n'est pas une aventure facile et tu as permis que mon travail se déroule dans les meilleures conditions possibles, ce fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Les Professeurs **Roger Marthan** et **Jean-Pierre Savineau** pour m'avoir accueilli au sein du Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux et dans l'équipe vasculaire pulmonaire. Merci pour vos conseils et pour m'avoir permis de partir en congrès lors de ma thèse, notamment au IUPS à Birmingham.

Je remercie également tous les membres de mon jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse, Messieurs les Professeurs **Olivier Bernus**, **Stéphane Hatem** et Messieurs les Docteurs **Daniel Henrion** et **Jérémy Fauconnier**.

Je tiens à remercier aussi toutes les personnes qui ont croisé ma route au laboratoire. À **Thomas Ducret**, pour ta gentillesse, ton humour et les bons conseils que tu m'as apportés. À **Christelle Guibert** pour les conseils que tu as pu me donner.

À **Lala** avec qui j'ai fait les TP et les TD. À **Frédéric Delom** et **Delphine Fessart**, pour toutes les discussions très intéressantes que l'on a pu avoir, ainsi que pour vos bons conseils sur le western blot. À **Mariette Lisbonne**, pour ta gentillesse, ton sourire et ton soutien, je suis ravi d'avoir croisé ta route. À **Polo Robillard**, dernière recrue au labo, j'ai passé de bons moments avec toi autour du western blot, à nous demander comment améliorer le procédé pour photographier de belles tâches sur une feuille. Même si tu prenais un malin plaisir à me charrier souvent, je suis ravi d'avoir fait ta connaissance. Merci également à **Marilyne Campagnac**, pour ton aide sur mes manip avec les rats et les discussions que l'on a pu avoir.

Petit tour du côté pharma : **Mathilde Dubois**, ton dynamisme, ton humour, ta spontanéité et toutes les discussions avec Jean-François auront rythmé cette thèse. Merci pour ton soutien, ce fut toujours un plaisir de passer par ton bureau et celui de **Véronique Michel** quand j'allais emprunter des trucs côté pharma. **Arnaud Courtois**, je te remercie pour ta gentillesse, tes conseils et surtout pour ces moments à parcourir la fac à la recherche de produits introuvables (le cholestérol de 1953 ou l'alun de chrome d'une date inconnue). Mais également à **Isabelle Baudrimont** avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer sur les cavéoles.

À **Elise Maurat**, grâce à toi le labo est toujours bien organisé, merci pour tes coups de gueule qui font leur effet. Ton dynamisme à toute épreuve fait que ce fut un plaisir de te côtoyer en salle immuno. Et puis sans oublier les personnes de l'équipe bronche : à **Imane**, avec qui j'ai partagé du collagène. À **Benoît Allard**, c'était sympa de collaborer avec toi sur les CML de bronches, ça m'a changé de l'artère. À **Isabelle Dupin** pour ton soutien pendant ce mois d'Août. Mais aussi à **Olga**, à **Thomas Trian** sans qui je n'aurais jamais eu le plaisir de nettoyer la salle immuno, un grand moment estival de 2012. À **Annaïg Ozier**, pour tout ce que tu as fait pour moi, pour le soutien que tu m'as apporté. Et enfin **Gabrielle Carvalho**, j'ai été ravi de faire ta connaissance, avec ton franc parlé, ta spontanéité. Je te remercie de m'avoir appris toutes ces précieuses astuces sur le western blot, merci pour ton amitié et ton soutien.

**Claude Vincendeau**, je n'oublierai jamais toute votre gentillesse et puis toutes ces histoires farfelues et improbables dont vous seule avez le secret. Et puis un grand merci pour avoir relu ma thèse et corrigé les coquilles. **Huguette Crevel**, je vous remercie pour tout, votre gentillesse, votre sourire et surtout toutes ces discussions pleines de piquant avec Jean-François. Qu'est ce que j'ai pu rigoler avec vous deux !

À **Jennifer Cattiaux**, pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu es vraiment super, on ne s'ennuie jamais avec toi et tes coups de gueule rythment, à raison, la vie au labo, je n'oublierais plus de mettre ma blouse et les gants, promis 😊. Je te remercie pour tous tes conseils, pour ton soutien tout au long de mes années ici, pour nos discussions informatiques et confocales, pour ton aide en tout genre, pour ta bonne humeur et ton dynamisme.

Un petit détour par le secrétariat à présent. **Lebna Mizani**, merci pour tous ces moments où je me suis réfugié sur cette petite chaise pas loin de ton bureau (plus ou moins bien caché). Mais aussi pour ta bonne humeur, pour m'avoir remonté le moral quand il le fallait, pour tous tes bons conseils, ta sagesse, tes spécialités marocaines. Et puis pour ces moments de mime où l'on a bien rit. Et puis merci pour les bonbons et autres sucreries sur ton bureau ^^.

À **Armelle Desvaux**, je crois que tu es la fan n°1 de mes tableaux en pastel secs et aquarelles. Grâce à toi, j'ai appris tout un tas d'expressions plus improbables les unes que les autres. Ton dynamisme à toute épreuve et ton caractère de feu feront toujours du secrétariat un endroit où l'on ne s'ennuie jamais, merci pour tout.

Je remercie également des personnes avec qui j'ai pu collaborer pendant ma thèse : **Sabrina Lacomme** de la plateforme du B.I.C de l'Université de Bordeaux, ainsi que ses collaborateurs pour la microscopie électronique à transmission ; **Régis Bobe** de l'unité INSERM U689 de Paris pour m'avoir fourni les anticorps anti SERCA2 et SERCA3. Mais aussi à **Jean-Luc Morel** avec qui j'ai travaillé sur le projet Piezo. C'était toujours un plaisir de passer par ton labo pour manipuler. Je te remercie, ainsi qu'à **M. Thierry Amédée** mon tuteur de thèse et **M. Didier Dulon**, d'avoir participé à mon jury de mi-thèse. Merci également à l'équipe de l'UMR-CNRS 5234 avec qui j'ai fait un stage entre mon Master 1 et mon Master 2. Et plus particulièrement **Mélanie Bonhivers** et **Derrick Robinson**, pour tous les bons conseils que vous avez pu me donner.



J'arrive à présent au **loft**, avec toutes les personnes avec qui j'ai partagé mon bureau. À commencer par **Diana Dahan** : ton dynamisme, ton sourire, ta joie de vivre auront fait de ces années au labo de super moments. Merci pour tout ce que tu m'as appris. **Florence Coste**, toujours prête à partir dans des histoires marrantes et des délires. Je crois que c'est officiel, tu as la Diegoattitude en toi. Je te souhaite bon courage pour la suite et pour tes deux super thèses ! À **Thibaud Parpaite**, mon collègue de SAC, pour ton soutien durant cette fin de thèse, c'est toujours un plaisir de discuter avec toi, toujours enrichissant. Je te souhaite bon courage pour la dernière année ! À **Elodie Bacle**, je te remercie pour ton amitié, tu as toujours été là pour moi. J'ai passé de supers moments avec toi et je garde un souvenir gourmand de l'atelier chocolat ! À **Andréa Bianchi**, grâce à toi j'aurais appris ce qu'est la vraie cuisine Italienne, même si j'ai toujours tendance à adapter les recettes à ma façon. Et puis le loft ne serait rien sans son annexe et les stagiaires qui y sont passé : **Virginie, Céline, Antonin, Guillaume, Marthe, Ninon, Khalil, Eva et Marie**, qui formela relève.

**Naf**, tu fais la transition entre les gens du labo et les amis que j'ai croisé dans ma vie. On est arrivé au même moment au labo et nos chemins ont continué ensemble pendant ces 4 années, du premier pH avec Huguette jusqu'à la rédaction de cette thèse. On aura vécu cette thèse, avec les hauts et les bas qu'elle apporte et je te remercie pour ton amitié, ton soutien, pour les découvertes culinaires (Santosha et Konnichiwa en tête) et les cinés. On aura aussi bien rigolé, entre délires photos, escapades à travers la fac, les congrès (Birmingham, « si tu le sais pas, tu le sais pas »). Merci ma chère Naf ☺.

Je tiens aussi à remercier tous mes amis. À **Marine** pour ton amitié, nos discussions sur skype et ton soutien. À **Bénédicte**, pour ton amitié pendant touuuuutes ces années. Et les potes du master 2 : à **Clémentine**, pour m'avoir soutenu lors du concours et surtout merci pour ton amitié depuis le master1. Et puis aussi à **Julien**, pour le cryostat et toutes les répliques cultes de *La Cité de la Peur* dans le jardinet de la fac avec **Marianne, Wilou, Damien, Flavien** et **Fiona**. À **Laure**, je crois que ça y est, on a réussi à écrire cette thèse à temps, c'était vraiment top de se soutenir pendant la fin de la rédaction. Merci pour ton soutien et puis pour le reste. Mais aussi à mes amis de licence, à **Marie** et à **Audrey** avec qui j'ai sûrement fait les meilleurs exposés PowerPoint, merci pour ton amitié, ta bonne humeur, nos discussions cuisine, pâtisserie et nos fou-rires. Et puis pour terminer, **Léa**, je te remercie pour tout ce que tu m'as apporté, avec un dynamisme à toute épreuve. J'ai passé de bons moments avec toi lors de ton stage au labo et ailleurs. Merci pour ta bonne humeur, tous tes conseils, ton soutien et ton amitié.

Pour finir, je tiens également à remercier bien chaleureusement **mes parents** qui m'ont toujours soutenu dans ma vie et dans mon parcours. Je vous remercie d'être toujours présent pour moi lorsque j'en ai besoin, merci pour ce que vous m'avez apporté, pour votre soutien à chaque instant, pour tout. Et à toute ma famille, vous avez toujours été là pour moi et c'est un immense plaisir, merci.

Et pour finir, cher lecteur, je vous souhaite une bonne lecture !

## Liste des publications

---

- **Stretch-induced  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in vascular smooth muscle cells depends on  $\text{Ca}^{2+}$  store segregation.** Gilbert G, Ducret T, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF. **Cardiovasc Res.** 2014 Jul 15. 103(2):313-23
- ↳ **Couverture du journal et éditorial** : Prieto-Lloret J, Aaronson PI. Intracellular remodelling of  $\text{Ca}^{2+}$  stores in pulmonary hypertension. **Cardiovasc Res.** 2014 Jul 15. 103(2):189-91
  
- **T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension.** Chevalier M, Gilbert G, Roux E, Lory P, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF. **Cardiovasc Res.** 2014 Sept 1. 103(4):597-606
  
- **Protease activated receptor-2 expression and function in asthmatic bronchial smooth muscle.** Allard B\*, Bara I\*, Gilbert G, Carvalho G, Trian T, Ozier A, Gillibert-Duplantier J, Ousova O, Maurat E, Thumerel M, Quignard JF, Girodet PO, Marthan R, Berger P. **PLOS ONE.** 2014 Feb 13. 9(2):e86945 \* Co-premiers auteurs.
  
- **Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels.** Chevalier M, Gilbert G, Lory P, Marthan R, Quignard JF, Savineau JP. **Biochem Pharmacol.** 2012 Jun 1. 83(11):1530-9
  
- **A MAP6-related protein is present in protozoa and is involved in flagellum motility.** Dacheux D, Landrein N, Thonnus M, Gilbert G, Sahin A, Wodrich H, Robinson DR, Bonhivers M. **PLOS ONE.** 2012;7(2):e31344

## Communications orales et posters

---

- **Octobre 2014** : Journées de la recherche respiratoire (J2R) – Bordeaux, France  
Caveolae are involved in stretch-induced calcium signaling in pulmonary hypertension
- **Septembre 2014** : Ion Channel Meeting – Oléron, France  
Caveolae are involved in stretch-induced calcium signaling in pulmonary hypertension
- **Juin 2014** : Journée de la Fédération de Recherche Tecsan – Talence, France  
Les canaux mécanosensibles Piezo1 dans les artères intrapulmonaires (**Prix poster**)
- **Septembre 2013** : CPC Summer Retreat « Lung Biology and Disease » – Tours, France
- **Juillet 2013** : International Union of Physiological Sciences (IUPS) – ICC Birmingham, United Kingdom  
Segregated calcium stores are important for stretch-induced calcium signaling in smooth muscle cells: implication in pulmonary hypertension. (**Prix poster**)
- **Juin 2013** : Journée Jeunes Chercheurs – Bordeaux, France  
L'hypertension pulmonaire, une pathologie où les SAC font RyR (**Prix communication orale**)
- **Octobre 2012** : Journées de la recherche respiratoire (J2R) – Institut Pasteur – Lille, France  
Interplay between stretch-activated channels and ryanodine receptors in pulmonary hypertension.
- **Avril 2012** : Printemps de la cardiologie GRRC – Palais des Congrès – Bordeaux, France  
Stretch-activated channels are coupled to ryanodine receptors in intrapulmonary arterial smooth muscle cells. Modifications in pulmonary hypertension.

---

## Liste des figures

---

<b>Figure 1</b> : Schéma du bloc cœur/poumons.....	1
<b>Figure 2</b> : Composition des artères intrapulmonaires.....	2
<b>Figure 3</b> : Mécanisme de contraction et de relaxation des CML.....	5
<b>Figure 4</b> : Représentation de la Loi de Laplace sur une artère.....	6
<b>Figure 5</b> : Contraction isobarique et isométrique .....	7
<b>Figure 6</b> : Différents mécanismes d'activation des SAC.....	8
<b>Figure 7</b> : les canaux sensibles à l'étirement (SAC - stretch-activated channels) .....	9
<b>Figure 8</b> : Activation des Piezo1 et Piezo2 sans une cellule Neuro2A.....	11
<b>Figure 9</b> : Les canaux Piezo.....	14
<b>Figure 10</b> : Canal calcique dépendant du voltage.....	16
<b>Figure 11</b> : Les canaux $K_{Ca}$ .....	19
<b>Figure 12</b> : Tonus myogénique dans les CML d'artères systémiques. ....	21
<b>Figure 13</b> : La vasodilatation flux dépendante .....	24
<b>Figure 14</b> : Voie d'actiation de zyxin dans les cellules endothéliales.....	25
<b>Figure 15</b> : Mécanismes de sécrétion du facteur de von Willebrand. ....	26
<b>Figure 16</b> : Mécanisme de la vasoconstriction hypoxique.....	27
<b>Figure 17</b> : les cavéoles.....	29
<b>Figure 18</b> : Effet de l'étirement sur les cavéoles.....	33
<b>Figure 19</b> : Expression de la cavéoline-1 dans les artères intrapulmonaires.....	34
<b>Figure 20</b> : Structure des récepteurs à la ryanodine.....	37
<b>Figure 21</b> : Les récepteurs à la ryanodine .....	38
<b>Figure 22</b> : Probabilité d'ouverture des RyR .....	39
<b>Figure 23</b> : Mécanisme de production d' $IP_3$ et $RIP_3$ .....	41
<b>Figure 24</b> : Structure génique et après épissage des SERCA.....	43
<b>Figure 25</b> : Interaction entre $Ca^{2+}$ du RE et mitochondrial.....	46
<b>Figure 26</b> : Le NAADP et les TPC.....	48
<b>Figure 27</b> : Voie de signalisation calcique de l'ET-1.....	51
<b>Figure 28</b> : Le paradoxe des œstrogènes dans l'HTP.....	58
<b>Figure 29</b> : Remodelage dans une AIP d'un sujet sain et d'un patient HTAP.....	59
<b>Figure 30</b> : Arbre pulmonaire dans l'HTP.....	60
<b>Figure 31</b> : Différents types de lésions endothéliales des AIP dans l'HTP.....	61
<b>Figure 32</b> : Muscularisation des petites AIP dans l'HTP .....	63
<b>Figure 33</b> : Voies de signalisations calciques dans l'HTP dans une CML d'AIP.....	66

---

<b>Figure 34</b> : Réactivité vasculaire aux agonistes vasoconstricteurs .....	66
<b>Figure 35</b> : Voie de l'ET-1 dans les CML de rats HTP. ....	67
<b>Figure 36</b> : Tonus myogénique chez les rats HTP. ....	69
<b>Figure 37</b> : Les cavéoles dans les AIP HTP. ....	71
<b>Figure 38</b> : Cibles thérapeutiques dans l'HTP. F. ....	73
<b>Figure 39</b> : Dissection de l'artère intrapulmonaire .....	81
<b>Figure 40</b> : Comparaison entre des CML sur des vaisseaux, fraîchement dissociées ou en culture.....	83
<b>Figure 41</b> : Structure chimique des sondes calciques fluorescentes. ....	84
<b>Figure 42</b> : Configuration cellule attachée et cellule entière .....	87
<b>Figure 43</b> : Exemple d'une trace calcique pour l'indo-1.....	88
<b>Figure 44</b> : Artère intrapulmonaire en « en face » et sur une coupe.....	90
<b>Figure 45</b> : Zones d'analyse au sein d'une cellule. ....	92
<b>Figure 46</b> : Courants entrant par les SAC et courants sortant par les BK <sub>Ca</sub> suite à un étirement .....	122
<b>Figure 47</b> : Immunomarquage de RyR1 et des IP <sub>3</sub> R sur CML d'AIP .....	123
<b>Figure 48</b> : Marquage en <i>en face</i> sur AIP de rats Nx des RyR et des SERCA2. ....	124
<b>Figure 49</b> : Choc osmotique 0 Ca <sup>2+</sup> chez le rat MCT. ....	125
<b>Figure 50</b> : Western Blot SERCA3.. ....	129
<b>Figure 51</b> : Immuno-marquages de SERCA3 sur des coupes d'AIP. ....	130
<b>Figure 52</b> : Immunomarquages de SERCA3 sur CML fraîchement dissociées et en « en face ». ....	131
<b>Figure 53</b> : Signalisation calcique en réponse à la caféine mesurée en indo-1.....	132
<b>Figure 54</b> : Les SERCA3 dans les CML d'AIP de rat .....	134
<b>Figure 55</b> : Expression de la Cav-1 dans les CML d'AIP. ....	136
<b>Figure 56</b> : Immunomarquage de la Cav-1 sur une coupe d'AIP de rat .....	137
<b>Figure 57</b> : Immunomarquage de la Cav-1 sur des AIP en <i>en face</i> de rat .....	138
<b>Figure 58</b> : Expression de la Cav-1 chez les rats HTP.....	139
<b>Figure 59</b> : Cavéoles et canaux mécanosensibles. ....	141
<b>Figure 60</b> : Contraction des AIP après un choc osmotique. ....	142
<b>Figure 61</b> : Mitochondries, RS et cavéoles. ....	143
<b>Figure 62</b> : Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées de RyR1 et Cav-1 .....	144
<b>Figure 63</b> : Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées de RyR3 et Cav-1 .....	145
<b>Figure 64</b> : Immunomarquages en face de RyR1 et Cav-1. ....	146
<b>Figure 65</b> : Cavéoles et mécanotransduction.....	150
<b>Figure 66</b> : Expression de Piezo1 sur des coupes de poumon de rats .....	152
<b>Figure 67</b> : Expression de Piezo1 sur une AIP en <i>en face</i> , sur CML et en western blot. ....	152
<b>Figure 68</b> : Expression de Piezo1 dans l'AIP de rat.....	153

## Liste des tableaux

---

<b>Tableau 1</b> : Classification des Hypertensions Pulmonaires.....	53
<b>Tableau 2</b> : Concentrations en mM des solutions utilisées .....	82
<b>Tableau 3</b> : Résumé des anticorps utilisés .....	94

---

## Liste des abréviations

---

[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>e</sub>	Concentration calcique extracellulaire
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentration calcique intracellulaire
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>m</sub>	Concentration calcique mitochondriale
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>RS</sub>	Concentration calcique du réticulum sarcoplasmique
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
AC	Anticorps
AIP	Artère intrapulmonaire
AM	Acétoxyméthylester
AT1R	Récepteur à l'angiotensine de type 1
ATP	Adénoside triphosphate
BMPR	Bone morphogenic protein receptor
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	Bovine serum albumine
CaM	Calmoduline
Cav	Cavéoline
CCDV	Canaux calciques dépendants du voltage
CE	Cellule endothéliale
CML	Cellule musculaire lisse
CPA	Acide cyclopiasonique
Ctrl	Contrôle
DAG	Diacylglycérol
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DT	Dantrolène
DTT	Dithiothréitol
E2	17β-estradiol
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarizing factor
ENG	Endoglin
eNOS	Nitric oxide synthase endothéliale
ER	Récepteur aux oestrogènes
ET-1	Endothéline-1
FKBP12	FK506 binding protein 12
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HC	Hypoxie chronique
HIF	Facteur inductible par l'hypoxie
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTP	Hypertension pulmonaire
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IbTx	Ibériotoxine
IP <sub>3</sub>	Inositol trisphosphate
IP <sub>3</sub> R	Récepteur à l'inositol trisphosphate
K <sub>ca</sub>	Canal potassique activé par le Ca <sup>2+</sup>

---

KO	Knock-out
MCT	Monocrotaline
MCU	Uniport calcique mitochondrial
MLC	Chaîne légère de la myosine
MLCP	Phosphatase de la chaîne légère de la myosine
MYPT1	Myosin phosphatase target subunit 1
M $\beta$ CD	Méthyl- $\beta$ -cyclodextrine
NAADP	Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate
NO	Monoxyde d'azote
ONOO <sup>-</sup>	Péroxinitrite
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anion superoxyde
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PFA	Paraformaldéhyde
PKG/A/C	Protéine kinase G/A/C
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasma membrane Ca <sup>2+</sup> ATPase
PP1	Protéine phosphatase 1
PBS	Phosphate buffer saline
PTB	PBS-Tween-BSA
RE	Réticulum endoplasmique
ROS	Reactive oxygen species
RS	Réticulum sarcoplasmique
RVP	Résistance vasculaire périphérique
RyR	Récepteur à la ryanodine
SAC	Stretch-activated channel
SERCA	Sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SVF	Sérum de veau fœtal
tBHQ	2,5-di(t-butyl)hydroquinone
TG	Thapsigargine
TPC	Two-pore channel
TRP	Transient receptor potential
VDAC	Voltage-dependent anion channels
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vWF	Facteur de Von Willebrand
XestoC	Xestospongine C
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ -smooth muscle actin





# PRÉFACE



L'hypertension pulmonaire (HTP) est l'une des principales pathologies de la circulation pulmonaire. Avec une prévalence d'environ 50 personnes par million d'adultes dans le monde, cette pathologie survient principalement chez les femmes autour de 40-50 ans. De diagnostic difficile, l'HTP est souvent décelée dans ses formes tardives. Cette maladie se caractérise par une élévation maintenue de la pression dans les artères intrapulmonaires (AIP). Chez les sujets sains, la pression artérielle pulmonaire moyenne au repos (PAPm) est d'environ 14 mmHg. L'HTP est déclarée chez les patients lorsque que la PAPm au repos est supérieure à 25 mmHg, sachant que l'on retrouve certains sujets présentant une PAPm au repos de plus de 90 mmHg, soit plus de 7 fois la valeur normale. Si l'on compare à l'hypertension systémique où la pression systolique passe de 110 mmHg à 250 mmHg dans les cas les plus sévères, l'augmentation de pression retrouvée dans l'HTP est nettement plus importante.

Si l'HTP n'est pas traitée, la pression au sein des AIP reste élevée, ce qui maintient une augmentation des résistances périphériques à l'écoulement du sang. Afin de rétablir un flux sanguin correct, c'est le cœur qui va s'adapter en augmentant son travail. Tel un muscle, le cœur va alors s'hypertrophier. Mais, alors que cette hypertrophie compensatoire a un but bénéfique dans un premier temps, des mécanismes vont entrer en jeu et conduire peu à peu à une insuffisance cardiaque et à la mort des patients. Il existe plusieurs traitements de l'HTP mais ceux-ci sont encore insuffisants, le taux de mortalité post-diagnostic restant élevé (environ 50% à 5 ans). Dans les cas les plus graves, la transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire est envisagée, même si elle comporte des risques et que l'espérance de vie postopératoire reste courte (environ 60% à 6 ans).

Les mécanismes impliqués dans le développement de l'HTP restent mal connus, notamment dans les formes idiopathiques de la maladie. Il apparaît donc important de comprendre les mécanismes qui entrent en jeu dans la pathologie et plus particulièrement au niveau cellulaire. Dans l'introduction, je présenterai les voies de signalisation calcique impliquées dans la régulation de la réactivité des AIP, notamment dans la mécanotransduction, d'abord en conditions physiologiques puis dans l'HTP. Ensuite, dans la partie résultats, je détaillerai comment un remodelage au niveau de l'organisation spatiale des réserves calciques intracellulaires sous-tend une dérégulation de l'homéostasie calcique dans l'HTP.



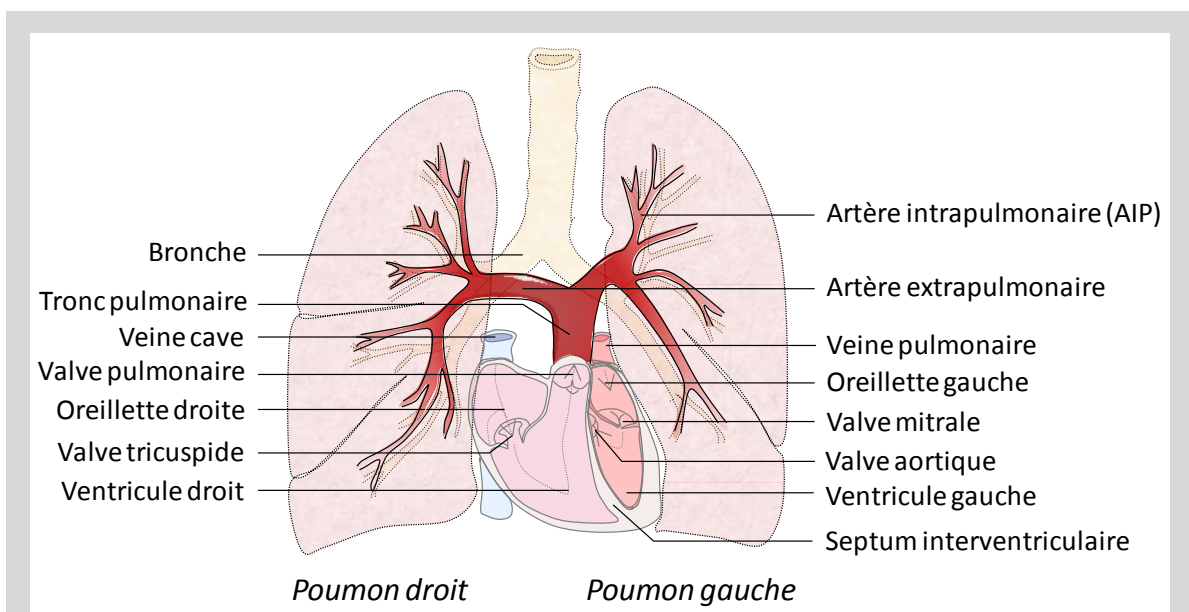
# INTRODUCTION



## Les artères intrapulmonaires

### 1. La circulation pulmonaire

Les artères pulmonaires permettent de faire circuler le sang du ventricule cardiaque droit jusqu'aux poumons et aux alvéoles pulmonaires où il est réoxygéné. Lors de la systole, le ventricule droit se contracte et éjecte le sang dans l'artère pulmonaire. Celle-ci pénètre dans le poumon où elle se ramifie en environ 17 embranchements chez l'homme (11 chez le rat) : de l'artère intrapulmonaire (AIP) principale aux artères de 2<sup>ème</sup>, 3<sup>ème</sup>, 4<sup>ème</sup> ordres, etc., jusqu'aux artérioles et aux capillaires. Au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, les échanges gazeux d'O<sub>2</sub> et de CO<sub>2</sub> s'effectuent entre le sang et les alvéoles des voies respiratoires. Ainsi, les artères pulmonaires font circuler un sang riche en CO<sub>2</sub> et pauvre en O<sub>2</sub>. Au niveau des alvéoles, le sang s'enrichit en O<sub>2</sub> avant de repartir par la veine pulmonaire jusqu'au cœur gauche. Ce sang riche en O<sub>2</sub> (P<sub>O<sub>2</sub></sub> = 100 mmHg) est ensuite distribué au reste de l'organisme par la circulation systémique (**Figure 1**).

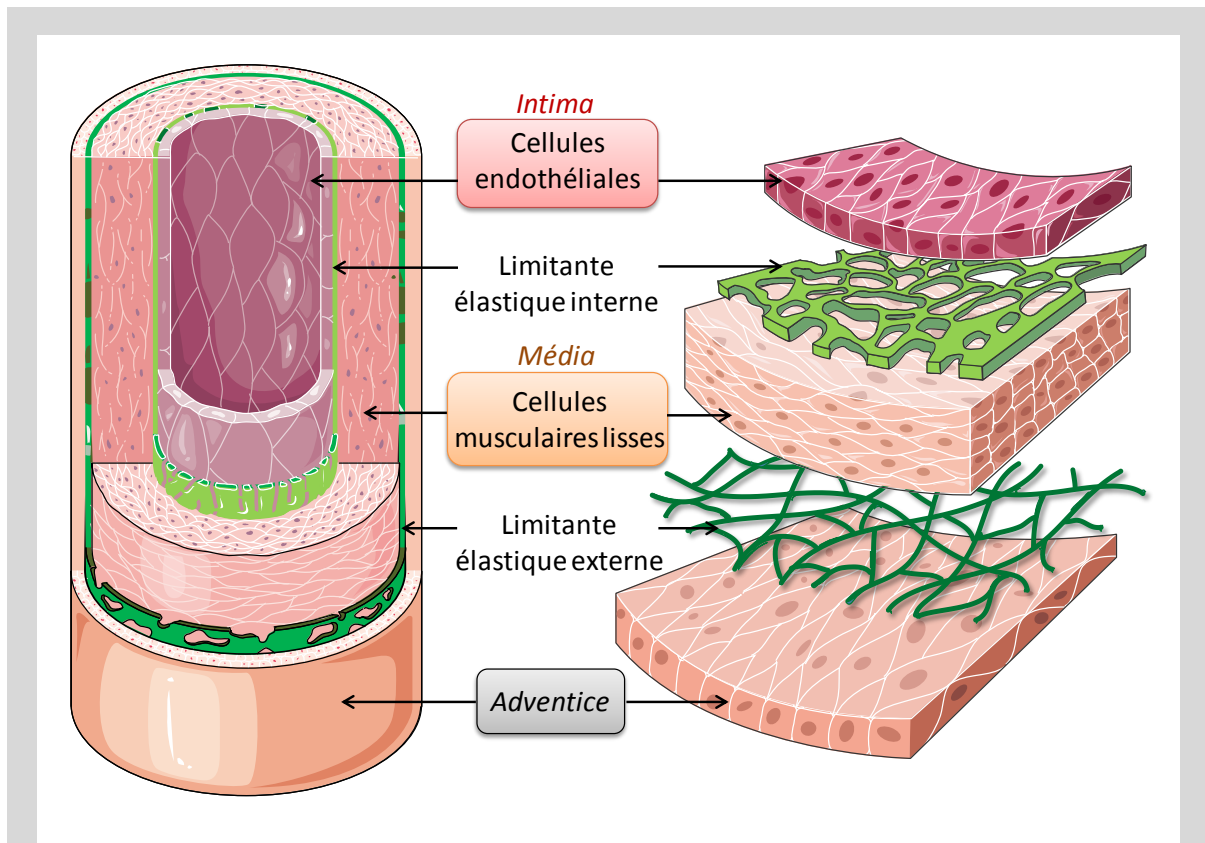


**Figure 1** : Schéma du bloc cœur/poumons. Le sang pauvre en O<sub>2</sub> et riche en CO<sub>2</sub> arrive au cœur droit *via* la veine cave. Depuis l'oreillette droite il passe dans le ventricule droit qui l'expulse dans les artères pulmonaires lors de la systole. Au niveau de la barrière alvéolocapillaire, le sang s'enrichit en O<sub>2</sub> et s'appauvrit en CO<sub>2</sub> avant de revenir au niveau de l'oreillette gauche par les veines pulmonaires et d'être expulsé dans l'aorte depuis le ventricule gauche.



## 2. La composition des artères intrapulmonaires

Les AIP se composent de différentes couches successives de cellules : les cellules endothéliales (**CE**) en contact direct avec le sang, les cellules musculaires lisses (**CML**) et enfin une couche composée de différents types cellulaires appelée l'adventice. Chacune de ces couches cellulaires est séparée par une limitante élastique (interne et externe) essentiellement composée de collagène et d'élastine (**Figure 2**).



**Figure 2** : L'intima est une monocouche de cellules endothéliales au niveau de la lumière des vaisseaux qui repose sur une la limitante élastique interne. Sous cette limitante se trouvent les cellules musculaires lisses qui reposent sur la limitante élastique externe. Enfin, l'adventice est une couche de cellules entourant la partie périphérique de l'artère pulmonaire. Schéma adapté de *Servier Medical art*.

### A. L'adventice

L'adventice est une tunique de cellules qui entoure les vaisseaux. Elle est essentiellement composée d'une matrice de collagène et d'élastine et de nombreux types cellulaires. On y trouve des fibroblastes, des cellules interstitielles à l'origine de la matrice et des cellules de l'immunité comme les mastocytes. C'est au niveau de l'adventice que les vaisseaux sont innervés par le système nerveux sympathique<sup>19</sup>. Enfin, les artères de gros diamètre sont également irriguées par de petits vaisseaux de la circulation systémique appelés les *vasa vasorum*<sup>20</sup>.

### B. L'endothélium

L'endothélium, ou intima, se compose d'une monocouche de cellules endothéliales (**CE**). En contact direct avec le sang, les CE sont impliquées dans la régulation du tonus vasculaire grâce à la sécrétion de facteurs vasodilatateurs, vasoconstricteurs et inflammatoires (en page 23).

### C. La média

Entre les limitantes élastiques interne et externe se trouvent les cellules musculaires lisses (**CML**). Ce sont des cellules contractiles qui entourent les artères d'un diamètre supérieur à 25  $\mu\text{m}$ <sup>21</sup>. Disposées de façon concentrique, les CML sont de forme allongée et sont disposées perpendiculairement aux cellules endothéliales. De par leur capacité à se contracter et à se relâcher, elles sont responsables du tonus des vaisseaux et régulent le diamètre et la pression dans les artères.

→ Le contrôle de l'état contractile des CML est assuré par différents mécanismes qui agissent sur la concentration calcique intracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ). En effet, ce qui initie la contraction des CML est l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

---

## La réactivité des artères intrapulmonaires

---

### 1. La contraction/relaxation des CML

#### A. Les mécanismes moléculaires de la contraction des CML

Les CML sont composées de deux types de filaments contractiles : les filaments fins d' $\alpha$ -actine et les filaments épais de myosine. Les filaments d'actine sont stabilisés par des protéines associées telles que la tropomyosine, la caldesmone et la calponine. Les filaments épais de myosine sont constitués d'une chaîne lourde qui forme la tête globulaire de la myosine et qui contient une chaîne légère de 20 kDa (« myosine light chain » = MLC). Le déclencheur de la contraction est l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Lorsque le  $Ca^{2+}$  augmente, celui-ci se fixe à la calmoduline (CaM) qui change de conformation. Une molécule de CaM peut lier 4 ions  $Ca^{2+}$ . Le complexe  $Ca^{2+}/CaM$  se fixe ensuite sur la kinase de la chaîne légère de la myosine (MLC kinase) qui devient active. La MLC kinase, grâce à l'énergie fournie par l'ATP, phosphoryle la MLC au niveau de la sérine 19. Cette phosphorylation de la MLC entraîne un déplacement de la tête globulaire de la myosine qui se fixe à l'actine. Puis, l'activité intrinsèque ATPasique de la MLC hydrolyse l'ATP qu'elle contient, ce qui fournit l'énergie nécessaire au glissement de la fibre de myosine sur l'actine, entraînant un raccourcissement des fibres d'acto-myosine et la contraction<sup>22</sup> (**Figure 3**).

#### B. Les mécanismes moléculaires de la relaxation des CML

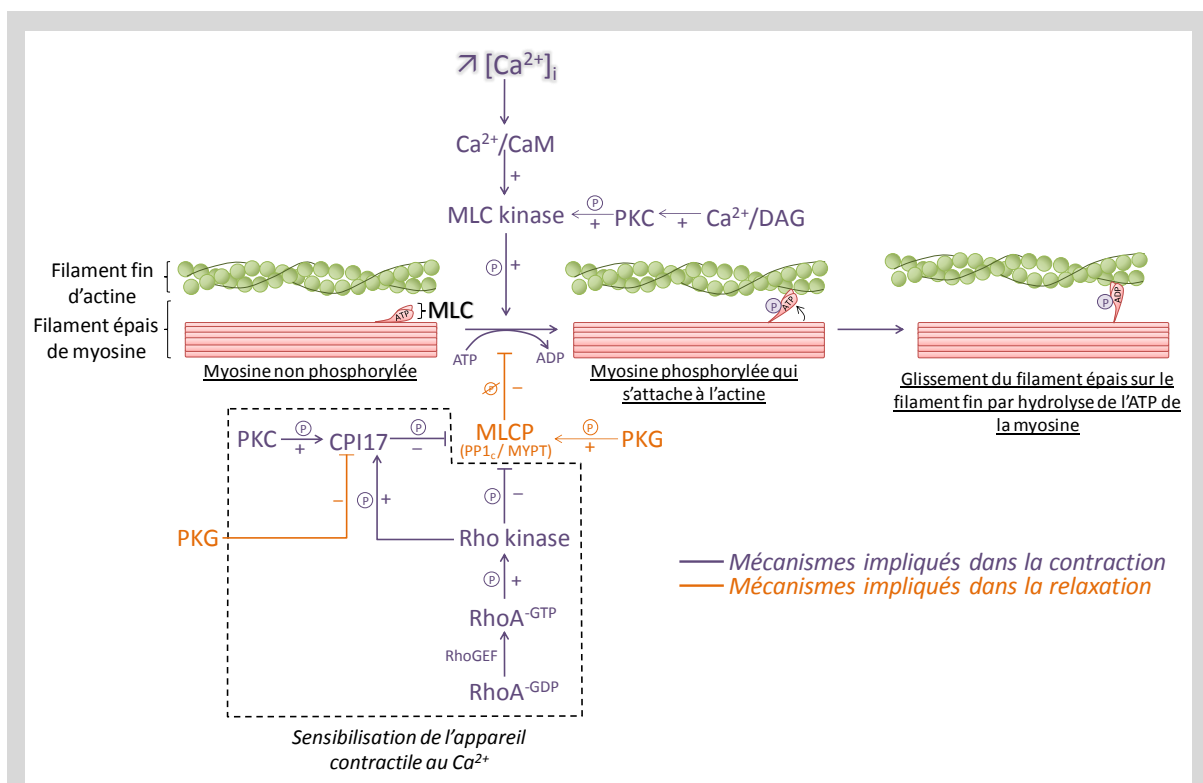
Ainsi, tant que la myosine est phosphorylée, celle-ci peut se lier à l'actine et la cellule reste contractée, avec une dépense énergétique faible. La déphosphorylation de la MLC s'effectue par la MLCP (phosphatase de la chaîne légère de la myosine) qui se compose de deux sous-unités : une large sous-unité régulatrice MYPT1 (« myosine phosphatase target ») et une sous-unité catalytique  $PP1_{c\delta}$  (« protéine phosphatase ») qui porte l'activité phosphatase. L'activité de la MLCP peut être augmentée par différentes voies qui activent la protéine kinase G (PKG). Cette dernière agit soit en levant l'inhibition induite par le CPI17 (« C-kinase potentiated protein phosphatase 1 ») sur la MLCP, soit en phosphorylant directement la sérine 695 de la sous-unité MYPT1 de la MLCP<sup>23, 24</sup>. De plus, la diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  entraîne une dissociation du complexe  $Ca^{2+}/CaM$  et lève l'effet contractant induit par la MLC kinase (**Figure 3**). Il existe donc une balance entre l'effet de la MLC kinase et de la MLCP sur la contraction des CML. Lorsque le  $Ca^{2+}$  augmente, l'activité de la MLC kinase dépasse celle de la MLCP et inversement quand la  $[Ca^{2+}]_i$  diminue. À l'état basal, la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CML est comprise entre 100 et 200 nM. À cette concentration, toute la myosine n'est pas phosphorylée et les CML ne sont pas totalement dans un état relâché ou contracté, ce qui permet de maintenir un tonus de base des artères. Ainsi, les artères peuvent se dilater ou se contracter.

### C. Sensibilisation de l'appareil contractile au $\text{Ca}^{2+}$

Une autre régulation de la contraction peut se faire indépendamment du  $\text{Ca}^{2+}$  en empêchant la MLCP d'agir. Il existe deux mécanismes majoritaires qui inhibent la MLCP et donc interviennent dans ce que l'on appelle la sensibilisation de l'appareil contractile au  $\text{Ca}^{2+}$ . La première voie fait intervenir le système RhoA/Rho kinase. RhoA est une petite protéine G monomérique. Dans sa forme inactive, elle est liée au GDP ( $\text{RhoA}^{\text{GDP}}$ ). Le facteur échangeur de nucléotide RhoGEF permet de transférer un GTP à la RhoA qui devient alors active ( $\text{RhoA}^{\text{GTP}}$ ). Cette dernière peut alors phosphoryler la Rho kinase qui phosphoryle la sous-unité MYPT1 sur sa thréonine 696. Cette phosphorylation masque celle de la PKG au niveau de la sérine 695, rendant la MLCP inactive<sup>25, 23, 24</sup> (**Figure 3**).

La seconde voie de régulation de la MLCP est le CPI17 qui peut être activé par une phosphorylation de la PKC. Le CPI17 agit en phosphorylant la  $\text{PP1}_{\text{c}\delta}$  et la MYPT1 sur une thréonine 696, ce qui l'inactive. De plus, un système de rétrocontrôle positif entre les deux voies existe puisque la Rho kinase peut également phosphoryler la CPI17 et l'activer<sup>23, 25</sup> (**Figure 3**).

Enfin, l'acide arachidonique est également capable d'inhiber la MLCP en dissociant les deux sous-unités  $\text{PP1}_{\text{c}\delta}$  et MYPT1<sup>25</sup>.



**Figure 3** : Résumé des voies de signalisation impliquées dans la contraction des cellules musculaires lisses.

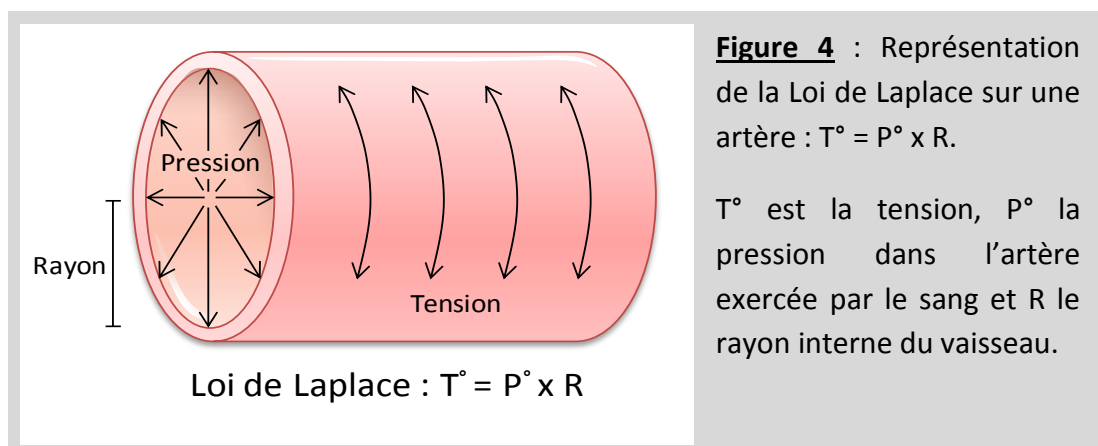
## 2. Divers stimuli pour une contraction – focus sur le tonus myogénique

Différents stimuli perçus par les AIP ont pour effet d'induire leur contraction *via* une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . Ainsi, les AIP sont à la fois soumises à des agents hormonaux (comme l'endothéline-1 ou la sérotonine) et à des forces mécaniques induites par la pression exercée sur la paroi des artères. En fonction de ces différents stimuli, l'AIP est capable d'adapter une réponse biologique afin de maintenir un tonus. Cependant, alors que les voies de signalisation en réponse à des stimuli hormonaux sont relativement bien décrites dans l'AIP, les voies de signalisation calciques générées par les forces mécaniques développées par la pression du sang sont beaucoup moins connues.

### A. Le tonus myogénique

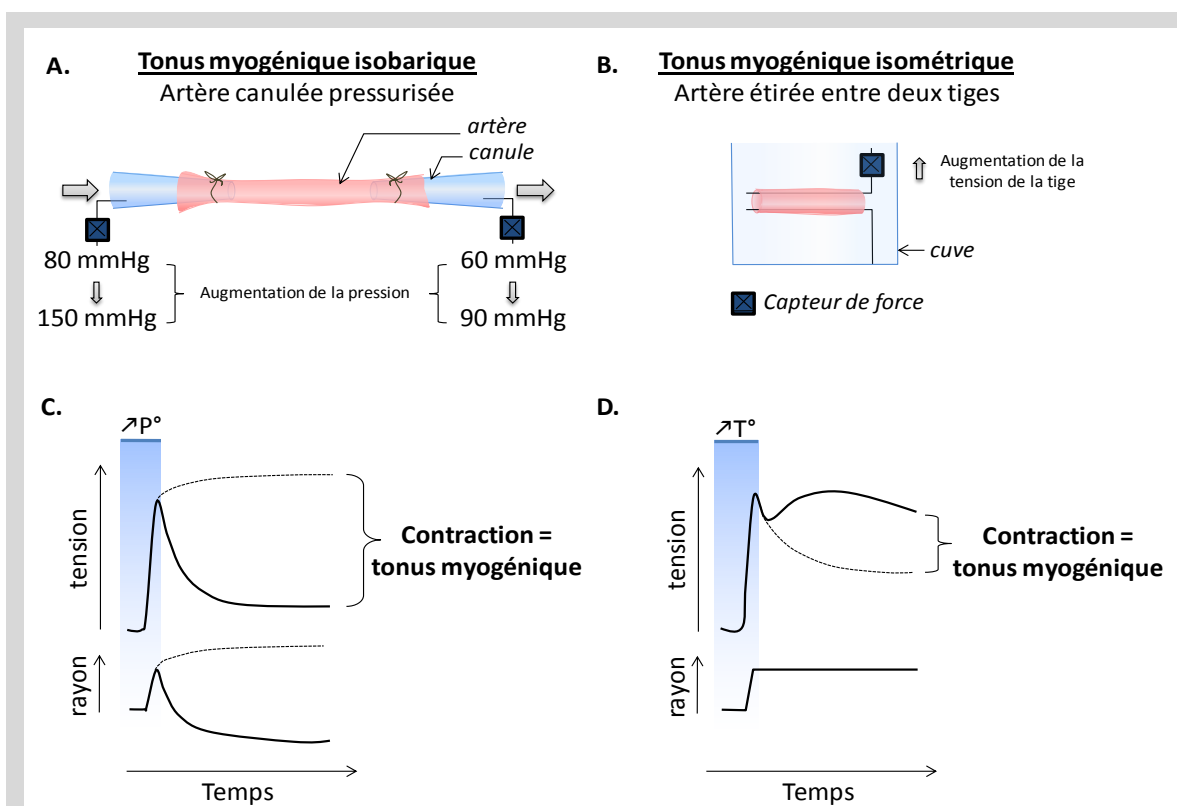
Les artères sont capables d'adapter leur tonus en fonction de la pression du sang. En effet, une diminution de la pression induit une vasodilatation et une augmentation de la pression induit une vasoconstriction, c'est ce que l'on appelle le **tonus myogénique**. Décrit depuis 1902 par le physiologiste Sir William Maddock Bayliss<sup>26</sup>, le tonus myogénique a été décrit dans les AIP de cobaye<sup>27</sup>, de lapin<sup>28, 29</sup>, de mouton<sup>30</sup> et de chat<sup>31</sup> depuis la fin des années 1980. Cependant, sa présence dans les AIP de rats n'est décrite que depuis 2008<sup>3, 6, 32</sup> (même si elle reste controversée en fonction des lignées de rats<sup>6, 33</sup>) et n'a, à ce jour, pas encore été montrée directement dans les AIP chez l'homme.

Lorsque la pression augmente, les forces de tension sur la paroi des artères augmentent selon la loi de Laplace :  $T^\circ = P^\circ \times R$  où  $T^\circ$  est la tension ;  $P^\circ$  la pression et R le rayon de l'artère (**Figure 4**). Il ne faut pas confondre les forces de tension pariétales qui sont perpendiculaires à la paroi du vaisseau avec les forces de cisaillement induites par le flux du sang qui sont parallèles à la paroi de l'artère (en page 23). Dans les petites artères, cette contraction en réponse à une élévation de la pression permet d'éviter que cette trop forte pression n'arrive aux capillaires afin de les protéger et de maintenir leur pression hydrostatique. De plus, le tonus myogénique permet aux artères d'avoir un tonus basal qui est nécessaire à la vasodilatation. En effet, seule une artère préalablement contractée peut se dilater<sup>34</sup>.



a) Tonus myogénique isobarique et isométrique

Il convient de distinguer deux types de tonus myogéniques réalisés *in vitro* sur les artères : isométrique ou isobarique. Le tonus myogénique isométrique s'observe lorsqu'une artère est tendue entre deux tiges métalliques (cuves à organe isolé), l'une des tiges étant fixe et l'autre reliée à un capteur de force qui donne la tension. Selon la loi de Laplace, lorsque l'on augmente artificiellement le rayon de l'artère, la tension augmente puis rediminue pour réatteindre un état d'équilibre. Ainsi, lors du tonus myogénique, si l'artère se contracte et que le rayon reste constant, la tension mesurée va augmenter (**Figure 5B et D**). Lors de la contraction isobarique, l'artère est canulée et pressurisée. Lorsque l'on augmente la pression, la tension et le rayon augmentent. Puis, lors du tonus myogénique, l'artère se contractant, son rayon et sa tension diminuent (**Figure 5A et C**)<sup>34</sup>.



**Figure 5 : A. Contraction isobarique.** L'artère est canulée et pressurisée entre deux pipettes de verre. Une différence de pression est appliquée entre le début et la fin de l'artère afin de créer un débit. **C.** Lorsque l'on augmente la pression dans l'artère, le rayon et la tension augmentent. Si l'artère se contracte en conséquence, son rayon et sa tension diminuent, c'est le tonus myogénique. La courbe en pointillés représente l'allure de la courbe s'il n'y avait pas de tonus myogénique (phénomène passif selon la loi de Laplace). **B. Contraction isométrique.** L'artère est placée dans une cuve et étirée entre deux tiges métalliques dont l'une est reliée à un capteur de force. **D.** Lorsque l'on étire l'artère (augmentation de la tension), son rayon et sa tension augmentent. Si l'artère se contracte, la tension réaugmente alors que le rayon ne bouge pas, c'est le tonus myogénique. La courbe en pointillés représente la tension lorsqu'il n'y a pas de tonus myogénique, c'est une relaxation passive de l'artère après l'étirement initial.

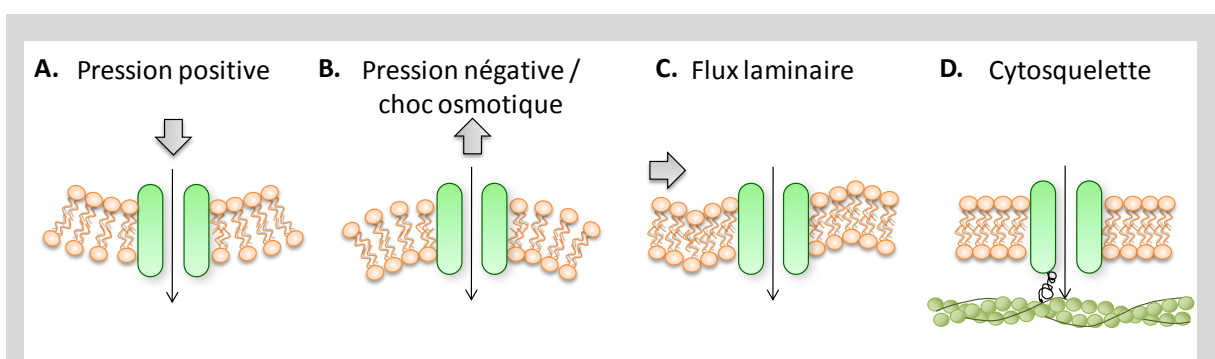
## b) Tonus myogénique et Ca<sup>2+</sup>

Le tonus myogénique est lié à la contraction des CML et donc à une augmentation de leur [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Cependant, d'où provient ce Ca<sup>2+</sup>? La plupart des études sur le tonus myogénique, y compris dans l'AIP, montrent qu'en l'absence de Ca<sup>2+</sup> dans le milieu extracellulaire, les artères ne répondent plus au tonus myogénique. Il existerait donc des mécanismes qui, suite à une contrainte mécanique comme un étirement, provoquent une entrée de Ca<sup>2+</sup> depuis le milieu extracellulaire dans les CML. Pour entrer dans les cellules, le Ca<sup>2+</sup> peut transiter par des canaux et nous allons plus particulièrement nous intéresser ici aux canaux mécanosensibles.

### B. Les canaux mécanosensibles

Le mécanisme par lequel une cellule peut ressentir et transduire un stimulus mécanique en une réponse biologique s'appelle la mécanotransduction. Cette mécanotransduction est apparue très tôt dans l'évolution afin de permettre aux cellules de répondre à la pression osmotique de l'environnement extracellulaire<sup>35</sup>.

À la surface des CML vasculaires, on retrouve des canaux mécanosensibles appelés des SAC (« stretch-activated channels »)<sup>36-39</sup>. Ils sont activés par une force physique exercée sur la membrane plasmique des cellules : une pression, un étirement, un choc osmotique ou un flux (**Figure 6A, B et C**)<sup>40</sup>. Ainsi, plus la membrane plasmique va être étirée, plus la probabilité d'ouverture des SAC va augmenter. Leur ouverture induit un courant d'ions tels que du Na<sup>+</sup>, du Ca<sup>2+</sup>, du K<sup>+</sup> ou du Cl<sup>-</sup>, ils sont donc non sélectif et présentent une conductance comprise entre 20-50 pS<sup>38</sup>. Les SAC sont donc à la fois des senseurs et des effecteurs puisque leur activation et leur ouverture peuvent induire un influx de Ca<sup>2+</sup> qui peut être impliqué dans la contraction des CML (**Figure 7A et B**)<sup>41</sup>.

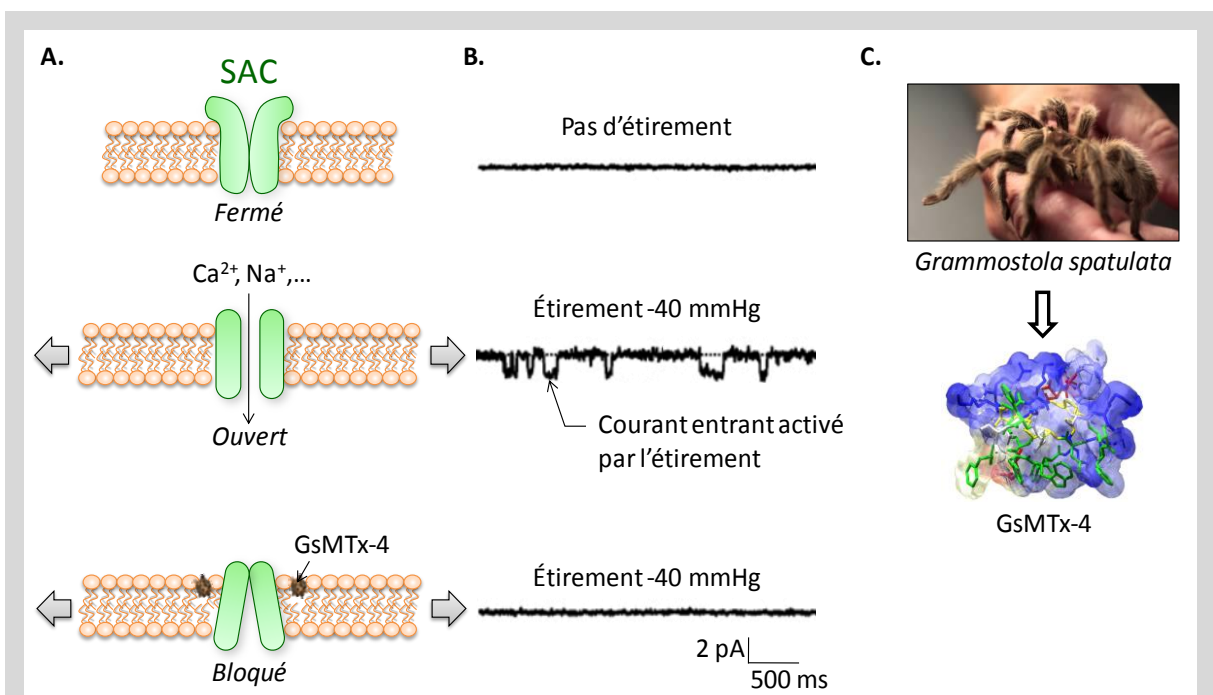


**Figure 6** : Différents mécanismes d'activation des SAC. **A.** Une surpression positive sur la membrane plasmique. **B.** Un étirement par une dépression négative de la membrane plasmique ou un choc osmotique. Le choc osmotique fait entrer de l'eau dans la cellule qui gonfle, ce qui étire sa membrane de l'intérieur. **C.** Un flux laminaire : c'est une force parallèle à la membrane plasmique. **D.** Certains modèles montrent que le cytosquelette via une association aux SAC, est impliqué dans leur activation.



Une autre propriété des SAC est d'être inactivés par un peptide issu du venin de la tarentule *Grammostola spatulata* : la GsMTx-4 (**Figure 7C**)<sup>42</sup>. Le peptide agit en s'insérant dans la membrane plasmique grâce à sa charge positive. Il s'y insère à ~0,9 nm du centre de la bicouche lipidique et interagit avec les phospholipides de la face extracellulaire qui entourent le SAC. Seul le courant entrant est bloqué par le peptide, le courant sortant étant inaffecté. La GsMTx-4 modifie donc la fermeture/ouverture du canal (« gating »), sans en bloquer le pore<sup>8</sup>. D'autres molécules sont utilisées pour bloquer les SAC, bien qu'elles soient moins sélectives : le gadolinium ( $Gd^{3+}$ ), la streptomycine ou le rouge de ruthénium.

Différents mécanismes ont été proposés pour l'activation des SAC. Ils peuvent directement s'activer suite à une tension exercée sur la bicouche lipidique (par une surpression, une dépression ou un flux). Cependant, de nombreuses hypothèses suggèrent également un rôle primordial du cytosquelette dans l'activité des SAC<sup>43-47</sup>. Le cytosquelette permettrait d'absorber les forces mécaniques et osmotiques perçues par les cellules et interviendrait dans la stabilité de la membrane plasmique (**Figure 6**).



**Figure 7** : les canaux sensibles à l'étirement (SAC - stretch-activated channels). **A.** Modèle d'activation des SAC suite à un étirement de la membrane plasmique. *En haut* : canal fermé ; *au milieu* : canal ouvert ; *en bas* : canal bloqué par la GsMTx-4. **B.** Courants unitaires en configuration cellule attachée d'une CML d'AIP de rat, suite à un étirement de -40 mmHg en absence et en présence de GsMTx-4<sup>3</sup>. **C.** Rosie, la tarentule *Grammostola spatulata* du Pr. Frederick Sachs, de laquelle est extraite le peptide inhibiteur des SAC : la GsMTx-4<sup>8</sup>. Crédit photo : Pr. Frederick Sachs.



Toutefois, bien que les propriétés électrophysiologiques des SAC soient connues, leur nature moléculaire reste à ce jour inconnue. Néanmoins, de nombreux canaux sont candidats pour être des SAC. Parmi ces canaux, on retrouve notamment les canaux de la famille TRP (Transient Receptor Potential) et plus récemment les canaux Piezo.

#### a) Les canaux TRP

Les canaux TRP représentent une superfamille qui se divise en six sous-familles majeures chez les mammifères : TRPC (canonical 1-7), TRPV (vanilloïde 1-6), TRPM (melastatin 1-8), TRPP (polycystin 1-5), TRPML (mucopilin 1-3) et TRPA (ankyrin 1)<sup>48, 49</sup>. Chacun de ces canaux peut être activé par différents stimuli, que ce soit la lumière, la chaleur, le froid, les lipides, l'acide, l'hypoxie, le Ca<sup>2+</sup>, l'étirement, l'osmolarité ; ce sont donc des canaux multimodaux<sup>38, 40, 48</sup>. Les canaux TRP, associés en homo ou hétérotétramères<sup>50</sup> se composent de 6 domaines transmembranaires dont une boucle entre les segments S5 et S6 qui forme le pore du canal permettant le passage des ions. Ces canaux laissent transiter de nombreux ions et chacun d'eux présente une sélectivité particulière, que ce soit pour le Ca<sup>2+</sup>, le Na<sup>+</sup>, le K<sup>+</sup> ou le Mg<sup>2+</sup> par exemple<sup>38, 51</sup>.

##### i. Les canaux TRP dans les CML d'AIP

Les CML d'AIP, de rat et d'homme, expriment de nombreuses isoformes de TRP<sup>52</sup>. Au niveau protéique, on retrouve les isoformes TRPC1<sup>53-58</sup>, TRPC3<sup>59, 60</sup>, TRPC4<sup>54, 57, 58</sup>, TRPC6<sup>55, 57, 58, 61, 62</sup>, TRPV1<sup>63, 64</sup>, TRPV2<sup>32</sup>, TRPV4<sup>32, 64-67</sup>, TRPM2<sup>64</sup>, TRPM7<sup>65</sup>, TRPM8<sup>32, 64, 68</sup> et au niveau de l'ARNm, les isoformes TRPC2<sup>69</sup>, TRPC5<sup>69</sup>, TRPC7, TRPV3<sup>63, 64, 70</sup> et TRPM1 à M6<sup>32, 64</sup>. Cependant, en fonction des articles et des amorces utilisées pour détecter les ARNm, les isoformes TRPC2<sup>60</sup>, TRPC5<sup>59</sup> et plus particulièrement TRPC7<sup>59, 69</sup> sont controversées dans la littérature. Les isoformes TRPV5<sup>32, 64</sup> et TRPV6<sup>32, 64</sup> ne sont pas exprimées dans les AIP et la présence ou l'absence des TRPP et TRML n'a, à ce jour, pas été décrite.

##### ii. Les canaux TRP sensibles à l'étirement

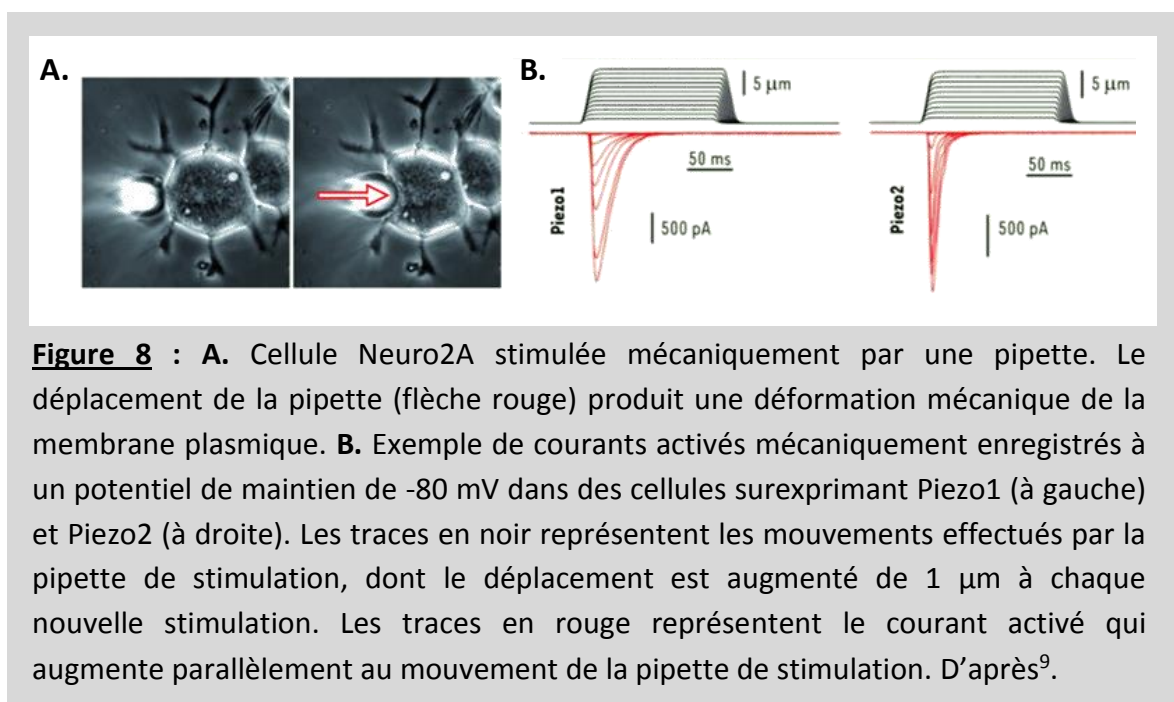
Parmi tous ces canaux TRP, certains sont activés directement ou indirectement par l'étirement : TRPC1, C3, C5, C6, V1, V2, V4, M4, M7, A1 et TRPP2. Néanmoins, leur activation directement par un étirement mécanique reste controversée dans la littérature puisqu'ils sont soit indirectement activés par l'étirement (TRPC1, C3, C6, M4, M7, A1, TRPP2), soit inactivés par l'étirement (TRPV1), soit sensibles à une hypo-osmolarité (TRPV4, M7), soit activés par un flux laminaire (TRPV4, M7, TRPP2)<sup>50, 51, 71</sup> (**Figure 6**). Seuls les canaux TRPV2 semblent être directement activés par l'étirement<sup>72</sup>. Enfin, plusieurs TRP peuvent s'associer entre eux, comme TRPV4, TRPC1 et TRPP2 qui forment un canal hétéromérique sensible au flux<sup>73</sup>.

Ainsi, de nombreux canaux TRP sont impliqués dans la mécanotransduction mais leur rôle en tant que SAC *per se*, reste encore aujourd'hui controversé dans la littérature en raison des stimuli différents qui les active (flux, étirement ou choc osmotique). Cependant,

depuis 2010, de nouveaux canaux, directement sensibles à l'étirement ont été découverts : Piezo1 et Piezo2 et forment de parfaits candidats aux SAC<sup>74, 75</sup>.

#### b) Les canaux mécanosensibles Piezo

L'identification des canaux Piezo en tant que SAC a été réalisée par criblage de siARN sur une lignée de neuroblastomes (Neuro2A) (**Figure 8A**). À la suite de ce criblage, deux gènes ont été identifiés comme codant pour deux canaux sensibles à l'étirement : Fam38a et Fam38b, aujourd'hui appelés respectivement Piezo1 et Piezo2<sup>75</sup>. L'expression des protéines Piezo est nécessaire et suffisante à l'induction d'un courant sensible à l'étirement sur des cellules n'en présentant pas à la base. Exprimés dans de nombreux organismes (**Figure 9A**), ce sont des canaux cationiques non sélectifs dont la conductance unitaire est d'environ 30 pS<sup>76</sup>. De plus, la pression d'activation moyenne des canaux Piezo se situe entre -30 et -40 mmHg<sup>75</sup>. La cinétique d'activation de Piezo1 et Piezo2 est similaire. Par contre, les canaux Piezo2 s'inactivent plus rapidement que Piezo1<sup>75, 9</sup> (**Figure 8B**).



Une particularité frappante des canaux Piezo est leur nombre important de segments transmembranaires : 30 à 40, selon les prédictions, faisant de ces protéines les premières chez l'homme à avoir autant de segments transmembranaires<sup>74</sup>. Avec un poids moléculaire avoisinant les 290 kDa, les canaux Piezo peuvent également former des homotétramères d'environ 1,2 MDa<sup>76</sup>. A l'heure actuelle, nous ne connaissons pas les segments responsables de la formation du pore, ni ceux responsables de leur activation par l'étirement. Du fait de la taille du canal, il est fortement possible qu'il ne soit pas uniquement impliqué dans la

mécanotransduction<sup>74</sup>. De plus, des interactions entre les canaux TRP précédemment décrits et Piezo sont possibles, comme entre Piezo1 et TRPP2<sup>77</sup>.

Les antagonistes des canaux Piezo sont les antagonistes classiques des SAC. On peut citer le rouge de ruthénium dont l'inhibition dépend du voltage, le  $Gd^{3+}$ , la streptomycine, et le GsMTx-4 qui décale vers la droite le seuil d'activation du canal de 30 mmHg<sup>74, 78-80</sup>.

#### i. Les canaux Piezo dans les cellules neuronales et associées

Les premières études ont montré que Piezo1 est exprimé dans les neurones sensoriels périphériques. Il y est impliqué dans la sensibilité à la douleur<sup>81</sup> et à l'allodynie<sup>82, 83</sup> chez la drosophile et la souris, respectivement. Piezo2 est également impliqué dans la sensibilité au toucher chez le poisson-zèbre, la souris et le rat. La sensibilité au toucher fait intervenir les terminaisons afférentes des neurones sensoriels périphériques et des cellules non neuronales associées à ces neurones : les cellules de Merkel. Les cellules de Merkel sont des cellules sécrétrices (neuroendocrines) qui se situent au niveau de l'épiderme basal. Ces cellules possèdent des canaux mécanosensibles à adaptation lente, c'est-à-dire qu'ils peuvent transformer une information mécanique de toucher en un influx nerveux pour les neurones adjacents pendant toute la durée du toucher et dans une zone limitée<sup>84</sup>. Une étude a montré par un KO tissu spécifique au niveau de l'épiderme que Piezo2 intervient dans cette adaptation lente au toucher grâce à une expression fonctionnelle au niveau des cellules de Merkel, chez la souris<sup>85, 86</sup>. Ce rôle de Piezo2 a été confirmé chez le rat grâce à des shRNA anti Piezo2<sup>85</sup>. Ainsi, l'activation de Piezo2 par le toucher entraînerait une entrée de cations qui dépoliariserait la membrane plasmique des cellules de Merkel. Cette dépoliarisation entraîne l'activation de canaux calciques dépendants du voltage (CCDV) suivie d'une entrée de  $Ca^{2+}$  qui induit l'exocytose et la libération de neurotransmetteurs dans la fente synaptique du neurone somatosensoriel voisin<sup>86</sup>.

#### ii. Les canaux Piezo dans les cellules non neuronales

Néanmoins, les canaux Piezo ne sont pas exclusivement exprimés dans les neurones. En effet, chez la souris, on en retrouve également dans les tubules rénaux, la vessie et le poumon. Dans le rein, Piezo1 est exprimé au niveau des cellules épithéliales des tubules proximaux où il serait impliqué dans la sensibilité aux changements de pression intraluminale et la sensation du flux urinaire<sup>74, 77</sup>. Dans la vessie, Piezo1 est détecté dans les cellules urothéliales où il contribue au relargage d'ATP en réponse à l'étirement. Il y contribuerait à la sensibilité de l'extension de la vessie<sup>87</sup>.

Piezo1 interviendrait également dans la sensibilité des cellules à la confluence<sup>79</sup> et régulerait leur état prolifératif, comme cela a été montré dans les cellules épithéliales chez l'homme et le poisson zèbre<sup>88</sup>.

### iii. Les canaux Piezo dans le poumon et les vaisseaux

Le tissu qui exprime le plus les canaux Piezo1 et Piezo2 est le poumon<sup>75, 87</sup> (**Figure 9B**). Toutefois, la composition du poumon est très diversifiée : veines, bronches, artères, sang, cellules de l'immunité, pneumocytes,... Si Piezo est exprimé dans ce tissu, la question est de savoir où, dans quel type cellulaire et surtout pourquoi ? À ce jour, l'expression et la fonction de Piezo dans le poumon demeurent inconnues même si quelques pistes commencent à émerger.

**→ Des études préliminaires seront présentées à la fin de cette thèse afin de déterminer la localisation et l'expression de Piezo1 dans le poumon.**

Plusieurs études montrent que Piezo1 est impliqué dans l'embryogenèse. Chez la souris, Piezo1 est exprimé dans la rate et le poumon où son expression augmente au cours des stades embryonnaires. À la naissance des souris, Piezo1 est majoritairement exprimé dans le foie et dans la moelle osseuse. À ce niveau, Piezo1 est impliqué dans l'érythropoïèse et à l'âge adulte, il est exprimé au niveau de la membrane plasmique des globules rouges chez la souris mais aussi chez l'homme. Ce canal intervient dans la régulation de l'osmolarité des globules rouges<sup>89</sup>. On pourrait ainsi corrélérer la forte expression de Piezo1 que l'on observe durant l'embryogenèse dans le poumon à son expression dans le sang lors de la vascularisation pulmonaire.

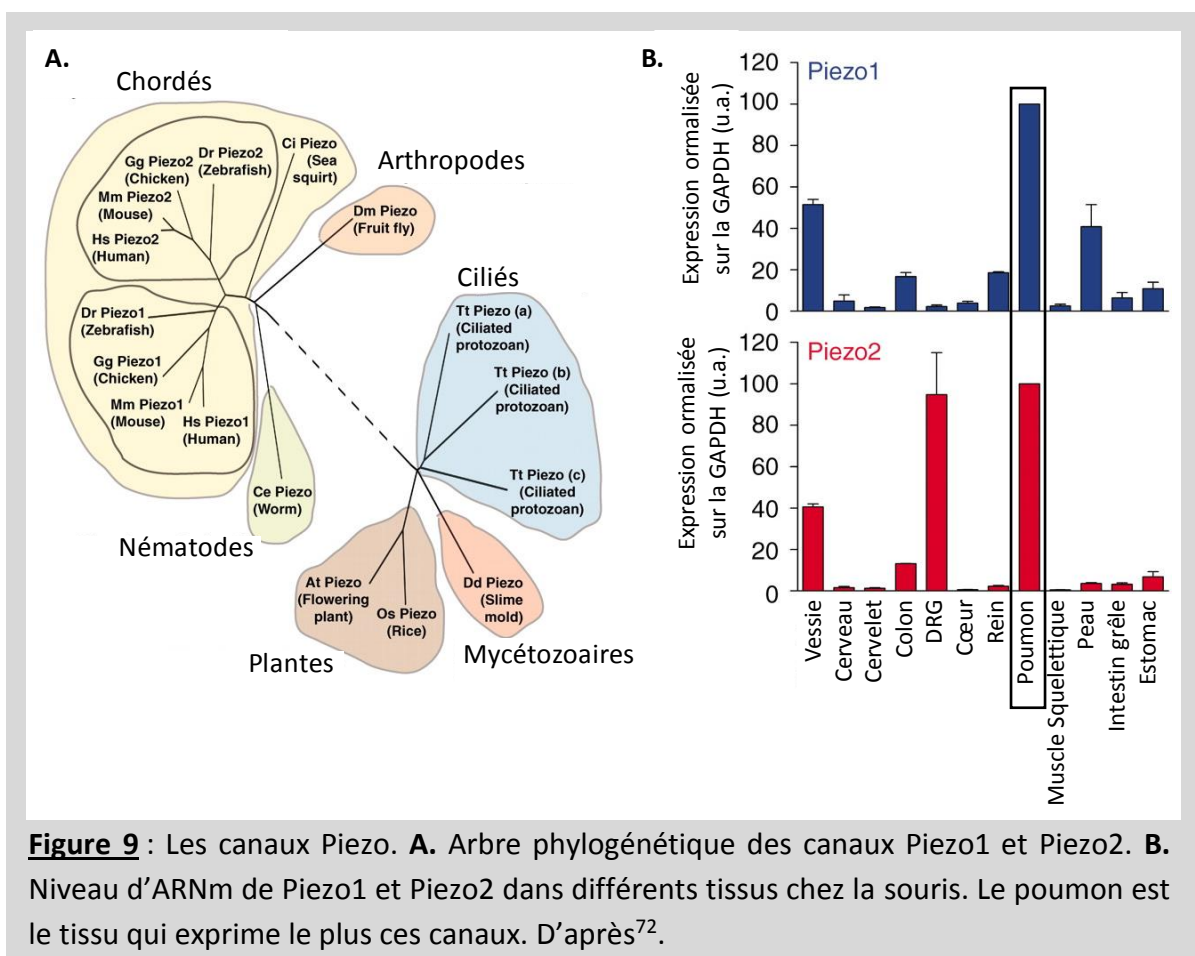
Deux études récentes ont montré que des souris KO pour Piezo1 meurent en milieu de gestation, à l'état embryonnaire (au stade E10.5 en moyenne). Cette mortalité est associée à un défaut de la vasculogenèse. Ainsi, Piezo1 est exprimé dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins en formation chez la souris et est important pour le remodelage et l'architecture des vaisseaux<sup>90, 91</sup>. Les auteurs montrent qu'en plus d'être activé par une pression, au niveau de cellules endothéliales humaines issues de la veine ombilicale (HUVEC), Piezo1 est également activé par les forces de cisaillement. Ces forces générées par le flux du sang *in vivo*, entraînent dans les HUVEC un influx de Ca<sup>2+</sup> par les canaux Piezo1. Ce Ca<sup>2+</sup> est impliqué dans l'activation de la calpaïne et dans une phosphorylation activatrice de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS). Ces mécanismes conduisent à rassembler les canaux Piezo1 au niveau de lamellipodes où il va être impliqué dans la migration et l'alignement des cellules endothéliales selon la direction du flux<sup>90, 91</sup>. De plus, du fait de l'adaptation rapide de Piezo1 à l'étirement, les auteurs suggèrent que celui-ci pourrait être impliqué dans une activation répétée au niveau de zones où le flux dans l'artère est turbulent, comme dans les embranchements entre artères. Ce rôle de Piezo1 dans l'alignement des cellules endothéliales permet d'expliquer son importance dans la morphologie des vaisseaux lors de l'embryogenèse.

De plus, de façon intéressante, à l'âge adulte, Piezo1 continue à être exprimé dans le cœur, le poumon et l'aorte de souris<sup>90</sup>. Le poumon étant hautement vascularisé, il est possible que la très forte expression de Piezo dans ce tissu soit corrélée à une expression

dans les vaisseaux pulmonaires. Récemment, une étude a mis en évidence au niveau de l'ARNm la présence de Piezo1 dans les cellules endothéliales du cœur, de la peau, du foie, du colon et de la vessie mais également dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires humaines et de souris<sup>91</sup>. Le fait que les souris KO pour les canaux Piezo soient létales (à la naissance pour Piezo2 et pendant l'embryogenèse pour Piezo1), montre que ces canaux ont une importance majeure dans la physiologie et le développement<sup>74</sup>.

#### iv. Mutations chez l'homme des canaux Piezo

Chez l'homme, 28 mutations « gain de fonction » de Piezo1 et Piezo2 (14 de chaque) sont associées à des pathologies<sup>74</sup>. Ainsi, Piezo1 est impliqué dans la stomatocytose déshydratée<sup>89, 92-94</sup>. Dans cette pathologie, la cinétique d'inactivation des canaux Piezo1 est plus lente dans les globules rouges<sup>92, 95</sup>. Ceci a pour conséquence d'augmenter le flux d'ions par les canaux Piezo et de liquide en conséquence, ce qui conduit à augmenter le volume des globules rouges et amène à leur rupture membranaire<sup>96</sup>. Piezo2 est associé à d'autres pathologies comme l'arthrogrypose distale de type 5, le syndrome de Gordon ou le syndrome de Marden-Walker<sup>97</sup>, trois pathologies rares qui se caractérisent, entre autres, par des hypercontractures musculaires et des problèmes articulaires<sup>74</sup>.



Nous venons de voir que les canaux SAC sont perméables à de nombreux ions et provoquent notamment une entrée de cations dans les cellules. Les CML d'AIP ont un potentiel transmembranaire de repos négatif, compris entre -40 et -50 mV<sup>98</sup>. Ainsi, l'entrée d'ions positifs a pour impact d'amener le potentiel transmembranaire vers des valeurs plus positives : c'est la dépolarisation. Quelle est la conséquence d'un changement de potentiel membranaire ? À la surface des CML, on retrouve plusieurs canaux calciques sensibles à ces variations qui sont des canaux calciques dépendants du voltage (CCDV).

### C. Les canaux calciques dépendants du voltage (CCDV)

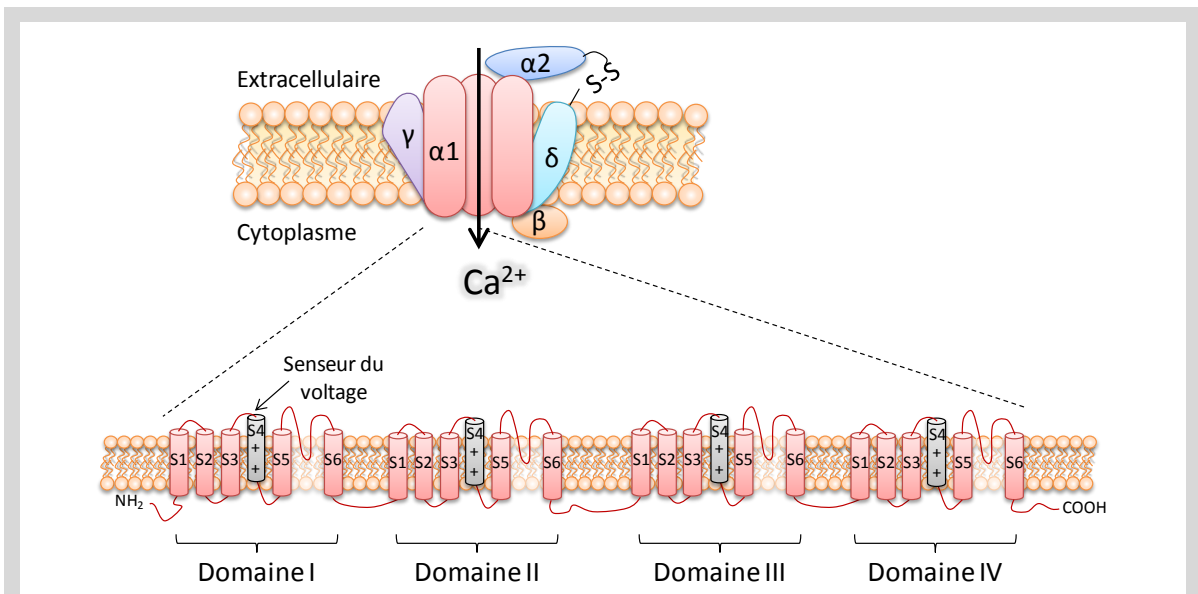
Les CCDV sont des canaux perméables au  $\text{Ca}^{2+}$  qui s'ouvrent à la suite d'une dépolarisation puis s'inactivent plus ou moins rapidement et se ferment suite à une hyperpolarisation. Les CCDV sont les canaux calciques majeurs impliqués dans la contraction du muscle squelettique strié, du muscle cardiaque et des muscles lisses vasculaires. Dans les vaisseaux, les CCDV participent au tonus basal en étant ouverts en partie constamment.

#### a) Les différentes isoformes de CCDV dans les artères pulmonaires

Les CCDV sont classés en 5 sous-familles : les CCDV de type L qui sont activés pour de fortes dépolarisations de -30 à +10 mV ( $\text{Ca}_v1.1$  (S),  $\text{Ca}_v1.2$  (C),  $\text{Ca}_v1.3$  (D) et  $\text{Ca}_v1.4$  (F)) ; les CCDV de type T activés pour de plus faibles dépolarisations de -40 à -10 mV ( $\text{Ca}_v3.1$  (G),  $\text{Ca}_v3.2$  (H) et  $\text{Ca}_v3.3$  (I)) ; les CCDV dit neuronaux de type P/Q ( $\text{Ca}_v2.1$  (A)), de type N ( $\text{Ca}_v2.2$  (B)) et de type R ( $\text{Ca}_v2.3$  (E)) activés pour de moyennes et de fortes dépolarisations. Les principales différences entre les CCDV de type T et de type L sont leur seuil d'activation et leur cinétique d'inactivation qui est plus rapide pour les CCDV de type T que de type L<sup>99</sup>. Au niveau cardiovasculaire, seuls les courants par les CCDV de type T et L ont été décrits<sup>100</sup>. Au niveau des CML d'AIP de souris sont exprimés les isoformes  $\text{Ca}_v1.1$ <sup>101</sup>,  $\text{Ca}_v1.2$ <sup>102</sup>,  $\text{Ca}_v1.3$ <sup>101</sup>,  $\text{Ca}_v3.1$ <sup>102</sup> et  $\text{Ca}_v3.2$ <sup>102</sup>. Chez l'homme, les canaux  $\text{Ca}_v3.1$  sont exprimés au niveau du muscle lisse des AIP<sup>103</sup>. Au niveau de l'ARNm, les isoformes  $\text{Ca}_v2.1$  et  $\text{Ca}_v2.2$  sont également exprimées dans des CML d'AIP humaines<sup>104</sup>. Bien que le rôle précis de chaque isoforme n'est pas été décrit, les CCDV de type L interviennent dans le tonus vasculaire et plus particulièrement dans les AIP par rapport aux artères mésentériques ou de l'aorte<sup>101</sup>.

#### b) Composition des CCDV

Les CCDV sont formés de 5 sous-unités ( $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ), la sous-unité  $\alpha 1$  formant le pore et les autres étant des sous-unités auxiliaires. La sous-unité  $\alpha 1$  se compose de 4 domaines de 6 segments transmembranaires (**Figure 10**). Chaque domaine pouvant avoir un rôle différent dans l'activation et l'inactivation du canal<sup>105, 106</sup>.



**Figure 10** : Canal calcique dépendant du voltage. Représentation schématique d'un canal calcique dépendant du voltage (CCDV) avec la sous-unité  $\alpha 1$  qui forme le pore et les sous-unités auxiliaires régulatrices ( $\alpha 2$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et  $\gamma$ ). La sous-unité  $\alpha 1$  se compose de 6 segments transmembranaires répétés 4 fois. Le pore se trouve entre les segments S5 et S6 et le segment S4 est le senseur du voltage.

#### c) Le pore du canal

Entre les segments S5 et S6 on retrouve une boucle qui forme le pore du canal. Ces segments S5 et S6 sont également impliqués dans la cinétique d'inactivation des CCDV. La boucle entre les domaines I et II permet l'inactivation du canal en l'obstruant au niveau des segments S5 et S6. De plus, ces segments sont importants dans la sensibilité du canal à être activé pour de fortes dépolarisations ( $\text{Ca}_v$  de type L) ou de faibles dépolarisations ( $\text{Ca}_v$  de type T)<sup>105</sup>.

#### d) Le senseur du voltage

Le segment S4 est le senseur du voltage. Ce segment qui contient des acides aminés positifs (majoritairement des arginines) est mobile dans la membrane plasmique<sup>106</sup>. Lors d'une dépolarisation, ces acides aminés bougent et sont exposés à l'extérieur de la bicouche lipidique, au niveau du milieu extracellulaire. Ce mouvement contribue à un changement de conformation des autres segments du canal, ce qui permet l'ouverture du pore et l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le cytoplasme<sup>99, 105</sup>.

#### e) Les inhibiteurs des CCDV

Parmi les inhibiteurs des CCDV il faut distinguer ceux des CCDV de type L et de type T. Le mibéfradil, le NNC55-0396, le TTA2 inhibent les CCDV de type T. Les CCDV de type L sont



inhibés par des dihydropyridines tels que la nifédipine, la nicardipine, les phénylalkylamines (vérapamil) et les benzodiazépines (diltiazem). Toutefois, la sélectivité de ces molécules est assez controversée, notamment pour celles des CCDV de type T.

Afin de contrebalancer l'influx d'ions positifs par les SAC et les CCDV et ramener le potentiel de membrane des CML à sa valeur basale, la cellule doit s'hyperpolariser. Pour cela, le  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre dans la cellule peut activer différents canaux membranaires tels que des canaux potassiques activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  : les canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$ .

#### D. Les canaux $\text{K}_{\text{Ca}}$

##### a) Généralités sur les canaux $\text{K}_{\text{Ca}}$

Il existe trois types de canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$ , chacun d'eux étant nommé par sa conductance respective :  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  (small),  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  (intermediate) et  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  (big). Ils sont activés à la suite d'une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  et leur activation entraîne un efflux de  $\text{K}^+$  et donc une hyperpolarisation. Dans les CML, l'hyperpolarisation contribue à la relaxation *via* l'inactivation des CCDV et à une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Les deux types de canaux (CCDV et  $\text{K}_{\text{Ca}}$ ) forment alors une balance de potentiel pour les cellules. Les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  sont également liés au tonus myogénique mais dans un rôle inverse car leur inactivation entraînerait une contraction des CML. Par ailleurs, dans les CML d'AIP de lapin, les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  seraient directement sensibles à l'étirement et aux dérivés de l'acide arachidonique<sup>107</sup>.

Les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  présentent deux particularités par rapport aux  $\text{SK}_{\text{Ca}}/\text{IK}_{\text{Ca}}$  : ils sont sensibles au voltage et ils sont directement sensibles au  $\text{Ca}^{2+}$  (ainsi qu'au  $\text{Mg}^{2+}$ ). Par contre, les  $\text{IK}_{\text{Ca}}$  et les  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  ne sont pas sensibles au voltage et sont activés par l'intermédiaire de la calmoduline (CaM). Ainsi, les  $\text{SK}_{\text{Ca}}$  possèdent 4 sites de liaison à la CaM et leur activation nécessite la liaison de 4 CaM et au moins un ion  $\text{Ca}^{2+}$ .

Les  $\text{K}_{\text{Ca}}$  se composent de 4 sous-unités  $\alpha$ . Chaque sous-unité  $\alpha$  se compose de plusieurs segments transmembranaires : 6 pour les  $\text{SK}_{\text{Ca}}/\text{IK}_{\text{Ca}}$  et 7 pour les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ . En effet, les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  disposent d'un segment supplémentaire appelé S0, qui rend la partie N-terminale extracellulaire où elle peut interagir avec une protéine auxiliaire appelée la sous-unité  $\beta$ . Il existe plusieurs isoformes de sous-unité  $\beta$  (1 à 4) mais seule la sous-unité  $\beta 1$  est exprimée dans les CML<sup>108</sup>. De plus, les  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  sont également associés à une sous-unité auxiliaire  $\gamma$  (**Figure 11A et B**).

##### b) Les canaux $\text{BK}_{\text{Ca}}$

Les canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  se composent de plusieurs parties : (i) un domaine pore, (ii) la partie cytosolique C-terminale sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  et (iii) un domaine sensible au voltage.



i. Le domaine pore

Le pore se trouve entre les segments S5 et S6. Sa sélectivité au  $K^+$  est assurée par trois acides aminés au niveau du pore : G-Y-G.

ii. La sensibilité au  $Ca^{2+}$

La partie C-terminale cytosolique est très grande, elle se compose de deux parties : le domaine RCK1 qui est un site de faible affinité pour le  $Ca^{2+}$  et qui lie également le  $Mg^{2+}$  ; et le domaine RCK2 qui est un site de haute affinité pour le  $Ca^{2+}$ . Le  $Mg^{2+}$  peut également se lier dans les boucles intracellulaires du canal, entre les segments S0 et S1 et S2 et S3 (**Figure 11A**). Les  $BK_{Ca}$  s'activent pour des  $[Ca^{2+}]_i$  supérieures à 300 nM. Ils peuvent être activés soit par une entrée de  $Ca^{2+}$  depuis le milieu extracellulaire, soit par une sortie de  $Ca^{2+}$  depuis les réserves calciques internes. De plus, la sous-unité associée  $\beta 1$  permet de réguler la cinétique d'activation des  $BK_{Ca}$  en augmentant sa sensibilité au  $Ca^{2+}$ <sup>108</sup>.

iii. La sensibilité au voltage

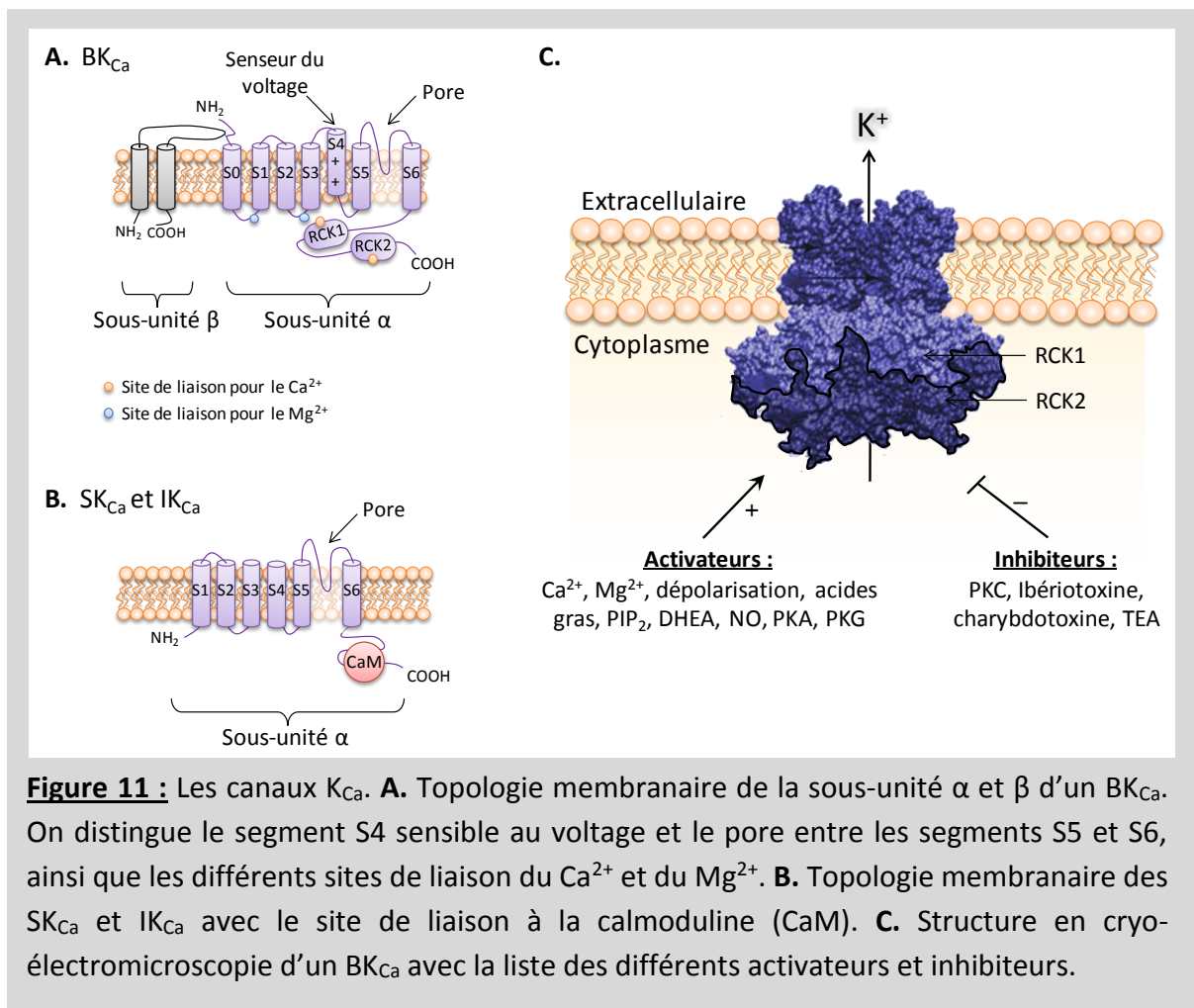
Les  $BK_{Ca}$  s'activent suite à une dépolarisation pour des potentiels de membrane supérieurs à +20 mV. C'est le segment S4 qui est responsable de cette sensibilité au voltage puisqu'il contient de nombreux acides aminés chargés positivement et plus particulièrement une arginine 213<sup>109</sup>. Lorsque la membrane se dépolarise, le segment S4 se déplace vers le côté extracellulaire, ce qui libère le pore et facilite le passage des ions  $K^+$  entre les segments S5 et S6. Le  $Ca^{2+}$  potentialise l'ouverture du canal lorsque celui-ci est préalablement ouvert par une dépolarisation<sup>110</sup>. Dans les CML où le potentiel de membrane est d'environ -40 mV, l'état d'activation du canal par la dépolarisation est d'environ 0,1%. De ce fait, l'augmentation du  $Ca^{2+}$  cytoplasmique est l'activateur majeur des  $BK_{Ca}$ <sup>111</sup>.

iv. Les inhibiteurs des  $K_{Ca}$

Les  $BK_{Ca}$  sont inactivés par de l'ibérotisine (IbTx), par de faibles concentrations de tétraéthylammonium (TEA) et la charybdotoxine. Cependant, cette dernière n'est pas sélective des  $BK_{Ca}$  puisqu'elle inhibe également les  $IK_{Ca}$ . Un inhibiteur sélectif des  $IK_{Ca}$  est le TRAM-34. Quant aux  $SK_{Ca}$ , ils peuvent être bloqués par de l'apamine<sup>108</sup> (**Figure 11C**).

v. La modulation des  $BK_{Ca}$

De nombreuses protéines kinases peuvent phosphoryler les  $BK_{Ca}$  et en modifier le fonctionnement (PKG, PKA, PKC). Dans les CML, la PKA et la PKG activent les  $BK_{Ca}$  et la PKC les inhibe<sup>111</sup>. La sous-unité  $\alpha$  possède également deux sites de liaison à la cavéoline-1. Ainsi, les  $BK_{Ca}$  interagissent avec les cavéoles et les CCDV  $Ca_v1.2$  dans les CML d'artères mésentériques<sup>112</sup>.



**Figure 11 :** Les canaux K<sub>Ca</sub>. **A.** Topologie membranaire de la sous-unité α et β d'un BK<sub>Ca</sub>. On distingue le segment S4 sensible au voltage et le pore entre les segments S5 et S6, ainsi que les différents sites de liaison du Ca<sup>2+</sup> et du Mg<sup>2+</sup>. **B.** Topologie membranaire des SK<sub>Ca</sub> et IK<sub>Ca</sub> avec le site de liaison à la calmoduline (CaM). **C.** Structure en cryo-électromicroscopie d'un BK<sub>Ca</sub> avec la liste des différents activateurs et inhibiteurs.

Par ailleurs, la sensibilité au voltage et au Ca<sup>2+</sup> dépendrait des lits vasculaires. Par exemple, les BK<sub>Ca</sub> présents sur les CML d'artère cérébrale sont plus sensibles que ceux des CML d'AIP. La conséquence est que les souris KO pour la sous-unité β<sup>113</sup> ou α<sup>114</sup> ont une hypertension systémique mais pas pulmonaire, par exemple. Il existerait donc des spécificités des voies de signalisation en fonction des vaisseaux. A titre d'exemple, je vais à présent brièvement présenter les différents mécanismes connus au tonus myogénique dans la circulation systémique.

#### E. Le tonus myogénique dans la circulation systémique

Le tonus myogénique a été mis en évidence dans divers lits vasculaires de la circulation systémique. Dans la plupart des cas, les études ont été réalisées sur des vaisseaux pressurisés et mettent en évidence l'implication des CCDV dans le tonus myogénique<sup>115</sup>.

##### a) Artère cérébrale

Sur des artères cérébrales de rat, une augmentation de la pression induit l'activation de CCDV<sup>116</sup> de type L (Ca<sub>v</sub>1.2) et de type T dans une moindre mesure (Ca<sub>v</sub>3.1 et 3.2)<sup>117</sup>. Une

étude a montré que l'activation des CCDV par l'augmentation de la pression fait intervenir des espèces réactives dérivées de l'oxygène qui activent une voie PIP<sub>3</sub>/AKT via l'inhibition de PTEN<sup>118</sup>. De plus, de nombreux SAC semblent intervenir dans le tonus myogénique de l'artère cérébrale dont les canaux TRPM4<sup>119-121</sup> et TRPC6<sup>122</sup>. L'hypothèse serait que l'étirement induit un influx de Na<sup>+</sup> et Ca<sup>2+</sup> par ces canaux, ce qui dépolarise le potentiel transmembranaire. Cette dépolarisation entraînant l'activation des CCDV pour un influx calcique plus important. Ceci étant, les canaux TRPC6 ne seraient pas directement activés par l'étirement<sup>123</sup> mais leur implication dans le tonus myogénique serait plutôt corrélée avec les récepteurs à l'angiotensine de type 1 (AT<sub>1</sub>R) qui seraient, eux, activés par l'étirement<sup>124</sup>. Ainsi, l'activation des AT<sub>1</sub>R provoque l'activation d'une kinase Src qui active une phospholipase C de type  $\gamma$ 1 (PLC $\gamma$ 1) qui produit de l'IP<sub>3</sub>. L'IP<sub>3</sub> provoque une sortie de Ca<sup>2+</sup> du réticulum endoplasmique (en page 40). Ce Ca<sup>2+</sup> activerait par la suite les canaux TRPM4 qui font rentrer du Na<sup>+</sup> qui dépolarise les CML d'artère cérébrale<sup>125</sup>.

Une autre étude a montré que les canaux TRPP2 sont exprimés au niveau de la membrane plasmique des CML d'artères cérébrales de rats et humaines. Une réduction de l'expression des TRPP2 par des shRNA réduit le tonus myogénique, ainsi que l'influx de Ca<sup>2+</sup> par les SAC induit par un choc osmotique mais n'a pas d'effet sur la dépolarisation induite par l'étirement<sup>126</sup>. Les canaux TRPP2, en association avec les TRPP1, contribueraient au tonus myogénique de l'artère cérébrale<sup>126</sup> en modulant l'activation des SAC *via* leur association au cytosquelette d'actine<sup>44, 127</sup>.

Etant donné que de nombreux SAC (TRPM4, TRPC6 et TRPP2) seraient responsables du tonus myogénique dans l'artère cérébrale, la question reste de savoir s'ils agissent en parallèle, en série ou s'il existe une combinaison de leurs voies de signalisation. De plus, chez la souris, ce mécanisme de dépolarisation induite par l'augmentation de la pression fait intervenir des cavéoles<sup>128</sup> (**Figure 12A**).

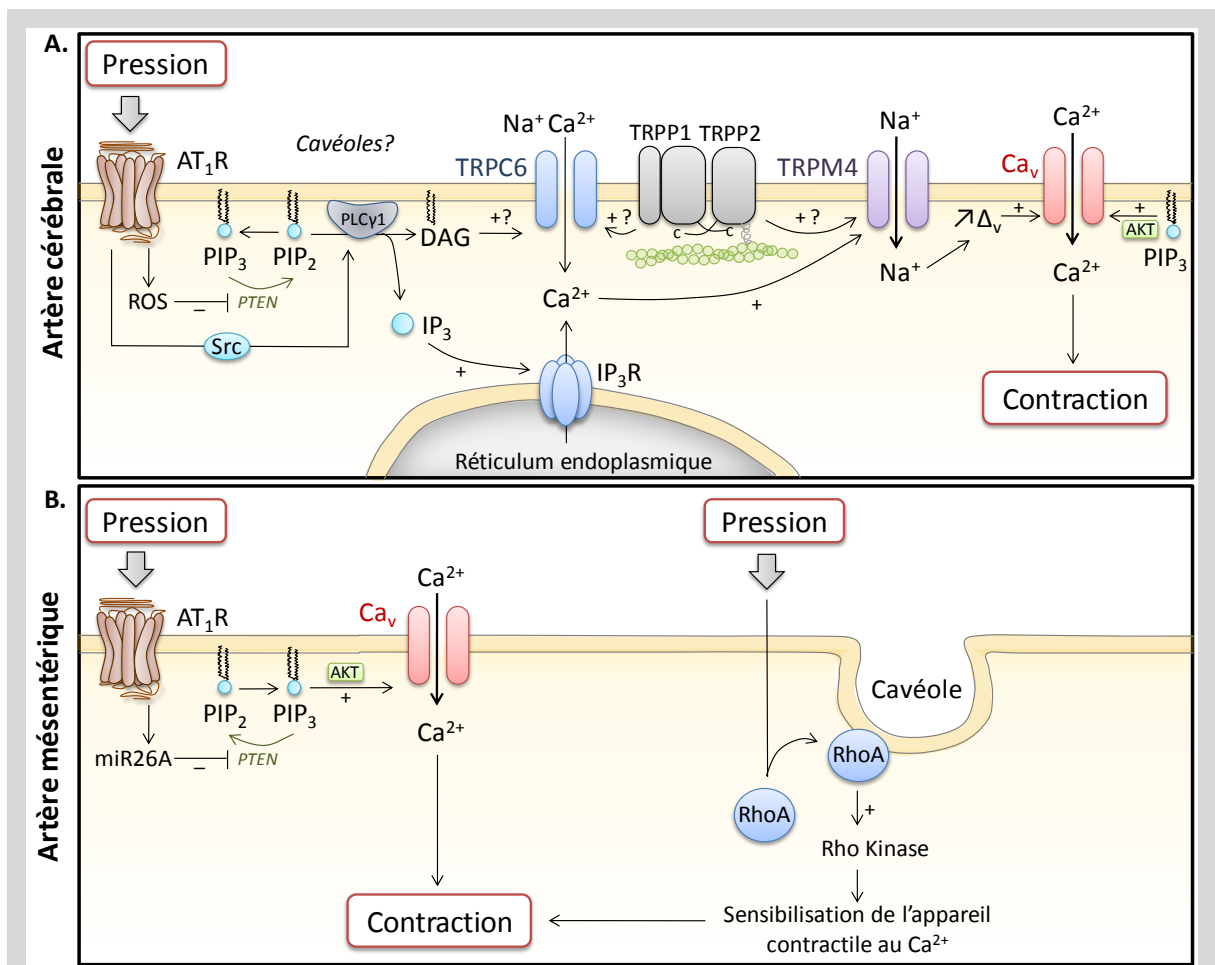
#### b) Artère mésentérique

Dans les artères mésentériques de souris, les CCDV sont impliqués dans le tonus myogénique également<sup>129-131</sup>. L'augmentation de la pression active des récepteurs à l'angiotensine II de type 1a<sup>132</sup> qui, par une voie PI3 kinase/AKT, active des CCDV<sup>133</sup>, tels que les Ca<sub>v</sub>3.1<sup>134</sup> et les Ca<sub>v</sub>1.2<sup>135</sup>. Par ailleurs, une étude a montré que chez le rat, l'augmentation de pression induit une translocation de RhoA à la membrane plasmique où elle interagit avec la cavéoline-1. Cette interaction conduit à l'activation de la Rho kinase qui sensibilise l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup> et induit la vasoconstriction<sup>136</sup> (**Figure 12B**).

#### c) Autres artères systémiques

Le tonus myogénique a également été mis en évidence dans d'autres artères systémiques, notamment dans l'artère coronaire<sup>137</sup>, l'artère irriguant les muscles squelettiques<sup>138</sup>, l'artère rénale<sup>137</sup>, la carotide<sup>139</sup>, ainsi que dans l'artère caudale de la

souris<sup>140</sup>, même si les mécanismes sous-jacents sont moins connus. Par exemple, dans l'artère du muscle crémaster, les CCDV de type T et de type L sont impliqués dans le tonus myogénique<sup>138</sup>. De même, dans l'artère coronaire humaine, les CCDV interviennent dans le tonus myogénique<sup>67</sup>. Dans les artères coronaires de souris, l'augmentation de pression active des récepteurs à l'EGF couplés à une tyrosine kinase qui, par une voie JAK/ERK<sup>1/2</sup>/STAT3, conduit à la contraction par un mécanisme encore inconnu<sup>137</sup>. Dans les artères coronaires de rats, le tonus myogénique fait intervenir des canaux  $K_{Ca}$ <sup>141</sup> et dépend du pH puisqu'une acidification potentialise le tonus myogénique en jouant sur la sensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$ <sup>142</sup>.



**Figure 12** : Tonus myogénique dans les CML d'artères systémiques. **A.** Voie de signalisation dans les artères cérébrales. Les récepteurs à l'angiotensine II de type 1 (AT<sub>1</sub>R), les canaux TRPC6, TRPM4, TRPP2, TRPP1 et les CCDV (Ca<sub>v</sub>3.1, 3.2 et 1.2) sont impliqués dans le tonus myogénique. Les cavéoles semblent aussi jouer un rôle. **B.** Voie de signalisation dans les artères méésentériques. Les AT<sub>1</sub>R et les CCDV (Ca<sub>v</sub>3.1 et 1.2) sont impliqués dans le tonus myogénique. Les cavéoles sont plutôt impliquées dans la sensibilisation de l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup> *via* une interaction avec RhoA.

## F. Tonus myogénique et SAC dans les artères pulmonaires

La circulation pulmonaire est un système à faible pression et à faible résistance due à une forte compliance des artérioles pré-capillaires. Plutôt controversé dans la littérature, le tonus myogénique chez des animaux contrôlés est alors minimal<sup>1, 6, 33</sup>. Cependant, une étude a montré chez le rat la présence d'un tonus myogénique majoritairement dans les petites AIP d'un diamètre compris entre 50 et 150  $\mu\text{m}$  (tonus myogénique isobarique)<sup>6</sup>. Mais quel est le mécanisme responsable de cette contraction ? Contrairement à ce qui est largement décrit dans la circulation systémique (voir ci-dessus), dans les AIP, les CCDV ne sont pas impliqués dans le tonus myogénique<sup>6, 28, 33, 98</sup>.

### a) Les SAC dans les CML d'AIP de rats

Si le tonus myogénique dans les AIP ne fait donc pas intervenir les CCDV, qu'en est-il des SAC ? De précédents travaux du laboratoire ont montré que les CML d'AIP de rats possèdent des canaux SAC dont l'activité est inhibée par la GsMTx-4 (**Figure 6B**). Ces canaux, activés de façon graduelle par des dépressions de 0 à -60 mmHg, sont non sélectifs et sont perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Leur conductance est de 34 pS. Ils sont à la fois activés par une dépression et par un choc osmotique qui entraîne une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>3</sup>. De plus, une étude a montré que chez le lapin, ces courants SAC sont plus présents dans les CML des petites AIP<sup>39, 143</sup>. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre par les SAC suite à un étirement pourrait donc conduire à la contraction. Par ailleurs, une étude a montré que les canaux TRPV4 sont impliqués dans le tonus myogénique chez le rat<sup>32</sup>.

### b) Tonus myogénique et canaux TRPV4 dans les AIP

Les canaux TRPV4 étant plus particulièrement activés par le flux et l'osmolarité que par la pression, les auteurs suggèrent que lors d'une lésion de l'endothélium des vaisseaux ou via les fenêtres de la limitante élastique interne (jonctions myoendothéliales), les CML sont également capables d'être sensibles à un flux. Ainsi, sur les CML d'AIP humaines, un flux est capable d'activer des canaux TRPV4, mais également TRPM7 et entraîne une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ <sup>65</sup>.

### c) Tonus myogénique et endothélium

Une étude a par ailleurs montré que le tonus myogénique isométrique de l'AIP chez les rats Sprague-Dawley fait intervenir l'endothélium<sup>1</sup>. Un étirement de l'AIP provoquerait une sécrétion par l'endothélium de facteurs vasoconstricteurs, comme la phospholipase A<sub>2</sub> et/ou des prostaglandines (PGH<sub>2</sub>), comme cela a été montré sur l'AIP de lapin<sup>29, 144</sup>.

Nous venons de voir que les forces d'étirement mécanique, perpendiculaires à la paroi des vaisseaux sont impliquées dans le maintien du tonus vasculaire. Cependant, les artères sont également soumises au flux du sang qui génère des forces parallèles à la paroi des artères. Ces forces, appelées forces de cisaillement, sont majoritairement ressenties par l'endothélium qui borde l'intérieur des artères.

### 3. L'endothélium et les cellules endothéliales

En contact direct avec le sang, les cellules endothéliales (CE) vont être les premières cellules des artères à ressentir les forces de frottement générées par le flux du sang, appelées forces de cisaillement. Ces forces, parallèles à la paroi du vaisseau, sont impliquées dans différents mécanismes tels que : **A.** la régulation du tonus vasculaire grâce à la sécrétion de facteurs impliqués dans la vasodilatation (« dilatation flux dépendante » par la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) ou l'EDHF), la vasoconstriction (comme l'endothéline-1) et **B.** dans l'inflammation.

#### A. Les cellules endothéliales et la vasodilatation flux-dépendante

##### a) Voie du monoxyde d'azote (NO)

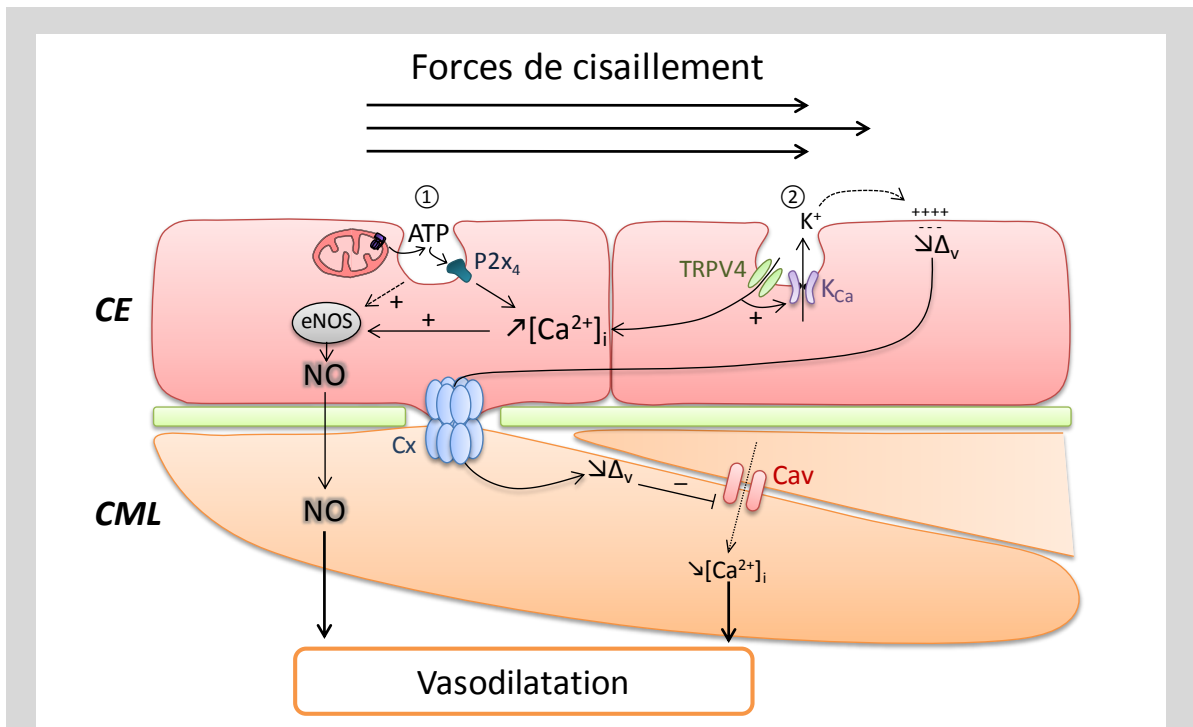
Au niveau des CE, les forces de frottement vont être perçues par des canaux sensibles à l'étirement (comme les canaux TRPV4) qui entraînent un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . Dans la CE, le  $\text{Ca}^{2+}$  est particulièrement impliqué dans la production de NO par la NO synthase endothéliale (eNOS). Lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$  augmente dans la CE, celui-ci se combine à la calmoduline (CaM). Le complexe  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM induit un changement de conformation de la eNOS qui devient active. La eNOS transforme alors de  $\text{O}_2 + \text{L-arginine}$  en L-citrulline + NO. Le NO est un gaz qui diffuse librement à travers les membranes des cellules, il agit à distance sur les CML sous-jacentes dont il provoque leur relaxation (**Figure 13**).

Par ailleurs, les forces de cisaillement ont aussi un effet direct sur la plasticité de la membrane plasmique. En effet, un flux a la capacité d'augmenter la fluidité membranaire, plus particulièrement au niveau de zones où la membrane est plus statique comme dans les cavéoles<sup>145</sup>. Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique qui regroupent de nombreuses protéines et canaux (en page 27). Cette augmentation de la fluidité dans les cavéoles par les forces de cisaillement peut activer différentes protéines y étant associées. On constate notamment un détachement de la eNOS qui s'active<sup>146, 147</sup> mais aussi l'activation de l'ATP synthase et la production d'ATP vers le milieu extracellulaire<sup>148</sup>. L'ATP, sécrété dans les cavéoles<sup>149</sup> peut alors activer des récepteurs purinergiques ( $\text{P2X}_4$ )<sup>150</sup> qui entraînent une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , l'activation de la eNOS, la production de NO et la vasodilatation (**Figure 13**).

##### b) Voie de l'EDHF

Un autre mécanisme impliqué dans la relaxation flux-dépendante est l'EDHF (« Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor »). Comme nous venons de le voir, le flux a la capacité d'activer des canaux TRPV4 qui sont notamment exprimés dans des cavéoles. Au niveau de ces cavéoles, les canaux TRPV4 sont regroupés avec des canaux potassiques activés par le  $\text{Ca}^{2+}$  ( $\text{SK}_{\text{Ca}}$  et  $\text{IK}_{\text{Ca}}$ ). Grâce à cette proximité, le  $\text{Ca}^{2+}$  qui entre par les TRPV4 active directement des canaux  $\text{K}_{\text{Ca}}$  qui font sortir du  $\text{K}^+$  des cellules. Cette sortie massive d'ions  $\text{K}^+$  va modifier le potentiel transmembranaire, l'hyperpolarisant<sup>151, 152</sup>. Cette

hyperpolarisation peut se propager jusqu'aux CML *via* des jonctions communicantes (jonction GAP composée de connexines) où elle induit la fermeture de CCDV, une diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$ , la relaxation des CML et donc la dilatation de l'artère (**Figure 13**).



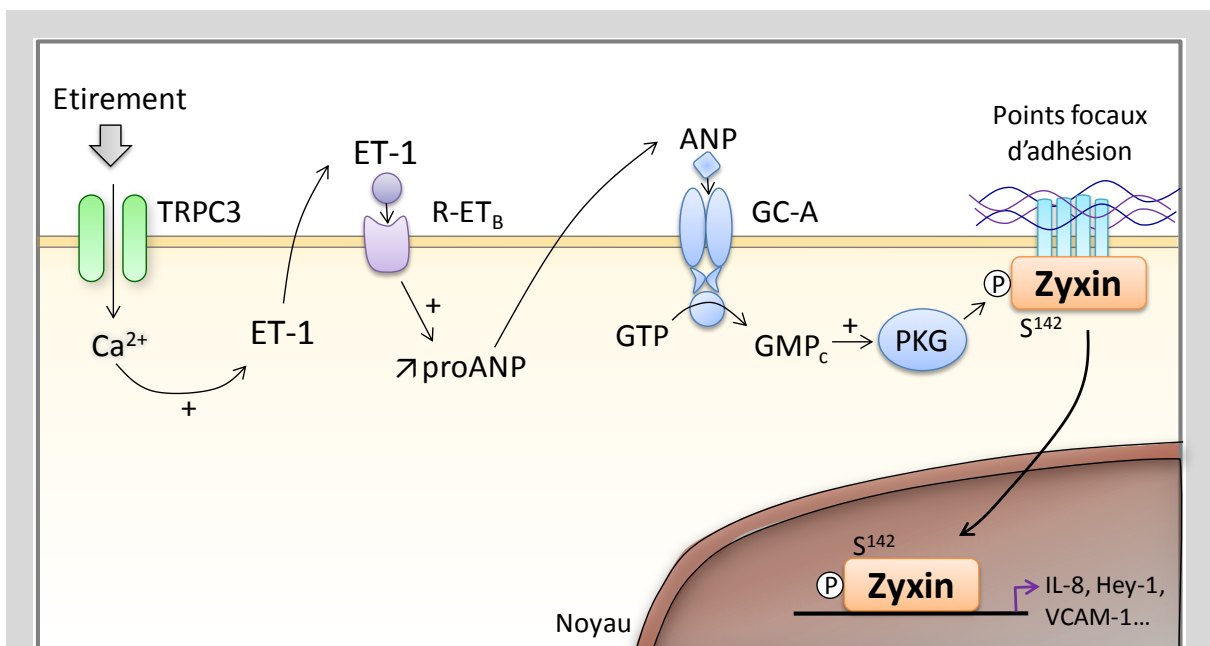
**Figure 13 :** Les forces de cisaillement activent ① la sécrétion d'ATP de la CE. Suite à l'activation des récepteurs P2X<sub>4</sub>, l'ATP induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ . ② Le cisaillement induit également un influx de  $Ca^{2+}$  par des canaux TRPV4 qui active des canaux K<sub>Ca</sub> et font sortir du K<sup>+</sup> qui hyperpolarise la CE. Cette hyperpolarisation se propage à la CML via des jonctions communicantes (Connexines – Cx) et entraîne la fermeture de CCDV, une diminution de la  $[Ca^{2+}]_i$  et la vasodilatation. Enfin, dans la CE, le  $Ca^{2+}$  active aussi l'eNOS qui produit du NO vasodilatateur.

### B. Les cellules endothéliales dans l'inflammation

Nous venons de voir que les CE ont un rôle dans le tonus vasculaire en sécrétant des agents vasodilatateurs comme le NO. Elles sont également impliquées dans la sécrétion de molécules vasoconstrictrices et dans des mécanismes de l'inflammation. Ainsi, les forces d'étirement mécanique peuvent aussi être à l'origine de l'activation d'autres canaux sensibles à l'étirement, comme TRPC3 induisant une sécrétion d'endothéline-1 (ET-1) par les CE. L'ET-1 sécrétée peut agir à distance sur les CML pour induire une vasoconstriction (en page 50). L'ET-1 peut également agir de façon autocrine sur les CE en activant d'autres voies de signalisation plus complexes comme par exemple la translocation de zyxin des points d'adhésion focaux au noyau des CE où elle peut induire l'expression de gènes impliqués dans



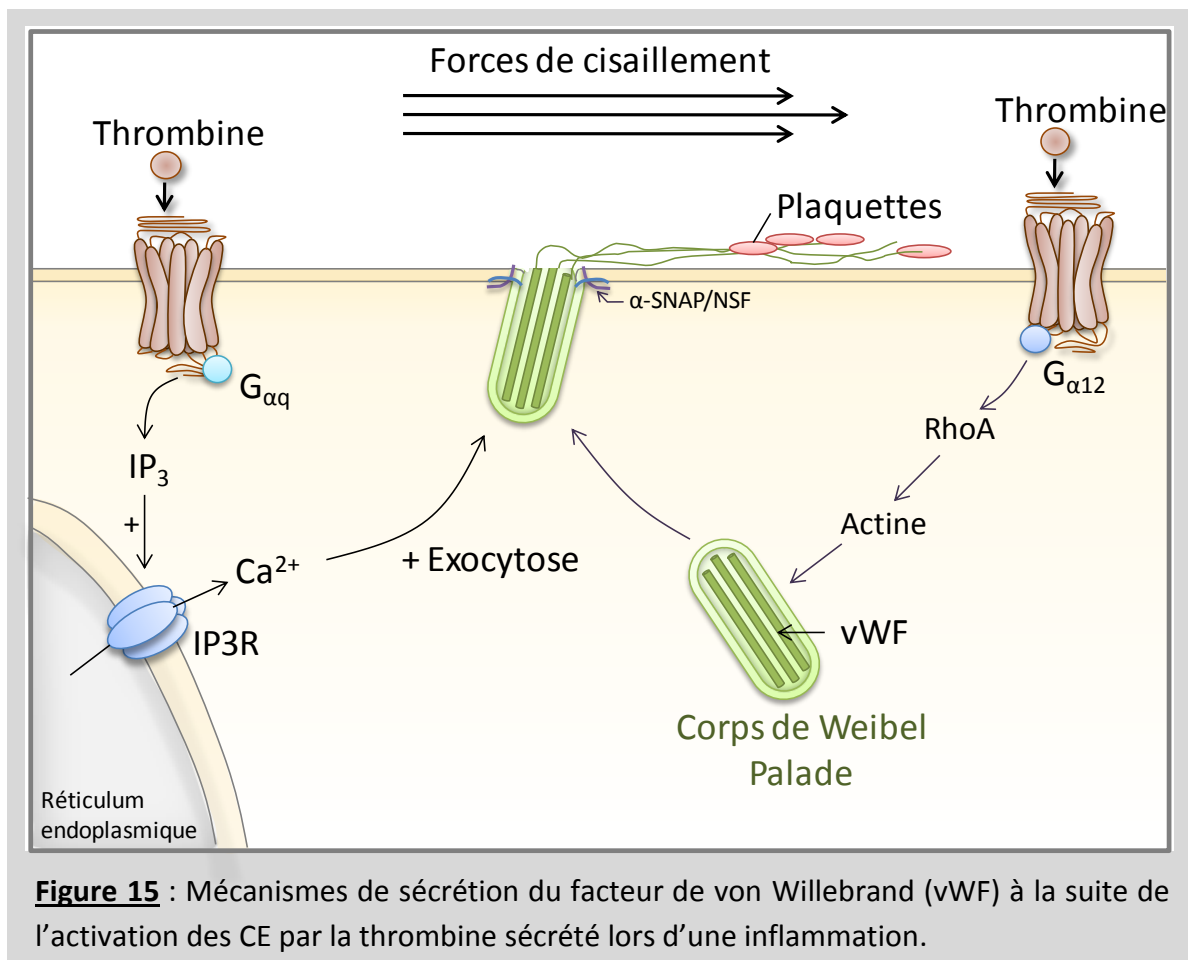
l'inflammation (**Figure 14**)<sup>153</sup>. Cependant, la présence de zyxin n'a à ce jour pas été montrée dans l'AIP.



**Figure 14 :** Au niveau des cellules endothéliales, un étirement par tension pariétale (perpendiculaire au vaisseau), active des canaux TRPC3 qui font rentrer du  $Ca^{2+}$ . Ce  $Ca^{2+}$  induit une production d'ET-1 qui par action autocrine active des récepteurs à l'ET-1 de la CE. S'ensuit une voie de signalisation avec la production d'ANP et l'activation de la PKG qui conduit à phosphoryler Zyxin. Zyxin phosphorylée va alors se détacher des points d'adhésion focaux et être transloquée au noyau pour y induire des gènes impliqués dans l'inflammation.

L'endothélium est aussi une barrière permettant de contenir le sang dans les vaisseaux. Cependant, lorsqu'il est lésé, comme par exemple lors d'une blessure, les cellules endothéliales vont sécréter de nombreux facteurs impliqués dans l'inflammation afin de mettre en place des mécanismes de réparation. L'un de ces facteurs sécrétés est le facteur de von willebrand (vWF). Le vWF est stocké sous forme de multimères dans les CE au niveau d'organites intracellulaires de forme allongée : les corps de Weibel Palade<sup>154</sup>. Lors d'une lésion, les corps de Weibel Palade vont fusionner avec la membrane plasmique et sécréter le vWF. Sous l'effet des forces de cisaillement générées par le flux sanguin, des fils de vWF s'alignent entre eux et sont impliqués dans le recrutement et l'adhésion des plaquettes qui seront importantes dans la formation d'un thrombus au niveau de la brèche<sup>155</sup> (**Figure 15**).



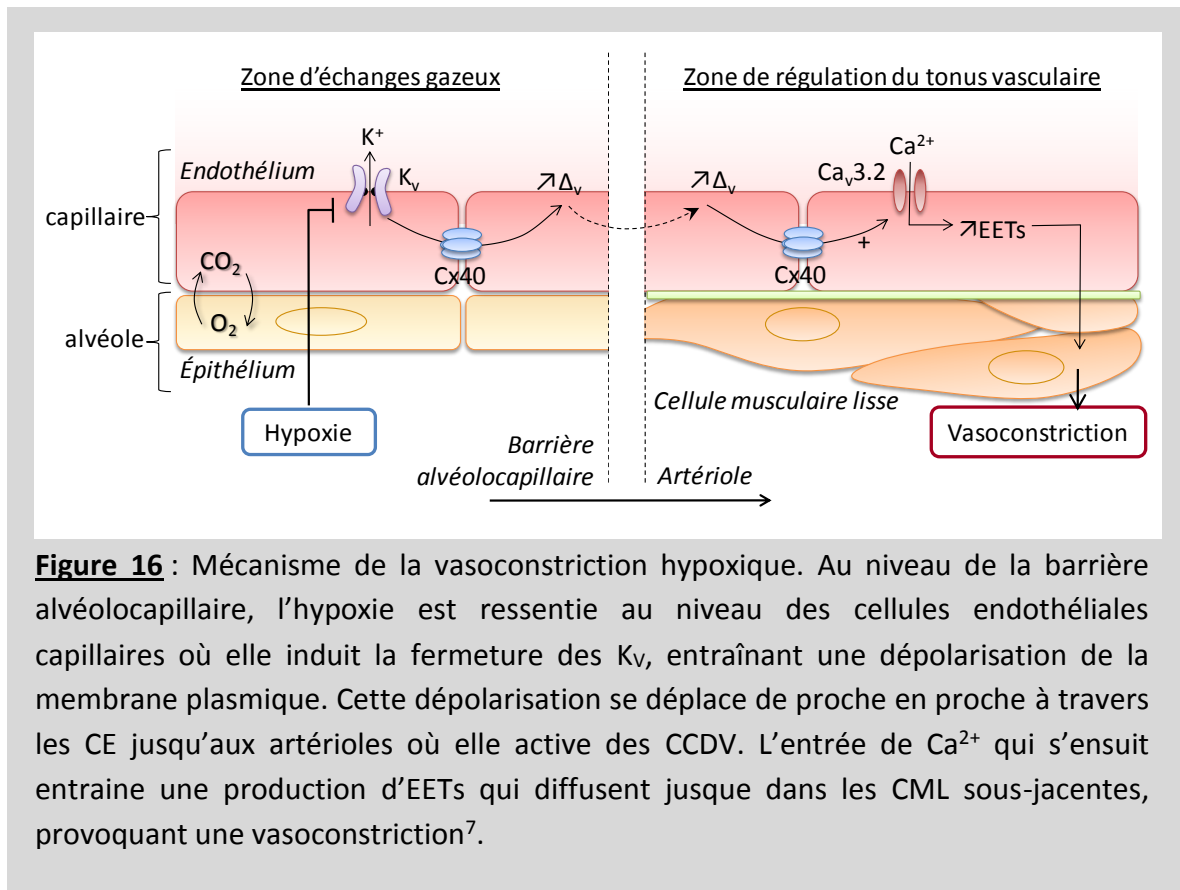


#### 4. Les artères intrapulmonaires et la vasoconstriction hypoxique

Une fine régulation de l'état contractile des AIP, que ce soit via leur contraction par les CML ou leur relaxation par l'endothélium, permettra d'adapter la réoxygénation du sang en fonction des besoins physiologiques. Ce sont des artères de distensibilité et de recrutement, le plus souvent dans un état dilaté ce qui permet une meilleure surface d'échange au niveau des alvéoles.

Contrairement à la circulation systémique, une hypoxie aiguë induit la contraction des AIP, c'est ce que l'on appelle la vasoconstriction hypoxique. Lors de l'hypoxie, la pression partielle en  $O_2$  va chuter dans les alvéoles. Ainsi, ces alvéoles ne seront pas de bonnes zones d'échanges gazeux avec les capillaires. L'hypoxie alvéolaire se transmet au niveau des CE capillaires sous-jacentes et remonte via les CE jusque dans les artérioles qui se contractent (**Figure 16**). Cette vasoconstriction hypoxique va permettre de diminuer l'irrigation dans les alvéoles peu oxygénées et de la rediriger vers celles qui ne sont pas en hypoxie afin de conserver le rapport ventilation/perfusion égal à 1 au niveau du poumon<sup>7</sup>. De nombreux mécanismes ont été décrits dans la mise en place de cette vasoconstriction hypoxique, notamment via une action directe de l'hypoxie sur les CML (inhibition de canaux  $K^+$ ,

augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par les CCDV et les réserves calciques intracellulaire)<sup>156, 157</sup>. La **Figure 16** présente les résultats d'une étude récente qui intègre à la fois la zone d'échanges gazeux (barrière alvéolocapillaire) qui est soumise à l'hypoxie et les artérioles qui se contractent<sup>7</sup>.



## 5. Les cavéoles

Comme nous l'avons vu précédemment, les forces d'étirement générées par la pression et le flux du sang sont importantes pour réguler l'état contractile des artères. Mais avant d'activer les SAC, les forces mécaniques ont d'abord une action sur la membrane plasmique. Cette dernière est une structure dynamique. Composée principalement de phospholipides, elle est une barrière entre le milieu intracellulaire et extracellulaire mais également une structure qui contient des protéines impliquées dans la signalisation cellulaire. Cependant, la membrane plasmique n'est pas homogène, sa fluidité dépendant de sa composition en lipides et de sa structure. C'est ainsi que certaines protéines et lipides peuvent être regroupés au sein de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques (« lipid rafts »). Ces derniers forment des portions de la membrane plasmique moins fluides, enrichies en cholestérol et sphingolipides notamment.

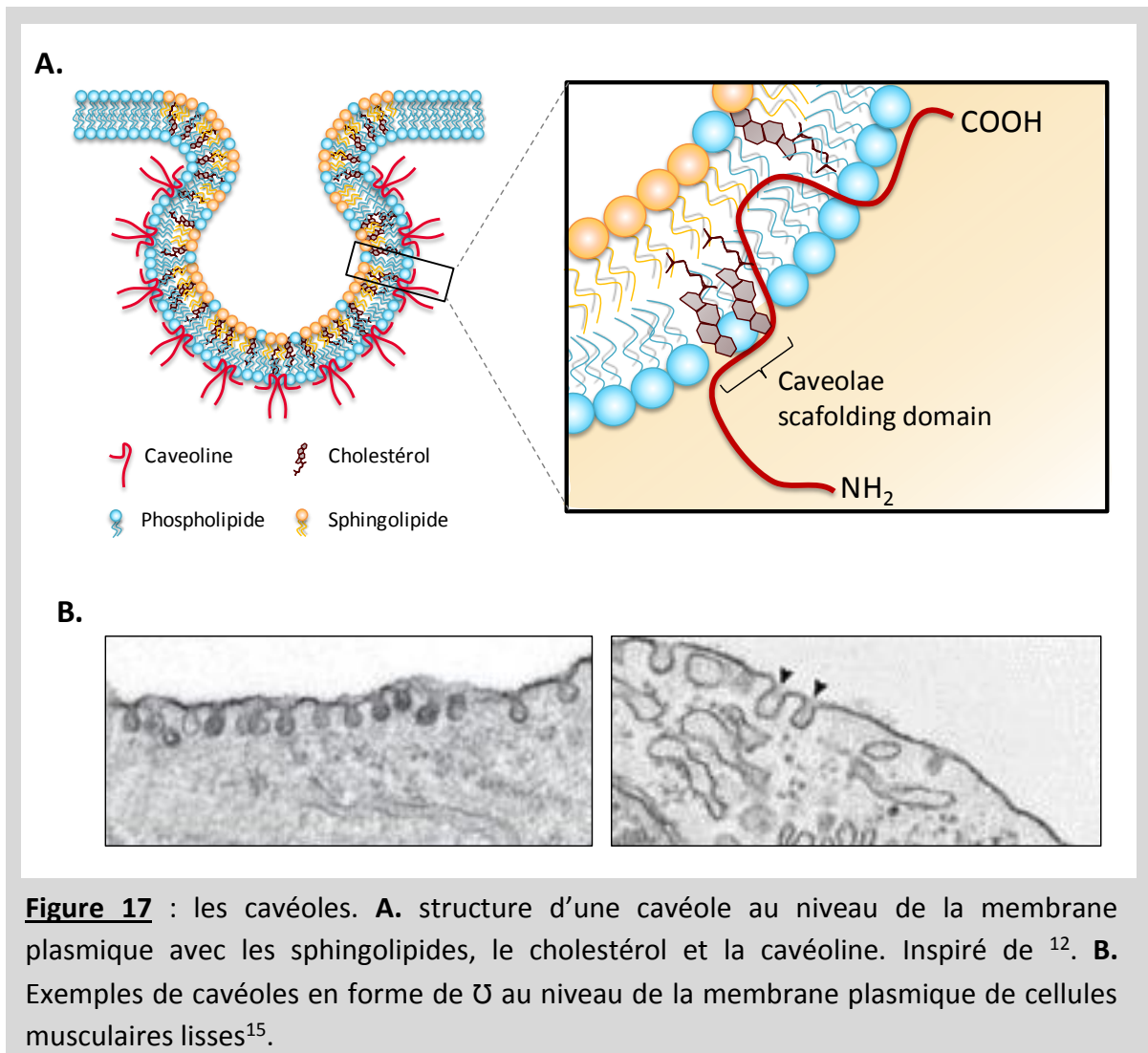
Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique de 50 à 100 nm de diamètre. Observées pour la première fois en 1953 au niveau des cellules endothéliales<sup>158</sup>, elles forment des microdomaines lipidiques riches en cholestérol, en sphingolipides et en une protéine : la cavéoline. Ces trois éléments réunis au sein de la membrane plasmique permettent la formation de « petites caves » en forme de  $\cup$  : les cavéoles (**Figure 17B**). Parmi les radeaux lipidiques, il convient de différencier ceux qui contiennent la cavéoline et ont une forme de  $\cup$  et les autres qui n'en contiennent pas et dont la membrane est plate<sup>159</sup>. Au niveau de la membrane, la présence de cavéoles, conjuguée au cholestérol, diminue la fluidité de la membrane<sup>160</sup>.

#### A. La cavéoline : la protéine qui structure les cavéoles

##### a) Synthèse de la cavéoline et formation des cavéoles

La cavéoline (**Cav**) est une protéine d'environ 22 kDa exprimée au niveau des membranes des cellules. Ce sont des protéines semi-transmembranaires enchâssées au niveau de la face cytoplasmique de la bicouche lipidique grâce à une hélice  $\alpha$  en épingle<sup>159</sup> et dont les deux extrémités C- et N-terminales sont cytoplasmiques<sup>12</sup> (**Figure 17A**). Les Cav sont synthétisées au niveau du réticulum endoplasmique où elles commencent à s'oligomériser entre elles pouvant former des complexes >400 kDa. Cette oligomérisation, stabilisée dans le Golgi grâce à la liaison du cholestérol au niveau d'un motif consensus (VTKYWFYR)<sup>161</sup>, est importante pour l'incorporation de la cavéoline dans les radeaux lipidiques de la membrane plasmique<sup>162</sup>. Une cavéoline peut fixer 1 à 2 molécules de cholestérol<sup>163</sup>. Des études ont estimé qu'une cavéole contenait environ  $144 \pm 39$  Cav<sup>164</sup> et plus de 20 000 molécules de cholestérol<sup>165</sup>. De ce fait, des agents hypocholestérolémiants sont couramment utilisés pour détruire les cavéoles<sup>166</sup>. Le plus connu est la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD) qui, en se combinant au cholestérol, le retire des membranes cellulaires<sup>167, 168</sup>. En l'absence de cholestérol dans les membranes, la cavéoline ne peut plus s'assembler en multimères, il en résulte une disparition des cavéoles au niveau de la membrane plasmique.

Une fois parvenue au niveau de la membrane plasmique, d'autres protéines, comme cavin, stabilisent le complexe pour former la cavéole<sup>169</sup>. La cavéoline peut également interagir avec de nombreuses protéines, telles que des récepteurs, des canaux, la eNOS, grâce à un domaine hautement conservé : le « caveolae scaffolding domain ».



**Figure 17** : les cavéoles. **A.** structure d'une cavéole au niveau de la membrane plasmique avec les sphingolipides, le cholestérol et la cavéoline. Inspiré de <sup>12</sup>. **B.** Exemples de cavéoles en forme de U au niveau de la membrane plasmique de cellules musculaires lisses<sup>15</sup>.

### i. Les isoformes de cavéoline

Il existe trois isoformes de Cav : la cavéoline-1 (Cav-1), la cavéoline-2 (Cav-2) et la cavéoline-3 (Cav-3). La Cav-1 est épissée en deux ARNm : Cav-1 $\alpha$  et Cav-1 $\beta$ . L'isotype  $\alpha$  contient les résidus 1 à 178 alors que l'isotype  $\beta$  contient les résidus 32 à 178, il est donc plus petit d'environ 3 kDa<sup>170</sup>. L'isotype  $\beta$  est plus exprimée en profondeur dans les cellules alors que l'isotype  $\alpha$  est à la fois exprimé à la surface et en profondeur<sup>171</sup>. La Cav-2 possède un isotype  $\alpha$ , qui se subdivise en deux sous-isotypes :  $\beta$  et  $\gamma$ <sup>172</sup>.

Étonnamment, même si les trois isoformes de Cav sont exprimées dans un même tissu, une souris KO pour la Cav-1 suffit à ne plus avoir de cavéoles au niveau de la membrane plasmique (sauf au niveau du muscle squelettique où Cav-3 est suffisante pour induire la formation de cavéoles dans ce tissu, spécifiquement). Par contre, la souris KO pour Cav-2 présente encore des cavéoles alors que la protéine n'est plus exprimée et que Cav-1 est présente<sup>172</sup>. Ainsi, dans les CML, Cav-1 est l'isoforme majeure impliquée dans la structuration des cavéoles en U alors que Cav-2 et Cav-3 en modèleraient l'expression. De

plus, seule Cav-1 est capable de former les oligomères nécessaires à la formation des cavéoles, contrairement à Cav-2 qui n'en est pas capable mais peut en former avec la Cav-1<sup>170</sup>.

#### ii. Les souris KO pour la cavéoline

Les souris KO pour la Cav-1 sont viables et fertiles. Cependant, elles sont complètement dépourvues de cavéoles sauf dans les tissus exprimant la Cav-3 comme le muscle squelettique. Avec cette perte de cavéoles, ces souris KO présentent de nombreuses anomalies phénotypiques : une diminution de leur durée de vie et de leurs capacités physiques. Le tissu exprimant le plus de Cav-1 étant le poumon, ce n'est pas étonnant de retrouver de nombreux désordres pulmonaires chez les souris Cav-1<sup>-/-</sup>. Ces souris présentent une hyperprolifération des cellules du parenchyme pulmonaire qui se caractérise par une réduction de l'épaisseur de la paroi alvéolaire, une fibrose pulmonaire et une hyperplasie endothéliale<sup>173</sup>. De plus, ces souris présentent une altération de la production de NO conduisant à une hypertension pulmonaire<sup>174</sup>. Elles développent également une cardiomyopathie et présentent un profil lipidique anormal : un taux sérique de cholestérol, de triglycérides et d'acides gras plus élevé<sup>175</sup>.

#### iii. Les cavéolines intracellulaires dans le trafic cellulaire

Bien que les cavéolines aient été à l'origine décrites comme ayant une importance dans la structure des cavéoles de la membrane plasmique, des études récentes commencent à montrer le rôle de la cavéoline indépendamment des cavéoles et notamment au niveau des organites intracellulaires : vésicules d'endocytose et d'exocytose, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mitochondries, noyau, endosomes, cavéosomes (fusion entre cavéoles et endosomes tardifs, riches en cavéoline<sup>12</sup>), lysosomes et gouttelettes lipidiques. Le rôle des cavéolines dans ces différents compartiments cellulaires est encore peu connu. La cavéoline permettrait de transférer le cholestérol d'un compartiment à l'autre, comme du réticulum à la mitochondrie. Ainsi, lorsque la membrane interne mitochondriale est riche en cholestérol et cavéoline, sa fluidité est réduite, engendrant des modifications dans l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale, la production de ROS et dans sa charge calcique. Dans les tissus à fort métabolisme énergétique, comme les myocytes cardiaques, une membrane plus fluide entraîne une augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale et de la production de ROS. Ainsi, un enrichissement en cavéoline et cholestérol mitochondrial serait cardioprotecteur<sup>176</sup>.

#### B. Les cavéoles comme réserve calcique

Une étude a montré qu'en l'absence de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, des CML bronchiques se contractent toujours en réponse au carbachol<sup>177</sup>. Le carbachol induirait une réponse calcique depuis deux réserves : le Ca<sup>2+</sup> du réticulum et le Ca<sup>2+</sup> contenu dans des domaines membranaires où le Ca<sup>2+</sup> ne s'équilibre pas avec le milieu extracellulaire. Ces domaines

seraient des réserves calciques. Les auteurs postulent que la source de ce  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire serait localisée dans des cavéoles et que le réticulum sous-membranaire le recyclerait<sup>178</sup>. En 1974, Popescu décrit pour la première fois, en microscopie électronique, dans des CML du muscle taenia coli du colon de cochon d'Inde, une accumulation importante d'ions  $\text{Ca}^{2+}$  au niveau de cavéoles<sup>179</sup>. Un an plus tard, ces cavéoles riches en  $\text{Ca}^{2+}$  ont été observées dans des CML d'AIP de rats et de cochon<sup>178, 180</sup>. Dès lors, les cavéoles peuvent être considérées comme une réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  à part entière pour les cellules, au même titre que le réticulum par exemple<sup>178</sup>.

### C. Cavéoles et mécanotransduction

Du fait de leur présence au niveau de la membrane plasmique, les cavéoles joueraient un rôle important dans la mécanotransduction, plus particulièrement en régulant la surface de la membrane plasmique.

#### a) Flux et cavéoles

Les cellules endothéliales sont soumises aux forces de cisaillement et la présence de cavéoles y est très importante. Une exposition chronique à un flux induit une augmentation du nombre de cavéoles au niveau de la membrane des CE, notamment grâce à une translocation de la Cav-1 du Golgi à la membrane plasmique<sup>181-183</sup>. De plus, comme nous l'avons vu dans le chapitre sur l'endothélium (en page 23), le flux a un effet sur la fluidité des cavéoles et la sécrétion d'agents vasodilatateurs comme l'ATP ou le NO. En effet, le couplage entre le flux et l'activation de la eNOS requiert la Cav-1 et une levée de son inhibition<sup>146, 183</sup>.

#### b) Étirement et cavéoles

Comment la cavéole peut-elle être impliquée dans la sensation d'étirement et quel est l'impact d'un étirement sur la structure des cavéoles ? Des études récentes ont montré que les cavéoles seraient des réserves de membrane impliquées dans la réponse à l'étirement<sup>16, 184-186</sup>. Les cavéoles serviraient de tampon pour amortir les forces d'étirement reçues par les cellules. Un choc osmotique entraîne une entrée d'eau et un gonflement de la cellule, de même qu'un étirement en augmente la taille. Comment une cellule peut-elle être capable d'augmenter sa taille sans qu'il y ait de rupture de sa membrane plasmique ? Afin de pouvoir supporter ce changement brutal de morphologie, la cellule disposerait de réserves de membrane plasmique : les cavéoles. Deux hypothèses sont formulées, l'une n'excluant par l'autre. La première est qu'un étirement conduit à augmenter la surface de la cellule par l'insertion de nouveaux lipides au niveau de la membrane plasmique<sup>187</sup>. Des cavéoles sous-membranaires fusionneraient avec la membrane plasmique et permettraient d'apporter une réserve de membrane supplémentaire<sup>184</sup> (**Figure 18**).

La seconde hypothèse est que les cavéoles déjà présentes au niveau de la membrane se déplieraient en réponse à l'étirement, ce qui augmenterait la surface de la membrane, sans modifier sa quantité en lipides<sup>16</sup>. Les cavéoles seraient une protection physique pour

empêcher la rupture de la cellule en cas d'étirement<sup>186, 188</sup>. Cette déformation de la cavéole est réversible puisque, à l'arrêt de l'étirement, la cavéole se reforme<sup>185</sup>. Cependant, le fait que l'étirement déplie les cavéoles est un phénomène passif, sans l'intervention du cytosquelette. Par contre, le réassemblage de nouvelles cavéoles en U nécessite l'ATP, l'actine<sup>185</sup> et la protéine Cavin<sup>185, 186</sup>. De plus, le dépliage des cavéoles en réponse à l'étirement provoquerait un déplacement des filaments d'actine liés à la cavéoline<sup>16</sup> (**Figure 18**).

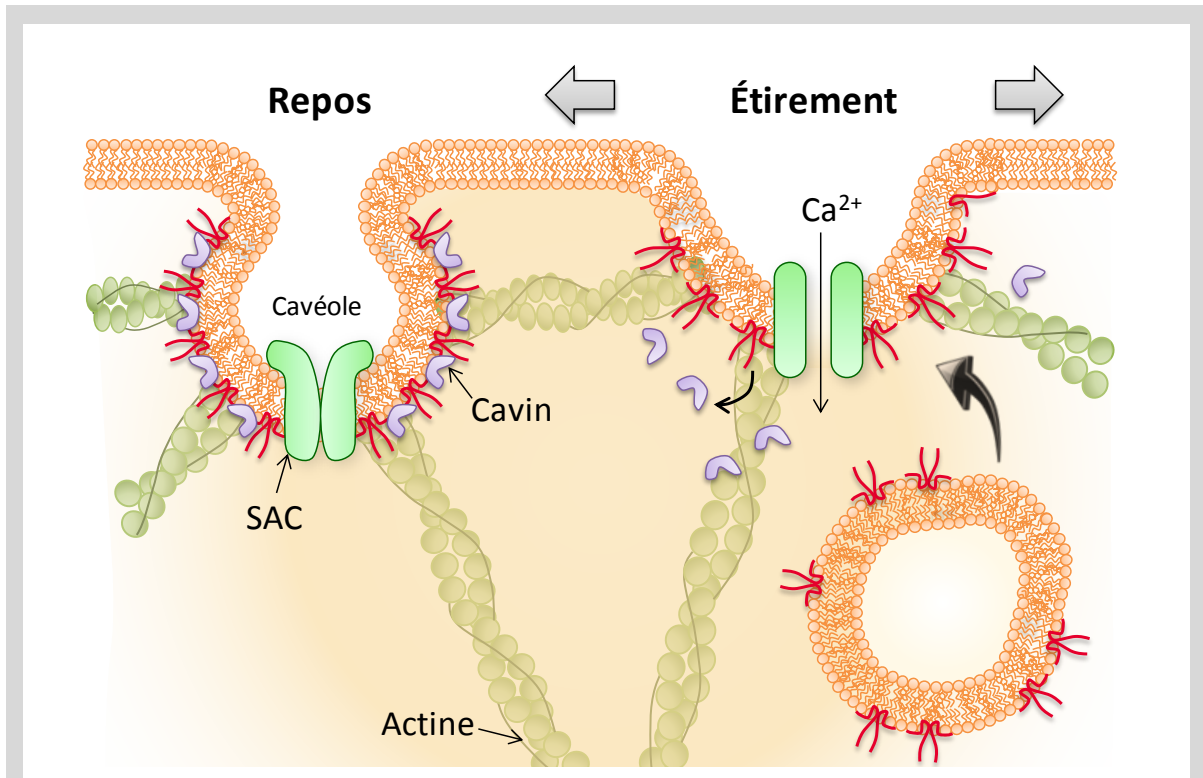
c) Ce mécanisme est-il présent dans les artères ?

Peu d'études ont montré l'impact d'une augmentation de pression ou l'étirement d'une artère sur la structure des cavéoles. Des études ont cependant été réalisées sur les artérioles et capillaires irriguant le muscle de la patte de rat. Dans les capillaires, une augmentation de la pression induit une disparition des cavéoles dans les CE<sup>189</sup>. Au niveau des artérioles de ce muscle, le tonus myogénique est altéré en présence de M $\beta$ CD<sup>190</sup>. De plus, le tonus myogénique est réduit dans les artères cérébrales<sup>128</sup> et mésentériques<sup>191</sup> des souris KO pour la Cav-1. Par ailleurs, au niveau des CML d'aorte de rat, un étirement chronique entraîne une redistribution de la Cav-1 à la membrane plasmique, au niveau des points d'adhésion focaux<sup>192</sup>. Ceci montre un rôle important des cavéoles dans la mécanotransduction des artères systémiques.

d) Cavéoles et SAC

Si l'étirement a un effet sur les cavéoles et la plasticité de la membrane plasmique, cela devrait avoir un impact sur l'activité des SAC. Cependant, peu d'études ont montré un lien direct entre les SAC et les cavéoles. Certaines suggèrent qu'une déplétion des cavéoles par de la M $\beta$ CD diminue l'activité des SAC via un réarrangement du cytosquelette d'actine<sup>43</sup>. En effet, l'effet de la M $\beta$ CD sur l'activité des SAC est contrebalancé lorsque le cytosquelette d'actine est désorganisé (par de la cytochalasine D) dans des cellules leucémiques<sup>43</sup>. L'hypothèse serait que lorsque la membrane est plate, le cytosquelette sous la membrane se réarrange et la maintient dans un état plus rigide, ce qui empêche les SAC de s'activer en réponse à l'étirement<sup>46</sup>. Les cavéoles permettraient de maintenir les SAC dans une membrane à la plasticité modulable. Dans le même ordre d'idée, l'activation des canaux TRPC6 par l'étirement nécessite leur présence au niveau de cavéoles<sup>193</sup>. Cependant, dans le muscle squelettique, l'hypothèse est l'inverse : en présence de M $\beta$ CD, la membrane est plus fluide car elle n'a plus de cholestérol. Elle est donc plus sensible à la pression et à l'étirement, l'activité des SAC est donc augmentée<sup>194</sup>. Les cavéoles formeraient des zones de protection des SAC qui se retrouvent exposés à l'étirement lors d'une trop forte contrainte mécanique ou un désassemblage des cavéoles<sup>194</sup> (**Figure 18**).



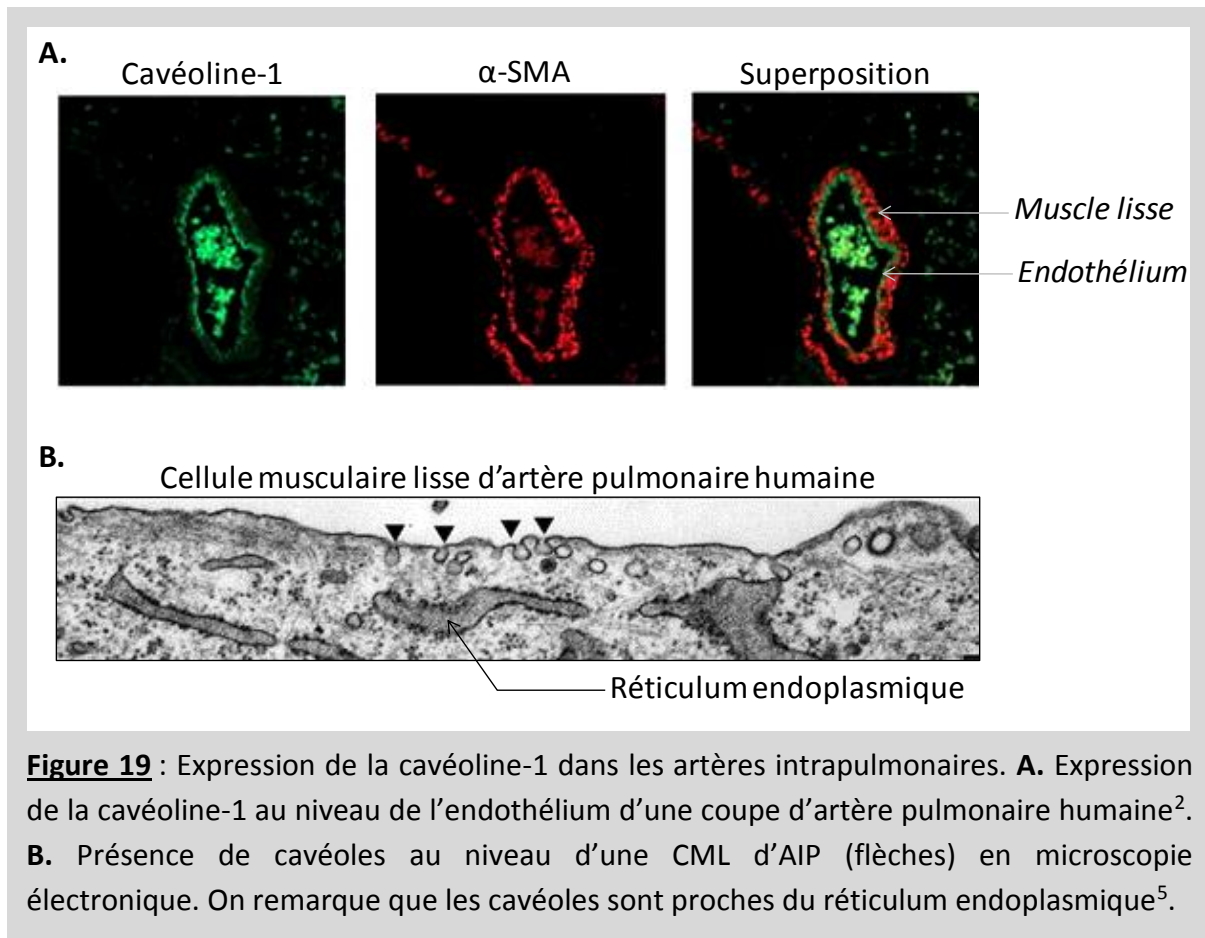


**Figure 18** : Effet de l'étirement sur les cavéoles. Un étirement provoquerait soit la fusion de cavéoles sous-membranaires avec la membrane plasmique, soit le dépliement des cavéoles du à la dissociation de la protéine Cavin des cavéoles. Suite à cela, les SAC pourraient être activés, provoquant une entrée du  $\text{Ca}^{2+}$  concentré dans les cavéoles. Le schéma est inspiré de <sup>16</sup>.

#### D. Expression de la cavéoline dans les CML d'AIP

La Cav-1 et la Cav-2 sont exprimées dans les AIP. Cependant, leur distribution et plus particulièrement la présence de cavéoles dans les CML d'AIP est controversée dans la littérature<sup>195</sup>. En effet, de nombreux articles montrent par des marquages en immunofluorescence sur des coupes de poumon que la Cav-1 est uniquement exprimée dans les CE mais n'est pas présente dans les CML, que ce soit chez le rat ou chez l'humain<sup>2, 196-203</sup>. Néanmoins, quelques articles montrent, par microscopie électronique, la présence de cavéoles dans les CML d'AIP<sup>5, 180, 204-207</sup>. Ces cavéoles contiendraient d'ailleurs de nombreuses protéines impliquées dans l'homéostasie calcique telles que des SERCA, PMCA, échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou encore CCDV de type L<sup>207</sup>.





→ Comme on peut l'observer dans la **Figure 19B**, les cavéoles sont situées proche du réticulum endoplasmique qui est l'une des réserves calciques intracellulaires les plus importantes. Dans les CML d'AIP, si le  $\text{Ca}^{2+}$  qui transite par les SAC contribue sans aucun doute à l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  observée après un étirement, ce  $\text{Ca}^{2+}$  est-il pour autant suffisant pour participer à la contractilité des CML ? Autrement dit, n'existerait-il pas des mécanismes d'amplification du signal calcique *via* le  $\text{Ca}^{2+}$  présent dans les réserves calciques intracellulaires ?

## Les réserves calciques intracellulaires

Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un messenger cellulaire extrêmement important pour la transduction de signaux intra et extracellulaires. L'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est hautement régulée afin d'activer des voies de signalisation adaptées aux stimuli reçus par les cellules. Pour maintenir l'homéostasie calcique, le  $\text{Ca}^{2+}$  est rapidement tamponné par des protéines cytoplasmiques et/ou par les organites intracellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries, lysosomes). De ce fait, afin d'assurer une propagation contrôlée des signaux calciques à travers les cellules, une fine coordination entre la libération du  $\text{Ca}^{2+}$  et les systèmes tampons est nécessaire. Les cibles du  $\text{Ca}^{2+}$  doivent être positionnées dans les cellules à des emplacements stratégiques impliqués dans la signalisation calcique<sup>208, 209</sup>. Dans cette partie seront détaillés les différentes réserves calciques intracellulaires, leur mode de fonctionnement et leur rôle dans la régulation spatio-temporelle de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ .

### 1. Le $\text{Ca}^{2+}$ du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique (**RE**), aussi appelé réticulum sarcoplasmique (**RS**) dans les cellules musculaires, forme un réseau continu de tubules au sein des cellules. On distingue le RE rugueux où s'effectue la synthèse des protéines grâce aux ribosomes qui lui sont associés ; du RE lisse, où les protéines subissent des modifications post-transcriptionnelles. Le RE/RS est considéré comme la principale réserve de  $\text{Ca}^{2+}$  d'une cellule. Il intervient à la fois en tant que réserve calcique mobilisable et comme tampon du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique pour maintenir une  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de l'ordre de 100 nM. Lorsqu'il est impliqué dans la libération de  $\text{Ca}^{2+}$ , il permet soit une augmentation locale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , soit d'amplifier des signaux calciques cellulaires afin de les propager à travers la cellule. Cependant, même si le RE/RS est un compartiment continu, on peut distinguer au sein d'une même cellule différentes réserves calciques indépendantes. Leur mobilisation permet aux cellules de créer des dynamiques calciques cellulaires précises et adaptées aux différents stimuli. Cette hétérogénéité des stocks calciques dans un même organite continu est due à une distribution spatiale précise et hétérogène des canaux et pompes calciques impliqués dans l'homéostasie calcique du RE/RS<sup>210, 211</sup>. Parmi les canaux permettant la sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS, on retrouve principalement les récepteurs à la ryanodine (RyR) et les récepteurs à l' $\text{IP}_3$  ( $\text{IP}_3\text{R}$ ). Les pompes  $\text{Ca}^{2+}$  ATPases du RE/RS (sarco/endoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase = SERCA) permettent quant à elles de recharger le RE/RS en  $\text{Ca}^{2+}$ .

#### A. Les récepteurs à la ryanodine (RyR)

##### a) Structure et fonction des RyR

Les récepteurs à la ryanodine (RyR) sont des récepteurs ancrés à la membrane du RE/RS. Assemblés sous forme d'homotétramères, les RyR font partie des canaux ioniques les

plus volumineux avec un poids moléculaire avoisinant les 2,2 MDa (chaque sous-unité du tétramère faisant environ 565 kDa), 270 Å de largeur et 115 Å de hauteur (**Figure 20C**). Ils permettent de libérer des ions tels que le  $\text{Ca}^{2+}$  depuis la lumière du RE/RS vers le cytosol. Le pore du canal se situe dans la région membranaire du RyR qui représente 1/5<sup>ème</sup> de la taille totale du canal<sup>13, 212-214</sup>.

La partie cytosolique du RyR est appelée « le pied » (**Figure 20A**). Ce dernier se compose de plusieurs sous-domaines : une région « pince » aux extrémités, des régions « bras » et « centrale », ainsi que la région « colonne » qui permet l'ancrage de la partie cytosolique à la partie membranaire du canal. La région « pince » subit le plus de changements conformationnels lors de l'ouverture/fermeture du RyR (**Figure 20D**). Ces changements permettent l'ouverture de l'intérieur du canal et ainsi facilite le passage du  $\text{Ca}^{2+}$  (**Figure 20B**). C'est également au niveau de cette région que se fixent différentes protéines et ions régulateurs tels que le  $\text{Ca}^{2+}$ , le  $\text{Mg}^{2+}$ , la FK506-binding protein 12 (FKBP12), la CaM, la PKA, les ROS,... (**Figure 21B**)<sup>13, 17, 212, 214</sup>.

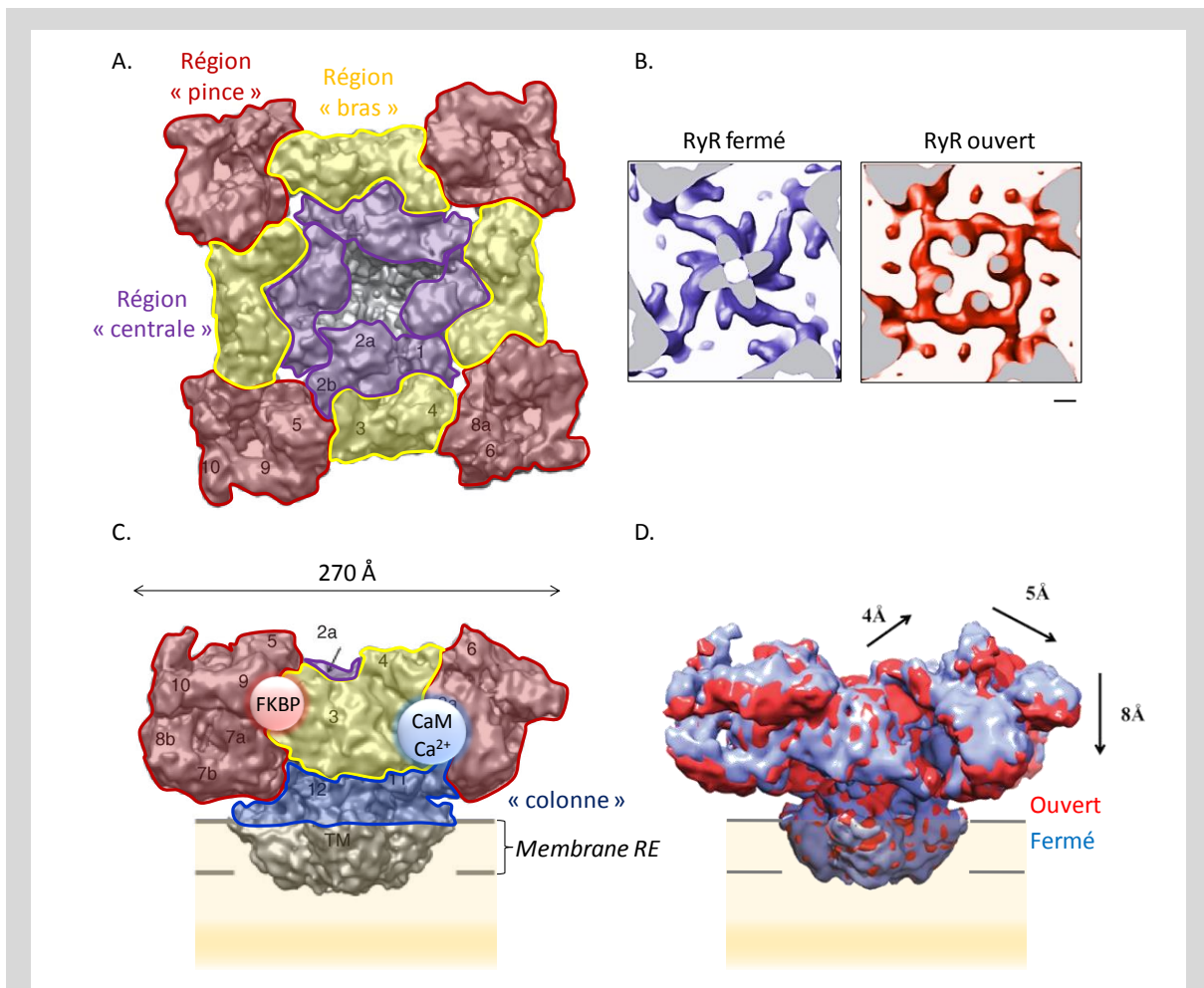
#### b) Les différentes isoformes de RyR

Il existe trois isoformes de RyR chez les mammifères : RyR1, RyR2 et RyR3 dont la structure diffère majoritairement au niveau de la région « pince ». Chacune de ces isoformes est codée par un gène différent mais présentent 65% d'identité de séquence<sup>13, 212</sup>.

Ces canaux se retrouvent dans de nombreux types cellulaires, tels que le cœur, le cerveau, le muscle squelettique ou de nombreux muscles lisses. En fonction des tissus, l'expression d'une ou plusieurs isoformes de RyR est retrouvée. Au niveau du muscle squelettique, on retrouve RyR1 au niveau de la jonction entre la membrane plasmique et la partie terminale du RS. Il interagit physiquement avec les CCDV  $\text{Ca}_v1.1$  formant le couplage excitation-contraction au niveau musculaire<sup>212</sup>.

Au niveau du cœur, l'isoforme prédominante est RyR2. Ces derniers sont localisés dans le RS proche des tubules T, où ils sont associés aux CCDV  $\text{Ca}_v1.2$  cardiaques. Toutefois, c'est l'entrée de  $\text{Ca}^{2+}$  par le  $\text{Ca}_v1.2$  à la suite d'une dépolarisation qui active à son tour le RyR2 sous-jacent, provoquant une amplification du signal calcique<sup>212</sup>.

RyR3 a été tout d'abord montré comme exprimé au niveau de différentes régions du cerveau et du diaphragme. Cependant, ce tissu n'exprime pas cette isoforme uniquement et de nombreux autres tissus en possèdent, y compris le muscle squelettique.



**Figure 20** : Structure des récepteurs à la ryanodine. **A et C.** Structure en cryo-électromicroscopie en vue de dessus (**A**) et en vue latérale (**C**) d'un RyR assemblé en tétramère<sup>13</sup>. Chaque tétramère se compose de 4 parties : une région dite « pince » aux extrémités (en rouge), une région « bras » entre les extrémités de deux monomères (en jaune), une région « centrale » (en violet) et la « colonne » qui ancre le « pied » cytosolique à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). **B.** Représentation des états fermé et ouvert du RyR par le rapprochement des hélices  $\alpha$  au niveau de la région centrale du RyR. La barre d'échelle représente 10 Å<sup>17</sup>. **D.** Mouvements allostériques du RyR lors de son ouverture<sup>13</sup>.

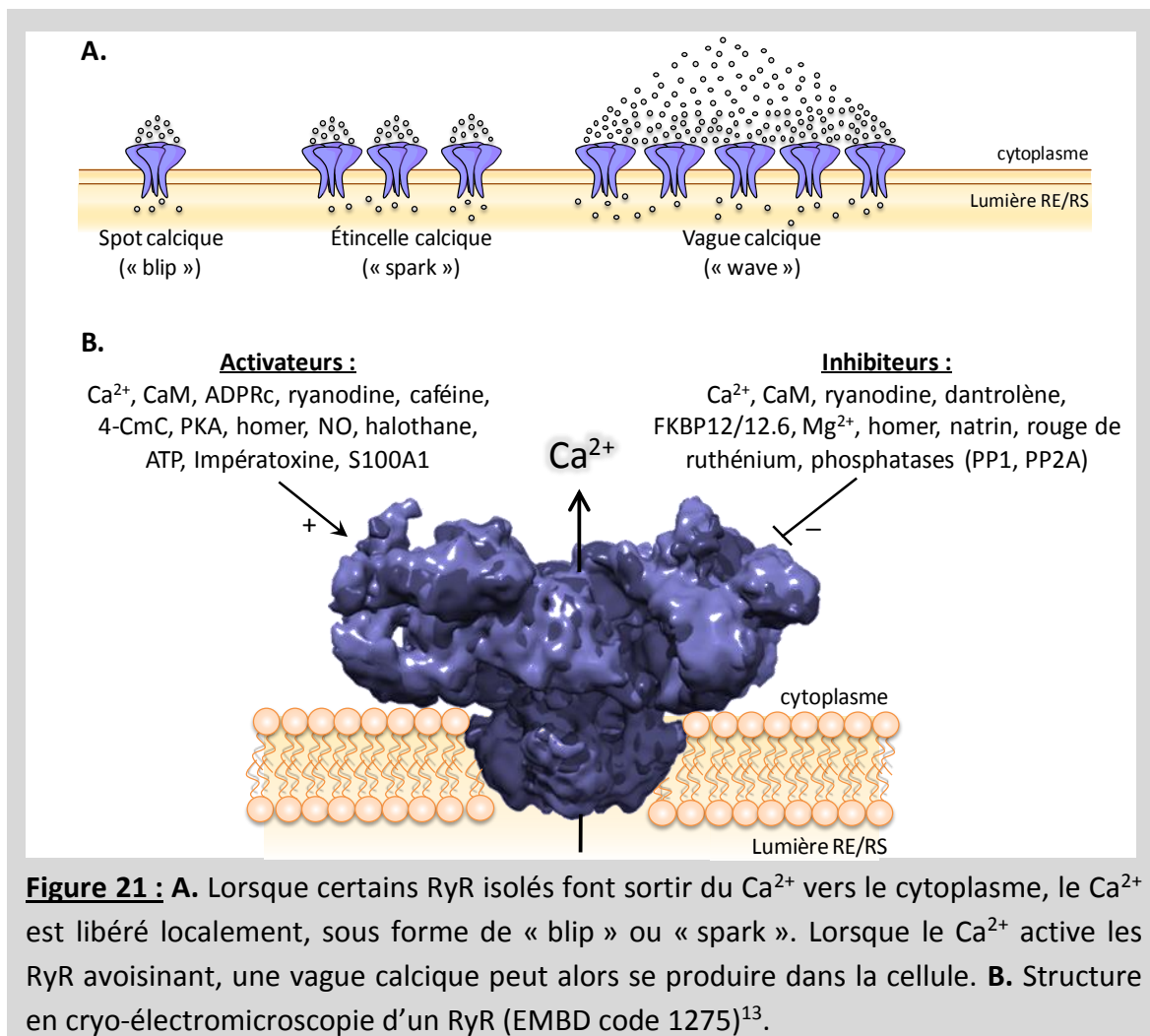
### c) La régulation des RyR

#### i. Le $\text{Ca}^{2+}$ : un activateur et un inhibiteur des RyR

L'activité des RyR est régulée par différents mécanismes. Le principal modulateur des RyR est le  $\text{Ca}^{2+}$  lui-même, à la fois le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytosol et le  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS. Son action est complexe : il est activateur, inhibiteur et il est l'ion conduit à travers le canal. Le mécanisme d'activation des RyR par le  $\text{Ca}^{2+}$  est décrit comme « en cloche », rendant le système auto-régulateur. De 0 à 100  $\mu\text{M}$ , le  $\text{Ca}^{2+}$  cytoplasmique augmente la probabilité d'ouverture du RyR et de 1 à 5 mM le  $\text{Ca}^{2+}$  devient un inhibiteur<sup>14, 215</sup> (**Figure 22A**). Ainsi, lorsque le  $\text{Ca}^{2+}$

active un RyR, ce dernier libère du  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS vers le cytoplasme, un mécanisme appelé **CICR** pour « calcium-induced calcium release ». Lorsque du  $\text{Ca}^{2+}$  sort du RE/RS, la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE/RS}}$  diminue localement ce qui diminue l'activation du canal par le  $\text{Ca}^{2+}$  du réticulum, il s'inactive<sup>215, 216</sup>.

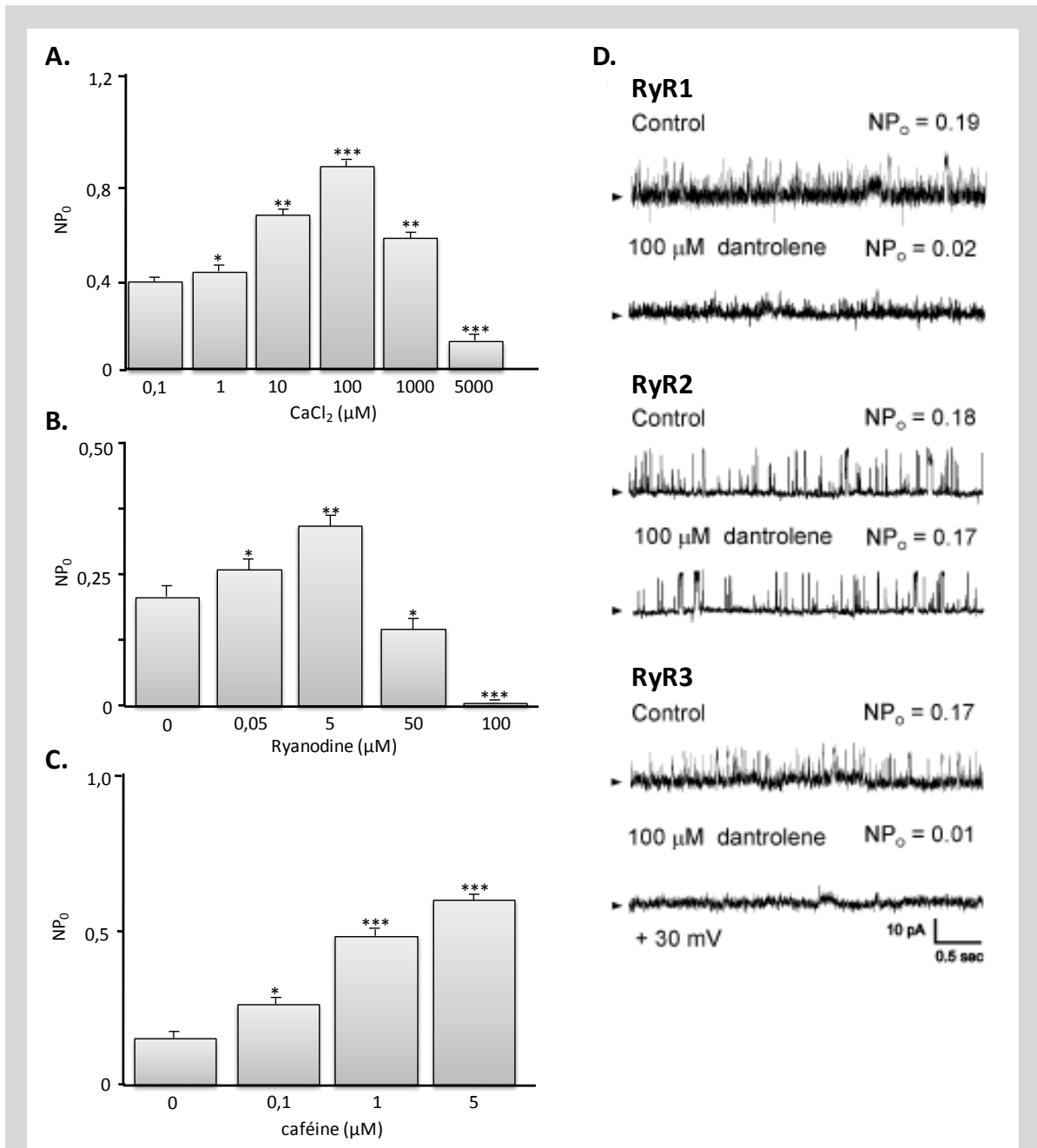
De cette manière, si les RyR sont isolés dans la cellule, le  $\text{Ca}^{2+}$  n'est libéré que localement dans le cytoplasme, c'est ce que l'on appelle un « spark » en anglais. Par contre, si de nombreux RyR sont situés les uns à côté des autres, ils peuvent s'activer mutuellement, provoquant une vague calcique à travers la cellule, jusqu'à ce que la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  s'élève et la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE/RS}}$  diminue au point d'inhiber les RyR (**Figure 21A**).



De plus, toutes les isoformes de RyR ne possèdent pas la même sensibilité au  $\text{Ca}^{2+}$  : RyR2 est plus sensible au  $\text{Ca}^{2+}$  que RyR3 qui est lui-même plus sensible que RyR1 ( $\text{RyR2} > \text{RyR3} > \text{RyR1}$ )<sup>217</sup>. Par exemple, la probabilité d'ouverture de RyR1 est augmentée d'environ 10 fois lorsque la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  passe de 1 de 100  $\mu\text{M}$ <sup>218</sup>.

## ii. Les activateurs des RyR

Physiologiquement, un autre activateur des RyR est l'ADP ribose cyclique (ADPRC) produit par le coenzyme membranaire CD38, même si son action directe sur les RyR est controversée<sup>218</sup>. Un activateur exogène des RyR est la caféine qui augmente leur probabilité d'ouverture de façon concentration-dépendante (**Figure 22C**). La caféine augmente la sensibilité du RyR au  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS en diminuant le seuil d'activation du RyR par le  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS. Autrement dit, le RyR sera plus actif pour des  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RE/RS}}$  plus faibles<sup>216</sup>.



**Figure 22 :** Probabilité d'ouverture des RyR en présence de différentes concentrations de  $\text{CaCl}_2$  (A), ryanodine (B) ou caféine (C). D. Activité de RyR1, RyR2 et RyR3 en absence ou présence de dantrolène (DT). Le DT inhibe RyR1 et RyR3 mais n'inhibe pas RyR2<sup>14</sup>.



### iii. Les inhibiteurs des RyR

Le  $Mg^{2+}$ , par compétition avec le  $Ca^{2+}$ , est un inhibiteur des RyR. Des protéines régulatrices telles que le FKBP12 (pour RyR1) ou FKBP12.6 (pour RyR2) stabilisent le RyR dans un état fermé. La ryanodine, un alcaloïde végétal qui a donné son nom au récepteur, se lie sur le canal à l'état actif pour de faibles concentrations (de 0 à 10  $\mu M$ ), augmentant sa conductance et donc sa perméabilité au  $Ca^{2+}$ . Par contre, à de fortes concentrations (de 50 à 100  $\mu M$ ), le canal s'inhibe et ne laisse plus transiter le  $Ca^{2+}$  (**Figure 22B**). Le dantrolène, un médicament utilisé dans l'hyperthermie maligne, inhibe sélectivement RyR1 et RyR3, sans inhiber RyR2 (**Figure 22D**)<sup>14, 219</sup>. Le dantrolène permet donc d'inhiber l'activité contractile des muscles striés sans toucher le muscle cardiaque. La liste des différents inhibiteurs et activateurs est présentée en **Figure 21B**<sup>13</sup>.

### d) Les souris KO des RyR

Chaque gène codant pour une isoforme de RyR a été invalidé chez la souris (souris KO). Cependant, seules les souris KO pour RyR3 sont viables mais présentent certains problèmes de sociabilité<sup>220, 221</sup>. Les KO RyR1 meurent en périnatal en raison d'une insuffisance respiratoire<sup>222</sup> et les KO RyR2 meurent précocement durant le développement embryonnaire en raison d'une défaillance cardiaque<sup>223</sup>.

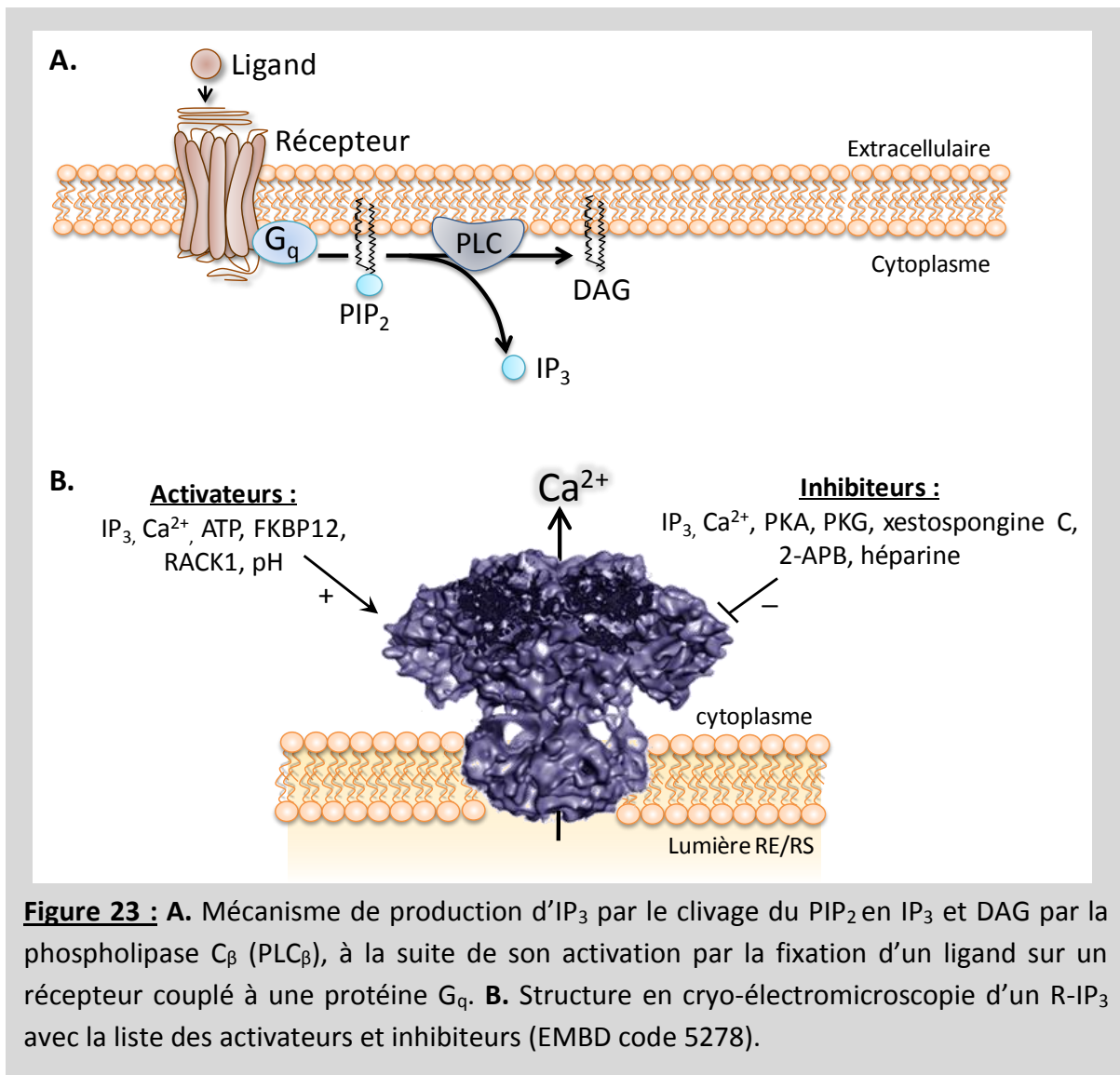
### e) Les pathologies associées aux RyR

Plus de 300 mutations de RyR sont associées à des pathologies humaines. Ces mutations se situent pour la plupart au niveau de la région centrale du canal. Ce sont des mutations gain de fonction qui augmentent le seuil de sensibilité du RyR. Par exemple, des mutations activatrices de RyR1 sont associées à l'hyperthermie maligne (une pathologie associée à un désordre pharmacogénétique avec une hausse rapide de la température corporelle et une rigidité musculaire). Le dantrolène (DT), un dérivé de l'hydantoïne, est utilisé lors d'épisodes d'hyperthermie maligne depuis les années 1970 et a permis de diminuer le taux de mortalité de 80% à 5% en inhibant RyR1<sup>212</sup>. Des mutations de RyR2 se retrouvent dans des pathologies associées à des arythmies cardiaques au cours desquelles le canal est là aussi suractivé au niveau des ventricules<sup>13</sup>.

## B. Les récepteurs à l'IP<sub>3</sub>

Les récepteurs à l'IP<sub>3</sub> (IP<sub>3</sub>R) présentent de fortes homologues avec les RyR, tant par leur structure que par leur fonction<sup>214</sup>. Ces protéines du RE/RS forment des homotétramères de 1,3 MDa (chaque sous-unité du tétramère faisant environ 305 kDa) et laissent transiter du  $Ca^{2+}$  depuis le RE/RS vers le cytoplasme. Trois isoformes de IP<sub>3</sub>R ont été identifiées (IP<sub>3</sub>R1, 2 et 3) et les isoformes 1 et 3 sont majoritairement exprimées dans les CML. Les IP<sub>3</sub>R2  $\gamma$  sont également exprimés mais en de plus faibles quantités<sup>224</sup>.

Les IP<sub>3</sub>R sont activés par de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP<sub>3</sub>), d'où leur nom. L'IP<sub>3</sub> est produit lors de l'activation de nombreux récepteurs membranaires couplés à des protéines G<sub>q/11</sub>. L'activation de la protéine G<sub>q/11</sub> active la phospholipase C β (PLC<sub>β</sub>) qui clive le PIP<sub>2</sub> en IP<sub>3</sub> et diacylglycérol (DAG). La PLC<sub>γ</sub> peut également produire de l'IP<sub>3</sub> lorsqu'elle est activée par une kinase comme Src<sup>225</sup>. L'IP<sub>3</sub> a la capacité de se fixer au niveau de la partie N-terminale cytoplasmique du IP<sub>3</sub>R, ce qui augmente sa perméabilité au Ca<sup>2+</sup> (**Figure 23A**)<sup>224</sup>.



Par ailleurs, tout comme les RyR, les IP<sub>3</sub>R sont également sensibles au Ca<sup>2+</sup>. Cette sensibilité au Ca<sup>2+</sup> présente une forme en cloche, c'est-à-dire que de faibles [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> vont activer les IP<sub>3</sub>R alors que de fortes [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> vont les inhiber. Les IP<sub>3</sub>R fonctionnent donc de concert avec les RyR, ils peuvent s'activer et s'inhiber mutuellement lorsqu'ils sont proches. Ils sont donc impliqués dans les oscillations calciques dans les cellules<sup>224</sup>.



D'autres modulateurs de l'activité des IP<sub>3</sub>R existent, tels que l'ATP, les protéines FKBP12 ou RACK1 qui augmentent la probabilité d'ouverture induite par l'IP<sub>3</sub> ou encore des modifications du pH cytoplasmique (chaque isoforme de IP<sub>3</sub>R n'étant pas sensible aux mêmes pH : IP<sub>3</sub>R1 sont plus sensibles à pH 6,8 et IP<sub>3</sub>R3 à pH 7,5). De façon endogène, le Ca<sup>2+</sup>, l'IP<sub>3</sub>, la PKA et la PKG sont des inhibiteurs des IP<sub>3</sub>R et de façon exogène, les IP<sub>3</sub>R peuvent être inhibés par la xestospongine C, le 2-APB ou l'héparine en intracellulaire (**Figure 23B**)<sup>224</sup>.

Enfin, les IP<sub>3</sub>R peuvent interagir avec d'autres protéines, telles que des canaux TRPC3 ou TRPC6 de la membrane plasmique ou des canaux potassiques (BK<sub>Ca</sub>), comme qu'il a été montré dans les CML d'artères cérébrales<sup>224, 226, 227</sup>.

De nombreuses pathologies sont associées à des défauts de fonctionnement des IP<sub>3</sub>R. Au niveau vasculaire, les altérations de l'homéostasie calcique associée aux IP<sub>3</sub>R sont retrouvées dans l'hypertension systémique (notamment au niveau des artères cérébrales), l'athérosclérose et les complications vasculaires liées au diabète. Par exemple, on constate une plus forte [IP<sub>3</sub>]<sub>i</sub> et une plus forte affinité de l'IP<sub>3</sub> pour ses récepteurs chez des modèles de rats asthmatiques ou chez des rats spontanément hypertendus. A l'inverse, l'expression et l'activité des IP<sub>3</sub>R sont réduites dans les CML aortiques lors de l'athérosclérose et du diabète. Des souris KO IP<sub>3</sub>R1 ne sont généralement pas viables et présentent des problèmes neurologiques lorsqu'elles survivent<sup>224</sup>.

### C. Les pompes SERCA (Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase)

#### a) Structure et fonction des SERCA

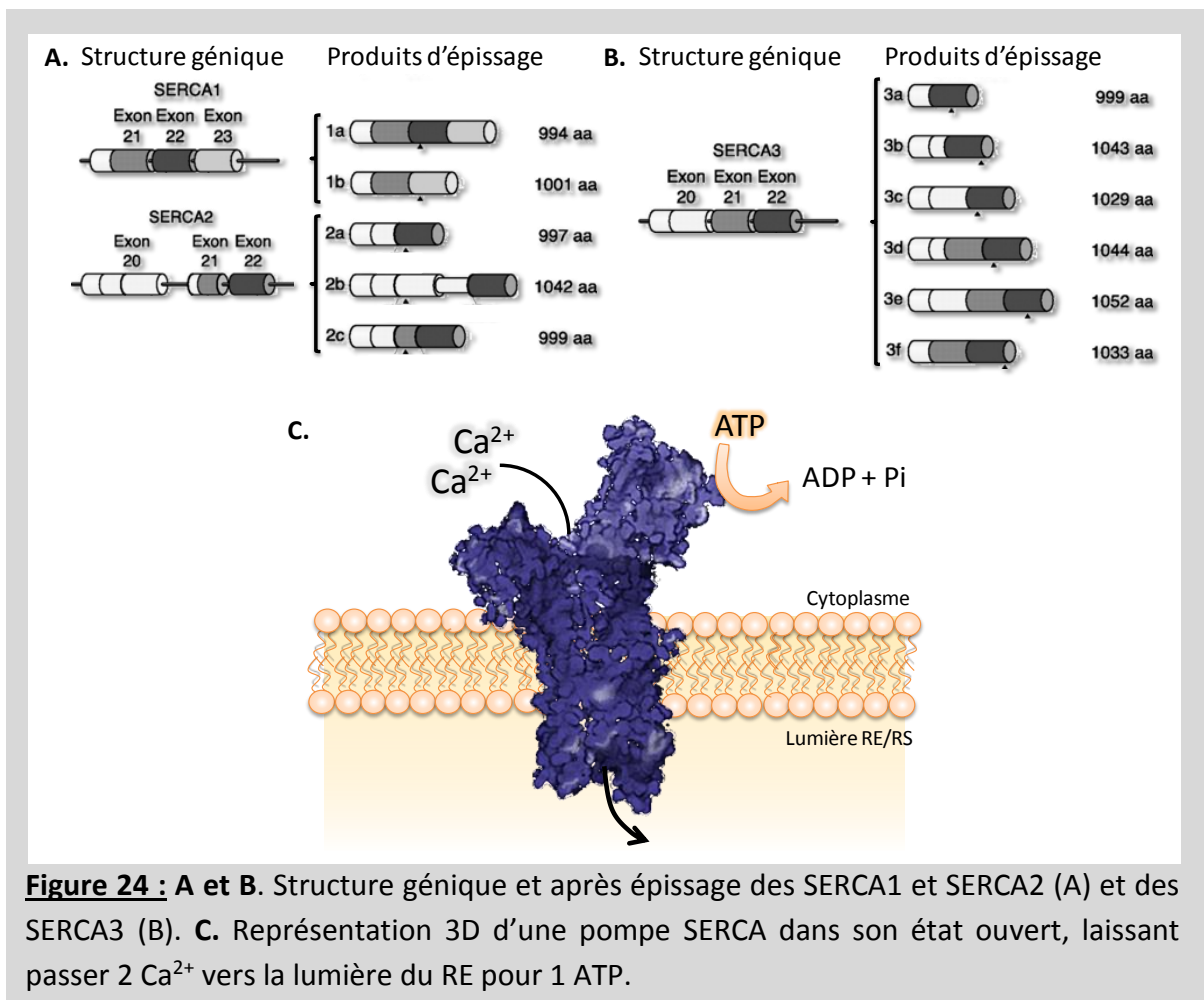
Les SERCA sont des pompes calciques présentes au niveau de la membrane du RE/RS. Elles permettent de recharger le RE/RS en Ca<sup>2+</sup> grâce à l'énergie fournie par l'ATP. Lorsque 1 ATP se fixe sur la pompe SERCA, celle-ci change de conformation en hydrolysant l'ATP en ADP + P<sub>i</sub>. Ce changement permet une rotation des hélices α de la SERCA au niveau de la membrane, ce qui permet le passage de deux ions Ca<sup>2+</sup> depuis le cytoplasme jusque dans la lumière du RE/RS. Cette entrée de charges positives est contrebalancée par un co-transport d'ions H<sup>+</sup> vers le cytoplasme (**Figure 24C**)<sup>228</sup>.

Il existe trois gènes codant pour différentes SERCA (SERCA1, 2 et 3) dont l'épissage donne lieu à différentes isoformes : SERCA 1a et 1b, SERCA2a, 2b et 2c et les SERCA3 allant de 3a à 3f (**Figure 24A et B**). Ce qui différencie les isoformes SERCA2a de SERCA2b est la partie C terminale de SERCA2a qui présente les acides aminés NYLEPAILE<sup>228, 229</sup>.

#### b) Les propriétés des différentes SERCA

En fonction des isoformes, la sensibilité au Ca<sup>2+</sup> n'est pas la même. L'extrémité C-terminale qui diffère entre les SERCA2 joue un rôle dans ces différences fonctionnelles : les SERCA2b étant plus sensibles au Ca<sup>2+</sup> que les SERCA2a qui sont plus sensibles que les

SERCA2c. De la même façon, les SERCA2 ont une plus forte affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  que les SERCA3. Autrement dit, les SERCA3 transportent le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RE pour de plus fortes concentrations cytoplasmiques que les SERCA2 ( $\text{SERCA2b} < \text{2a} < \text{2c} < \text{3}$ )<sup>230</sup>. Tous les tissus n'expriment pas les mêmes isoformes de SERCA. Les muscles squelettiques expriment surtout les pompes SERCA2a et SERCA1a (1b y étant exprimée à l'état embryonnaire où elle participe à la croissance des fibres musculaires)<sup>231</sup>, tandis que le cœur exprime surtout les isoformes SERCA2a, 2b, 2c, 3a, 3d et 3f<sup>228, 229</sup>. Dans les myocytes cardiaques, chaque isoforme présente une localisation particulière qui sous-tend une fonction précise, allant du couplage excitation/contraction à la transcription<sup>229</sup>. Quant aux SERCA3, elles sont exprimées au niveau du cœur, des plaquettes<sup>232</sup>, des cellules  $\beta$  pancréatiques<sup>233</sup>, des cellules épithéliales bronchiques<sup>234</sup>, de l'aorte thoracique (CML et CE<sup>235</sup>)<sup>236</sup> et dans des cellules endothéliales d'artère pulmonaire humaine<sup>237</sup> où elles sont impliquées dans la relaxation vasculaire.



**Figure 24 :** A et B. Structure génétique et après épissage des SERCA1 et SERCA2 (A) et des SERCA3 (B). C. Représentation 3D d'une pompe SERCA dans son état ouvert, laissant passer 2  $\text{Ca}^{2+}$  vers la lumière du RE pour 1 ATP.

c) Les souris KO pour les SERCA

Les souris KO pour SERCA1 présentent des hypercontractures des muscles squelettiques et du diaphragme, ainsi que des problèmes respiratoires conduisant à une mort précoce après la naissance. Sans compensation avec les autres SERCA, ceci montre le rôle primordial des SERCA1 dans le couplage excitation/contraction. Les souris KO où le gène SERCA2a a été invalidé et remplacé par celui de SERCA2b présentent des malformations cardiaques et un taux de mortalité à la naissance plus élevé de 40%, montrant l'importance de SERCA2a pour le développement et la fonction cardiaque. Les souris hétérozygotes pour SERCA2 ont une incidence de carcinome épidermoïde plus élevée à partir de 53 semaines, due à une diminution de l'activité des SERCA2. Quant aux souris KO pour SERCA3, elles ne présentent pas de phénotype particulier<sup>228</sup>.

d) Les activateurs et les inhibiteurs des SERCA

Le phospholamban (PLB) est une protéine régulatrice des SERCA qui interagit avec les SERCA1a, SERCA2a, SERCA2b mais pas avec les SERCA3. Lorsqu'il n'est pas phosphorylé, le PLB inhibe la pompe en diminuant son affinité pour le  $\text{Ca}^{2+}$  en se fixant au niveau de sa partie N-terminale cytosolique, séquence qui n'est pas présente sur les SERCA3<sup>228</sup>. Ainsi, des phosphatases, via leur action sur le PLB, vont augmenter l'activité de la pompe. Le NO, dans les CML a la capacité d'activer les SERCA2, un processus qui intervient dans la vasodilatation dépendante du NO car il permet la recapture du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique dans les CML<sup>238</sup>.

De façon exogène, plusieurs inhibiteurs sont couramment utilisés pour inhiber les SERCA et vider le RE en  $\text{Ca}^{2+}$ . Le 2,5-di(t-butyl)hydroquinone (**tBHQ**) et le vanadate sont des inhibiteurs plus sélectifs des SERCA3 que des SERCA2<sup>230, 239</sup>. Pour les SERCA2, l'acide cyclopiazonique (**CPA**) inhibe plus sélectivement les SERCA2b et la thapsigargine (**TG**) les SERCA2a. La capacité du CPA et de la TG d'inhiber spécifiquement une isoforme de SERCA2 dépend de leurs propriétés pharmacocinétiques respectives telles que leur sélectivité d'accès, l'environnement cytoplasmique local (pH et concentration en ATP), leur hydrophobicité et leur différence d'affinité pour chacune des isoformes<sup>240-245</sup>. Ainsi, alors qu'initialement, la TG et le CPA avaient été décrits indifféremment comme inhibiteurs des SERCA2a et 2b, plusieurs études récentes tendent à indiquer que chacune de ces molécules est capable d'inhiber une isoforme de SERCA2 et donc de vider des stocks calciques distincts.

e) Les pathologies associées aux SERCA

Des dysfonctions des pompes SERCA, dues à des mutations ou à des modifications d'expression de la pompe, sont associées à certaines pathologies cardiaques, musculaires et à certains cancers. Ces altérations touchent toutes les isoformes de SERCA et conduisent à des perturbations de l'homéostasie calcique. Des thérapies géniques chez l'homme sont actuellement en cours avec la réinsertion d'un gène codant pour une SERCA2a fonctionnelle dans le traitement de l'insuffisance cardiaque<sup>246-248</sup>.

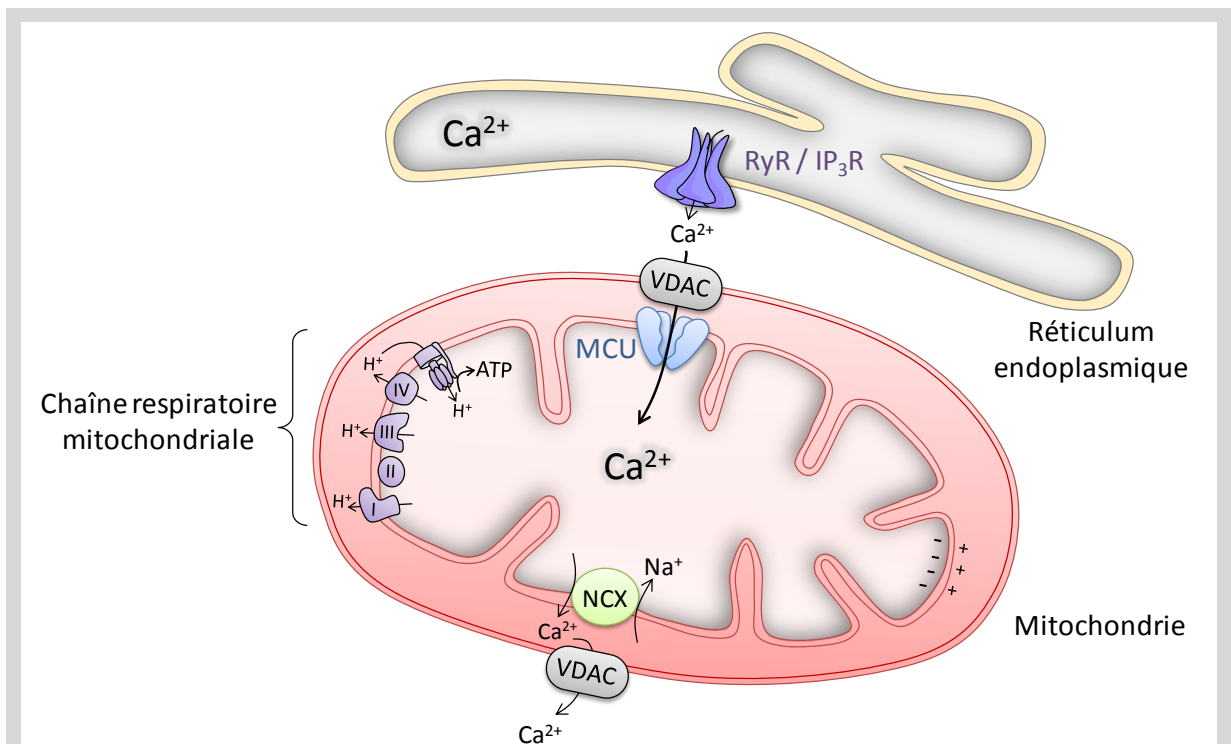
#### D. Le système STIM/Orai pour la recharge du RE en Ca<sup>2+</sup>

Lorsque la  $[Ca^{2+}]_i$  n'est pas suffisante pour recharger le Ca<sup>2+</sup> du RE/RS par les SERCA, les cellules ont la capacité de recruter le Ca<sup>2+</sup> extracellulaire, grâce au système STIM et Orai. STIM est une protéine du RE/RS sensible à la  $[Ca^{2+}]_{RE/RS}$  grâce à un domaine EF (EF-hand). Lorsque la  $[Ca^{2+}]_{RE/RS}$  diminue sous un certain seuil, les protéines STIM se regroupent au niveau de la membrane du RE/RS et migrent vers la membrane plasmique. Une fois proches de la membrane, STIM interagissent avec les protéines Orai de la membrane plasmique. Cette interaction favorise l'entrée de Ca<sup>2+</sup> depuis le milieu extracellulaire vers le RE/RS. Ce mécanisme est appelé SOCE pour « Store Operated Calcium Entry ». De plus, dans certaines cellules, Orai ne serait pas suffisante pour induire un courant SOC qui nécessiterait des canaux TRPC1<sup>40, 108</sup>.

## 2. Le Ca<sup>2+</sup> mitochondrial

Les mitochondries sont le siège de la production d'ATP cellulaire par la chaîne respiratoire mitochondriale. Toutefois, ces organites sont aussi importants en tant que réserve de Ca<sup>2+</sup> pour les CML puisqu'elles ont la capacité de tamponner le Ca<sup>2+</sup> cytosolique. Leur pouvoir tampon est 100 fois supérieur à celui du cytoplasme, rendant le système insaturable. Cependant, les mitochondries ont une faible affinité pour le Ca<sup>2+</sup>, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de tamponner le Ca<sup>2+</sup> lorsque sa concentration est très élevée dans leur environnement proche. Ainsi, dans des CML natives, les mitochondries ne sont pas distribuées au hasard dans les cellules mais apparaissent proches des sites d'influx calciques où le Ca<sup>2+</sup> augmente fortement de façon locale. Il est largement décrit que dans les cellules en culture, les mitochondries forment des réseaux dynamiques où la fusion et la fission sont importantes. Cependant, dans des CML natives, les mitochondries sont plus immobiles et de forme ovoïde, leur dynamique étant beaucoup plus réduite mais avec une localisation subcellulaire précise<sup>249</sup>. C'est ainsi que l'on retrouve les mitochondries associées au RE/RS (notamment proche des RyR et IP<sub>3</sub>R), dans des microdomaines très proches (30 nm), facilitant les échanges calciques entre ces deux organites<sup>250</sup>. Ainsi, la localisation des mitochondries représente un élément stratégique pour les cellules afin de réguler les dynamiques calciques cellulaires.

Le Ca<sup>2+</sup> entre dans la mitochondrie par le VDAC (voltage-dependent anion channel) de la membrane externe mitochondriale. Une fois le Ca<sup>2+</sup> concentré dans l'espace intermembranaire, c'est l'uniport calcique mitochondrial (MCU) de la membrane interne qui prend le relais pour faciliter l'entrée de Ca<sup>2+</sup> vers la matrice. Cette mécanique n'est possible qu'au niveau de zones où les membranes externe et interne sont proches, créant des ponts avec le cytosol ou avec le RE/RS. Dans la matrice, le Ca<sup>2+</sup> se combine au phosphate ( $[PO_4^{3-}]_m = 5 \text{ mM}$ ) puis il est lentement exporté vers le cytosol par les transporteurs Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> ou H<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> (**Figure 25**)<sup>209-211</sup>.



**Figure 25** : Interaction entre  $\text{Ca}^{2+}$  du RE et mitochondrial. Le  $\text{Ca}^{2+}$  du RE/RS qui sort par des RyR ou R-IP<sub>3</sub> peut être tamponné par des mitochondries à proximité. Le  $\text{Ca}^{2+}$  rejoint la matrice mitochondriale par le VDAC et par l'uniport calcique mitochondrial (MCU). Il peut être extrudé plus lentement de la mitochondrie via des échangeurs ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  ou  $\text{H}^+/\text{Ca}^{2+}$ ). Le potentiel interne mitochondrial, très négatif, est maintenu grâce au gradient de protons généré par la chaîne respiratoire mitochondriale.

### 3. Le $\text{Ca}^{2+}$ des lysosomes

#### A. Les lysosomes dans l'homéostasie calcique

Les lysosomes sont des organites au pH acide. Impliqués entre autres dans la dégradation des protéines, les lysosomes apparaissent depuis quelques années comme des réserves calciques, pouvant à la fois libérer le  $\text{Ca}^{2+}$  dans le cytoplasme et le tamponner. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{lys}}$  est de l'ordre de 200 à 500  $\mu\text{M}$ .

Le  $\text{Ca}^{2+}$  des lysosomes peut être mobilisé grâce à un second messenger cellulaire : le nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)<sup>251</sup>. Ce dernier est considéré comme le messenger cellulaire calcique le plus puissant puisqu'une augmentation de sa concentration cytoplasmique de l'ordre du nM augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  de l'ordre du  $\mu\text{M}$ . Initialement découvert dans l'œuf d'oursin<sup>252</sup>, le NAADP est produit à partir de son précurseur le  $\text{NADP}^+$  par l'enzyme membranaire CD38<sup>253</sup>. Cette production par le CD38 nécessite un pH acide. Or, dans le cytoplasme, le pH est neutre (environ 7,2). Un microenvironnement plus acide,

autour du CD38, est donc nécessaire pour la production de NAADP. Certaines études montrent que la fixation d'un agoniste sur son récepteur entraîne la fusion d'endolysosomes avec des cavéoles, créant ce microenvironnement acide<sup>254</sup>. Dans les artères coronaires<sup>255</sup> et pulmonaires<sup>18, 256, 257</sup>, l'ET-1, un agoniste vasoconstricteur (en page 50), a la capacité d'induire une production de NAADP, notamment au niveau des cavéoles<sup>258</sup> (**Figure 26A**). La voie de signalisation de la production de NAADP par l'ET-1 dans l'artère pulmonaire est décrite en page 50.

Au niveau des lysosomes, la cible du NAADP est plutôt controversée dans la littérature. Néanmoins, depuis 2009, les canaux TPC (two-pore channels) émergent comme étant la cible moléculaire du NAADP<sup>259</sup>.

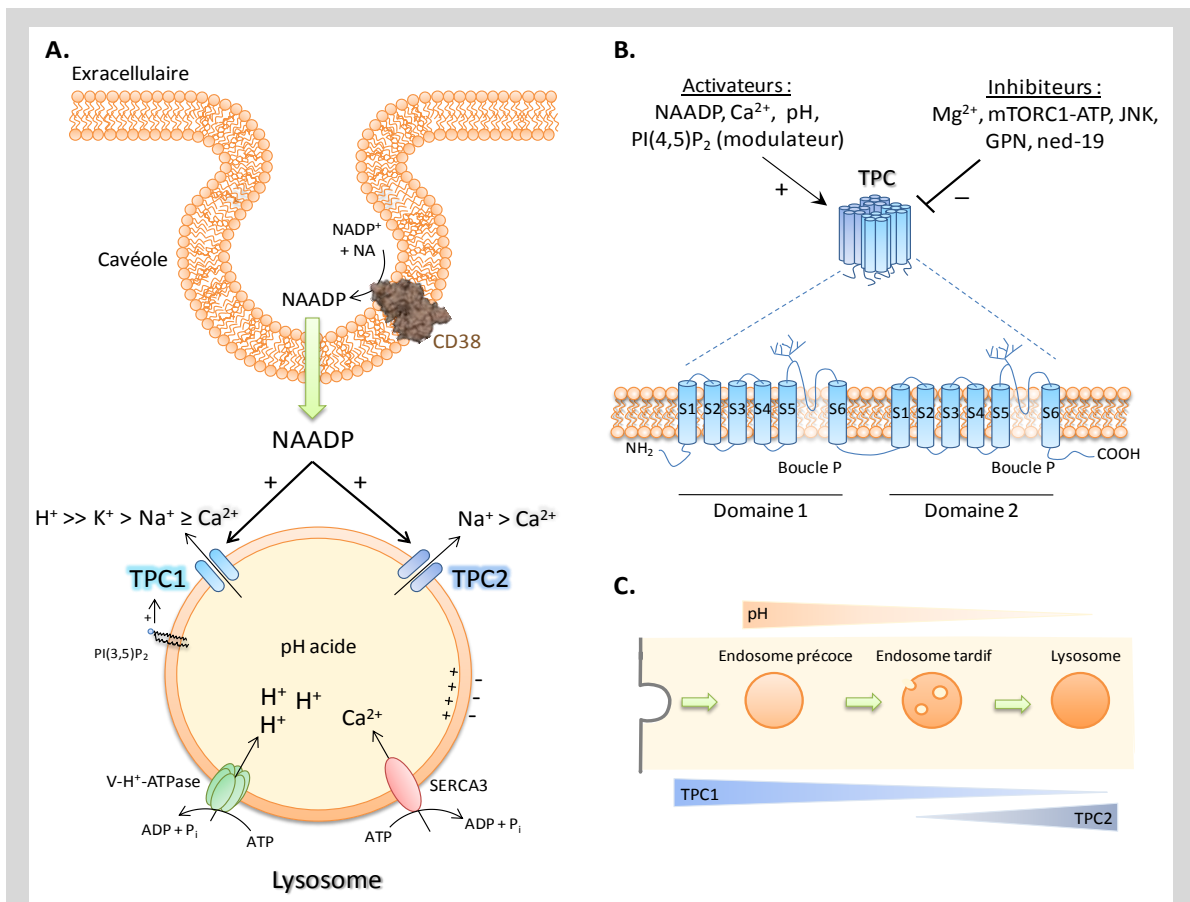
### B. Les two-pore channels (TPC)

Les TPC sont des canaux exclusivement exprimés dans les organites acides tels que les endosomes et les lysosomes. Ces canaux s'associent en dimères composés chacun de deux domaines à 6 segments transmembranaires et forment un pore fortement glycosylé pour mieux résister au milieu acide, laissant passer divers ions (**Figure 26B**). Il existe trois isoformes de TPC (TPC1, 2 et 3) mais seules les isoformes 1 et 2 sont présentes au niveau du génome humain et du génome de souris et de rats<sup>260</sup>. Les TPC1 et TPC2 présentent une distribution cellulaire différente. En effet, les TPC1 sont plutôt exprimés dans les endosomes précoces et les TPC2 dans les endosomes tardifs et les lysosomes<sup>259</sup> (**Figure 26C**). Les TPC sont des canaux non sélectifs qui laissent transiter de nombreux ions tels que des H<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup><sup>261, 262</sup>. Ainsi, le NAADP, en activant directement les TPC1, provoque une sortie de H<sup>+</sup>, puis de Na<sup>+</sup> et de Ca<sup>2+</sup><sup>261</sup>. Sur les TPC2, le NAADP induit une sortie de Na<sup>+</sup> et de Ca<sup>2+</sup>, faisant des TPC2 les canaux majoritaires impliqués dans la signalisation calcique induite par le NAADP<sup>261</sup>. Malgré une forte controverse actuelle dans la littérature, le PI(4,5)P<sub>2</sub> ne serait pas un agoniste direct des TPC mais potentialiserait la sortie de H<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup> lorsque les TPC sont activés par le NAADP<sup>261-263</sup>. Le courant H<sup>+</sup> interviendrait sur la régulation de l'activité des TPC par le pH lysosomal et le courant de Na<sup>+</sup> aurait un rôle dépolarisant. Ces deux courants masqueraient le courant Ca<sup>2+</sup>, plus faible, mais au rôle dans la signalisation très important<sup>263</sup>.

### C. Couplage calcique entre lysosomes et RE/RS

Si, au niveau des lysosomes, les canaux TPC2 semblent être impliqués dans la signalisation calcique induite par le NAADP, leur perméabilité au Ca<sup>2+</sup> n'est pas prépondérante<sup>261</sup>. Il est donc nécessaire d'avoir un mécanisme d'amplification du signal calcique suite à la stimulation au NAADP. Les lysosomes étant des organites petits et sphéroïdes (~600 nm de diamètre), leur rôle dans la signalisation et l'homéostasie calcique ne peut s'effectuer que grâce à une sublocalisation cellulaire précise. Ainsi, dans des CML natives, les lysosomes s'organisent dans une zone périnucléaire<sup>18</sup> où ils forment des nanojonctions de ~50 nm<sup>264, 265</sup> avec RE/RS et plus particulièrement avec les RyR<sup>18, 210, 265</sup>. Ainsi, le signal calcique issu des lysosomes peut être amplifié par une sortie de Ca<sup>2+</sup> du RE/RS

par un mécanisme de CICR ou par un couplage physique entre les TPC et les RyR (les deux hypothèses étant proposées).



**Figure 26** : **A.** Le NAADP est produit dans un compartiment acide (comme une cavéole) à partir de NADP<sup>+</sup> grâce au coenzyme membranaire, le CD38. Une fois dans la cellule, le NAADP peut activer les canaux TPC1 et TPC2 des compartiments endolysosomiaux au pH acide. Les TPC1 laissent transiter des ions H<sup>+</sup> >> K<sup>+</sup> > Na<sup>+</sup> ≥ Ca<sup>2+</sup> et les TPC2 des ions Na<sup>+</sup> > Ca<sup>2+</sup>. Le PI(4,5)P<sub>2</sub> n'a pas d'action directe sur les TPC mais augmente leur perméabilité. Les lysosomes sont rechargés en H<sup>+</sup> et en Ca<sup>2+</sup> par la pompe V-H<sup>+</sup>-ATPase et par les pompes SERCA3, respectivement. **B.** Structure d'un TPC dimérisé avec la liste des inhibiteurs et des activateurs de ces canaux. **C.** Les TPC1 sont plus exprimés dans les endosomes précoces alors que les TPC2 sont plus exprimés dans les lysosomes au pH plus acide.

#### D. La recharge des lysosomes en Ca<sup>2+</sup>

La recharge des lysosomes en Ca<sup>2+</sup> est assez peu connue. Certaines études montrent que les pompes SERCA3 seraient localisées préférentiellement au niveau des lysosomes dans les plaquettes<sup>266</sup>. La présence d'un échangeur Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> est également proposée<sup>263</sup> même si elle n'a pas été montrée dans les lysosomes. Le Ca<sup>2+</sup> peut également transiter directement des RyR ou des IP<sub>3</sub>R aux lysosomes par un système réverse. Au niveau des lysosomes, le pH



est régulé par la pompe V-H<sup>+</sup>-ATPase (vacuolar proton pump) faisant entrer des ions H<sup>+</sup> dans la lumière lysosomale. Cette entrée de charges positives est généralement contrebalancée par une entrée de Cl<sup>-</sup> par des canaux CLC5 et 7, tout en maintenant un potentiel de la membrane interne positif (+20 mV)<sup>267</sup>.

#### E. Les inhibiteurs des TPC

Le Mg<sup>2+</sup> et des phosphatases (mTORC1, JNK, P<sub>38</sub>) inhibent les TPC<sup>267</sup>. Des inhibiteurs exogènes ont également été développés : le ned-19, un composé à la structure similaire au NAADP, inhibe les TPC en s'y fixant de façon allostérique<sup>268, 269</sup>. Il est également possible d'inhiber indirectement le flux calcique par les TPC en détruisant les lysosomes, grâce au glycyphenylalanine 2-naphthylamide (GPN à 100 µM)<sup>270</sup> ou à la bafilomycine A1 qui détruit le gradient de protons et engendre une vidange calcique des lysosomes.

### 4. Les réserves calciques dans les CML d'AIP

Les CML d'AIP ont une organisation subcellulaire des réserves calciques et des protéines impliquées dans les échanges calciques bien spécifique<sup>18, 240, 257, 271-273</sup>. Cette organisation qui sous-tend différentes voies de signalisation sera détaillée dans la partie résultats de la thèse. Chez le rat, on retrouve la présence des trois isoformes de RyR<sup>208, 271, 272</sup>. La présence des IP<sub>3</sub>R n'a pas été montrée au niveau protéique dans les CML d'AIP cependant la présence des IP<sub>3</sub>R1 et IP<sub>3</sub>R3 a été observée en immunofluorescence<sup>274</sup>. Les pompes SERCA2a et SERCA2b sont exprimées dans les AIP de rat alors que les SERCA1 ne le sont pas<sup>240</sup>. La présence des SERCA3 reste controversée : elles sont exprimées dans les CE d'AIP humaines<sup>237</sup>, ainsi que dans les AIP de rat au niveau de l'ARNm mais absentes au niveau protéique<sup>240</sup>. Les canaux TPC1 et TPC2 sont également exprimés dans les AIP de rat<sup>257</sup>.

### 5. Les agonistes vasoconstricteurs

#### A. La sérotonine ou 5-HT

La sérotonine ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est un puissant agoniste vasoconstricteur. Elle est produite par les terminaisons nerveuses et les cellules entérochromaffines de la paroi intestinale et se retrouve ensuite stockée dans la circulation sanguine au niveau des plaquettes. Une faible quantité de 5-HT se retrouve libérée au niveau de la circulation pulmonaire. A ce niveau, la 5-HT agit au niveau des CML sur ses récepteurs 5-HT<sub>2A</sub> et 5-HT<sub>1B/D</sub><sup>275</sup>. L'activation de ces récepteurs couplés aux protéines G induit une augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en deux phases : d'abord une phase transitoire due à la libération du Ca<sup>2+</sup> depuis le réticulum endoplasmique (voie de l'IP<sub>3</sub>) puis une phase soutenue qui fait intervenir un influx de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire (CCDV de type L chez l'homme<sup>276</sup> et canaux TRPV4 via l'acide arachidonique chez le rat<sup>277, 278</sup>).



## B. L'endothéline-1, un agoniste au centre des échanges calciques

L'endothéline-1 (ET-1) est une hormone vasoconstrictrice. Elle est majoritairement produite par les cellules endothéliales où la Big-ET-1 est convertie en ET-1 grâce à l'enzyme de conversion de l'ET-1 (ECE)<sup>279</sup>. Sa sécrétion par la CE s'effectue en réponse à différents stimuli tels que l'étirement<sup>153, 280-283</sup> ou l'hypoxie<sup>284</sup>. Comme le temps de production de l'ET-1 est plus lent que sa vitesse de sécrétion, il existerait des réserves sous-membranaires d'ET-1 qui serait rapidement sécrétée après un étirement<sup>282</sup>. L'ET-1 se fixe sur deux types de récepteurs : les R-ET<sub>A</sub> et R-ET<sub>B</sub><sup>279</sup>. Les R-ET<sub>B</sub> sont majoritairement exprimés sur les CE alors que les CML expriment les R-ET<sub>A</sub> et les R-ET<sub>B</sub><sup>279, 285-287</sup>.

### a) Effet de l'ET-1 sur les cellules musculaires lisses

Au niveau des CML d'AIP de rats normaux, l'ET-1 induit une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  en se fixant à la fois sur les deux récepteurs<sup>288</sup> même si l'ET-1 agit majoritairement *via* les R-ET<sub>B</sub><sup>70, 288-290</sup>. De récentes études montrent que dans l'AIP, l'ET-1 induit une production de NAADP intracellulaire par le CD38<sup>14, 256, 257</sup>. Bien que le mécanisme n'ait pas été décrit dans l'AIP, plusieurs études montrent que les cavéoles sont nécessaires à la production de NAADP en réponse à l'ET-1, notamment par le récepteur R-ET<sub>B</sub><sup>258, 291-293</sup>. Cette production de NAADP en réponse à l'ET-1 n'est pas un mécanisme exclusif à l'AIP puisqu'elle a aussi été montrée dans d'autres lits vasculaires<sup>255, 258, 294</sup>. Le NAADP augmente ensuite la  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>256</sup> *via* l'activation de canaux TPC des lysosomes<sup>261</sup> situés en périnucléaire<sup>18</sup>. Puis, par un mécanisme de CICR, le  $Ca^{2+}$  des lysosomes active des RyR3 situés en périnucléaire, afin d'amplifier le signal calcique<sup>210, 240, 274, 295</sup>. Certaines études suggèrent également l'implication des IP<sub>3</sub>R dans la réponse calcique à l'ET-1<sup>257, 274, 296</sup> probablement *via* une activation mutuelle entre les RyR et les IP<sub>3</sub>R<sup>274</sup>. Etant donné que les RyR et les IP<sub>3</sub>R présentent une auto-régulation par le  $Ca^{2+}$ , l'ET-1 provoque des oscillations de la  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>289</sup>. De plus, chez les rats normaux, la réponse à l'ET-1 ne fait pas intervenir le  $Ca^{2+}$  du milieu extracellulaire<sup>289, 297</sup>.

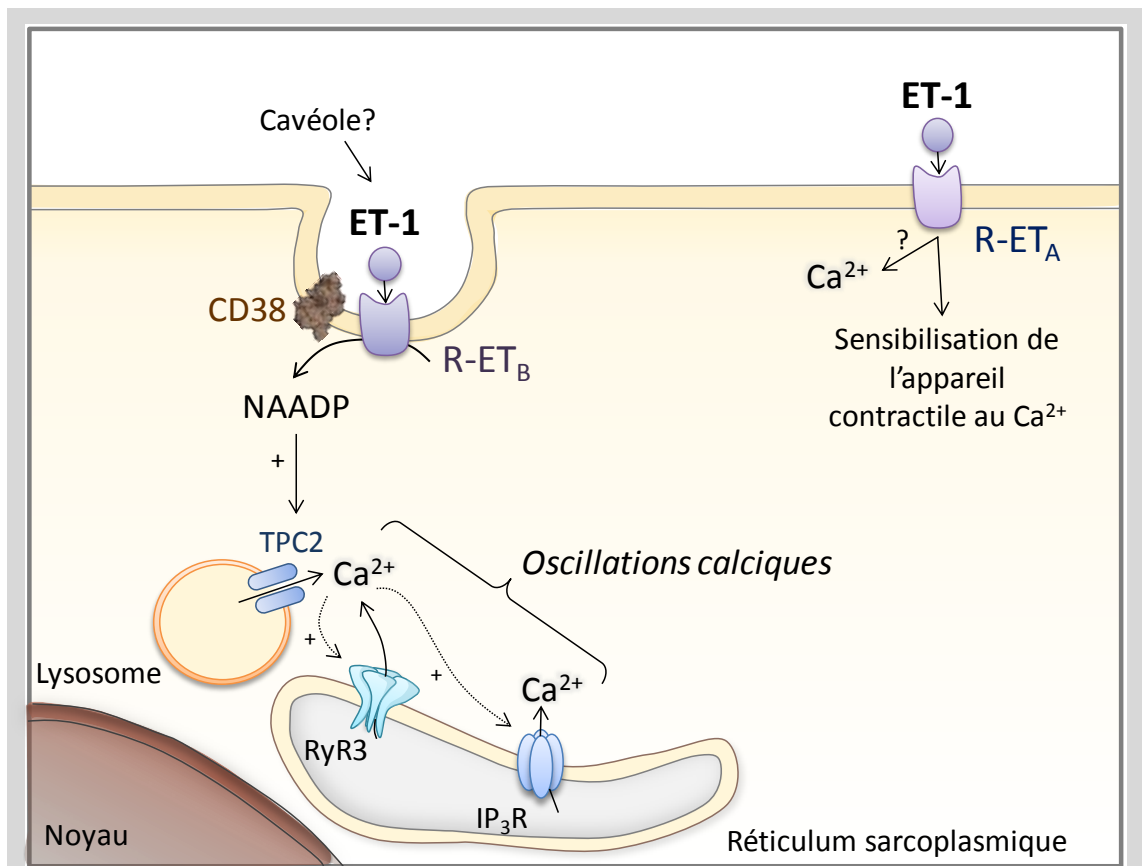
Par ailleurs, Il est important de noter que la majorité des études suggérant une production directe d'IP<sub>3</sub> en réponse à l'ET-1 le font *via* l'inhibiteur supposé de la PLC : le U-73122. Or, le U-73122 a été décrit comme très largement non sélectif puisqu'il inhibe également les CCDV<sup>298</sup>, inhibe les pompes SERCA, active les RyR<sup>299</sup> et serait même un activateur de la PLC<sup>300</sup>, rendant la production directe d'IP<sub>3</sub> par l'ET-1 très incertaine.

Enfin, dans une moindre mesure, l'ET-1 se fixe également sur ses récepteurs R-ET<sub>A</sub> des CML, induisant une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$ <sup>289</sup> ainsi qu'une sensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$ <sup>301</sup> (**Figure 27**).

### b) Effet de l'endothéline-1 sur les cellules endothéliales

Au niveau des CE, l'ET-1 active de façon autocrine les R-ET<sub>B</sub> qui sont impliqués dans la vasodilatation grâce à une production de NO et de PG(I<sub>2</sub>)<sup>302-304</sup>. L'importance de cette

vasodilatation induite par l'ET-1 via les R-ET<sub>B</sub> montre toute son importance chez des rats KO pour les R-ET<sub>B</sub> qui présentent une hypertension pulmonaire<sup>305</sup>.



**Figure 27 :** Voie de signalisation calcique de l'ET-1. **A.** Chez les rats normaux, l'ET-1 en se fixant sur ses récepteurs R-ET<sub>B</sub> augmente le Ca<sup>2+</sup> par une voie faisant intervenir le NAADP, les canaux TPC des lysosomes et les RyR3 situés en périnucléaire. En agissant sur les R-ET<sub>A</sub>, l'ET-1 sensibilise également l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup>.

## 6. Conclusion

Nous l'avons vu dans cette première partie, en conditions physiologiques, l'organisation intracellulaire des CML d'AIP est telle qu'elle leur permet d'avoir des réponses calciques adaptées aux différents stimuli, qu'ils soient mécaniques comme un étirement ou hormonaux comme l'endothéline-1. Ceci permet aux AIP d'adapter le tonus basal en conséquence. Mais qu'en est-il dans une condition pathologique telle que l'hypertension pulmonaire où l'équilibre est rompu vers une plus forte contraction ?

## L'hypertension pulmonaire

Dans les conditions physiologiques, la circulation pulmonaire est un système à basse pression et à faible résistance. La pression artérielle pulmonaire moyenne (PAP<sub>m</sub>) est de l'ordre de 14 mmHg au repos chez l'homme. Ces caractéristiques de la circulation pulmonaire permettent d'obtenir un apport constant de sang aux alvéoles pulmonaires pour assurer sa bonne réoxygénation. Cependant, dans des conditions physiopathologiques, telles que l'hypertension pulmonaire, une augmentation maintenue des résistances périphériques vasculaires conduit à une élévation de la PAP<sub>m</sub> au-delà de 25 mmHg au repos. Chez certains patients, cette pression peut s'élever jusqu'à sept fois la valeur basale, soit plus de 90 mmHg au repos<sup>306, 307</sup>. Dans de telles conditions, et pour maintenir une réoxygénation du sang correcte, le cœur augmente son travail afin de pallier à la résistance à l'écoulement des artères périphériques. Néanmoins, cette contrainte exercée sur le cœur conduit à une hypertrophie du ventricule droit puis à une insuffisance cardiaque et à la mort des patients<sup>204</sup>. La prévalence de l'hypertension pulmonaire en France est de 15 cas par million d'adultes avec 2,4 nouveaux cas par million d'adultes par an<sup>308</sup>. Même si les traitements actuels améliorent la survie des patients, environ 10% décèdent chaque année<sup>309</sup> et les mécanismes physiopathologiques et intracellulaires impliqués dans la maladie restent encore mal connus.

### 1. Classification des hypertensions pulmonaires

Il existe plusieurs types d'hypertensions pulmonaires, classés en 5 grands groupes par l'Organisation Mondiale de la Santé (**Tableau 1**) : hypertension artérielle pulmonaire (groupe 1), hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche (groupe 2), hypertension pulmonaire due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique (groupe 3), hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (groupe 4) et les hypertensions pulmonaires ayant des mécanismes multifactoriels incertains (groupe 5). Les hypertensions pulmonaires les plus courantes sont celles associées à une maladie du cœur (groupe 2) ou à une maladie respiratoire chronique (groupe 3)<sup>310</sup>.

Dans cette classification, on distingue le terme de « Hypertension Pulmonaire » (**HTP**) qui regroupe toutes les hypertensions pulmonaires et le terme de « Hypertension Artérielle Pulmonaire » (**HTAP**) qui regroupe uniquement celles du groupe 1.

#### 1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)

- 1.1. Idiopathique
- 1.2. Héritable
  - 1.2.1. Gène BMPR2
  - 1.2.2. Gènes ALK1, ENG, SMAD9, CAV1, KCNK3
  - 1.2.3. Gène inconnu

1.3. Induite par des toxines ou des médicaments

1.4. Associée à :

1.4.1. Une maladie du tissu conjonctif

1.4.2. Une infection par le VIH

1.4.3. Une hypertension portale

1.4.4. Une cardiopathie congénitale

1.4.5. Une schistosomiase

## **1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire**

### **1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né**

## **2. Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche**

2.1. Dysfonction systolique du ventricule gauche

2.2. Dysfonction diastolique du ventricule gauche

2.3. Maladies valvulaires

2.4. Obstructions congénitales ou acquises au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathies congénitales

## **3. Hypertension pulmonaire (HTP) due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique**

3.1. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO)

3.2. Maladie pulmonaire interstitielle

3.3. Autres maladies respiratoires avec un profil restrictif et obstructif mixte

3.4. Troubles d'apnée du sommeil

3.5. Hypoventilation alvéolaire

3.6. Exposition chronique aux hautes altitudes

3.7. Anomalies du développement pulmonaire

## **4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique**

## **5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains**

5.1. Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie

5.2. Troubles systémiques : sarcoïdose, lymphangioléiomyomatose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaires

5.3. Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies

5.4. Divers : obstruction pulmonaire tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire

BMPR = bone morphogenic protein receptor type II ; CAV1 = cavéoline-1; ENG = endogline ;  
VIH = virus de l'immunodéficience humaine.

**Tableau 1** : Classification des Hypertensions Pulmonaires de Dana Point de 2008, modifiée en 2013 à Nice<sup>310</sup>.

## A. L'hypertension artérielle pulmonaire du groupe 1

### a) HTAP héritable associée à une mutation génique

80% des HTAP héritables sont associées à une mutation du gène BMPR2 et 5% une mutation du gène ALK<sub>1</sub> ou ENG. Ces trois protéines appartiennent à la famille du facteur de croissance tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Récemment, d'autres gènes ont été identifiés comme associés à l'HTAP tels que CAV1, le gène qui code pour la cavéoline-1 et KCNK3 qui code pour un canal potassique. L'implication du gène CAV1 dans l'HTP sera détaillée en page 69. Ces mutations prédisposent au développement d'une HTAP. De plus, approximativement 20% des HTAP héritables n'ont pas de mutation connue<sup>310-312</sup>.

### b) HTAP associées à une drogue ou à une toxine

De nombreuses toxines et médicaments ont été identifiés comme étant liés au développement d'une HTAP. La plupart sont des anorexigènes, tels que l'aminorex, la fenfluramine, le benfluorex et la dexfenfluramine. D'autres sont liés au métabolisme de la sérotonine tels que les inhibiteurs sélectifs de sa recapture. Parmi les toxines reliées à l'HTAP on retrouve aussi l'huile de colza. D'autres médicaments et toxines ont été rapportés comme impliqués dans le développement de l'HTAP mais dans de plus rares cas : les amphétamines (même famille chimique que les anorexigènes), les méthamphétamines, le L-tryptophane et le dasatinib (un médicament anti-cancéreux)<sup>310</sup>.

Enfin, des toxines et médicaments sont répertoriés comme possiblement impliqués dans le développement d'une HTAP, de par leurs mécanismes d'action similaires à ceux de molécules déjà reconnues : la cocaïne, la phénylpropanolamine (un médicament anti-rhume dont l'utilisation a été dérivée en anorexigène), le millepertuis, des agents de chimiothérapie, l'interféron  $\alpha$  et  $\beta$ , ainsi que des dérivés d'amphétamines<sup>310</sup>.

## B. L'hypertension pulmonaire du groupe 3 due à une hypoxémie

La majeure partie des HTP appartiennent à celles du groupe 3. Les mécanismes impliqués sont soit une hypoxie alvéolaire, conséquence d'un apport insuffisant en O<sub>2</sub>, soit une vasoconstriction hypoxique, mécanisme réflexe dans les maladies respiratoires chroniques obstructives ou restrictives telles que la BPCO. La majorité des HTP de groupe 3 sont modérées (PAPm < 35 mmHg) même si l'on constate la présence d'HTP sévères (PAPm > 35 mmHg) chez ~3 à 5% des patients BPCO<sup>310, 313</sup>. La prise en charge de ce type d'HTP consiste à traiter la maladie sous-jacente. L'utilisation des traitements classiques de l'HTP dans le cas de la BPCO est inefficace voire aggravant. En effet, la difficulté consiste à traiter l'HTP sans empêcher la vasoconstriction hypoxique induite par la BPCO, sans quoi le rapport ventilation/perfusion au niveau des alvéoles pulmonaires s'en trouverait altéré<sup>313</sup>.

## **2. Le diagnostic de l'HTP, un processus à plusieurs étapes**

Le diagnostic de l'HTP est le plus souvent tardif. Lorsqu'une HTP est soupçonnée (dyspnée non expliquée, épisodes de syncope, signes d'insuffisance cardiaque droite), le premier examen consiste à réaliser une échocardiographie. Elle permet d'estimer la PAP systolique en fonction du flux de l'insuffisance tricuspidiennne et de l'état volémique estimé par la mesure de la veine cave inférieure. Si le diagnostic de l'HTP est retenu, après consultation de la classification pour en déterminer la cause, le second examen consiste à réaliser une scintigraphie pulmonaire afin de diagnostiquer une HTP post-embolique (groupe 4). Si la scintigraphie pulmonaire est normale, l'étape suivante consiste à réaliser un examen plus invasif : le cathétérisme cardiaque droit qui permet de mesurer directement la PAP<sup>314</sup>. Ainsi, c'est le cathétérisme cardiaque droit qui permet d'affirmer la présence d'une l'HTP lorsque la PAPm est  $\geq 25$  mmHg<sup>314</sup>.

## **3. Les altérations du ventricule cardiaque droit dans l'HTP**

Suite à l'augmentation de pression dans l'AIP, la postcharge du ventricule cardiaque droit augmente, ce qui induit son hypertrophie. En effet, afin de maintenir un débit cardiaque constant et de compenser la postcharge, le cœur va augmenter sa force de contraction en s'hypertrophiant. Toutefois, l'hypertrophie du ventricule droit n'est que rarement complètement compensatoire, elle devient inadaptée et conduit à une insuffisance cardiaque droite. Une fois que cette insuffisance s'installe, le taux de mortalité des patients atteint d'HTP devient  $\geq$  à 40%, ce qui nécessite un suivi médical très important<sup>315</sup>.

Sur le plan clinique, l'insuffisance cardiaque reflète l'incapacité du ventricule droit de perfuser le poumon de sorte à maintenir le remplissage du ventricule gauche à une faible pression par la veine pulmonaire. L'insuffisance cardiaque se caractérise par une réduction du débit cardiaque ( $<2,5$  L/min) et une augmentation de la pression de remplissage du ventricule gauche ( $P^\circ$  oreillette droite  $\geq 8$  mmHg). De plus, du fait de l'hypertrophie du ventricule droit, celui-ci exerce une compression sur le ventricule gauche dont la taille diminue (interdépendance ventriculaire). On constate également une diminution de la perfusion du ventricule droit due à une ischémie au niveau des artères coronaires<sup>315</sup>.

Une étude récente montre que la transition entre une hypertrophie ventriculaire droite compensatoire et décompensatoire (inadaptée) se traduit par une diminution de la captation de glucose dans les myocytes cardiaques. Ce changement du métabolisme énergétique augmente la production de ROS mitochondriales qui inhibent le gène HIF1 $\alpha$ . Or, HIF1 $\alpha$  intervient dans l'activation du VEGF qui est important pour l'angiogenèse et la formation de néo vaisseaux permettant d'irriguer le cœur<sup>316</sup>. Cette diminution de l'angiogenèse et des artères coronaires droites conduit à une ischémie du ventricule droit hypertrophié. Ce dernier passe alors en insuffisance cardiaque<sup>315, 317</sup>.

Lors de l'insuffisance cardiaque droite, la fonction cardiaque droite va diminuer. Ceci se traduit par une diminution du volume d'éjection systolique et une diminution de la pression dans l'artère pulmonaire. Cependant, cette diminution de pression dans l'AIP n'est pas du tout favorable car elle diminue alors la quantité de sang qui arrive aux alvéoles et donc diminue l'oxygénation du sang. Cette conséquence a un impact majeur sur la qualité de vie des patients, avec une sensation d'essoufflement et une forte difficulté à produire des efforts. À terme, lorsque l'insuffisance cardiaque est trop importante, elle conduit à la mort des patients<sup>315</sup>.

#### 4. Les modèles animaux d'HTP

De nombreux modèles animaux d'HTP ont été développés afin de pouvoir plus facilement comprendre les mécanismes physiopathologiques impliqués dans la mise en place de la pathologie et de pouvoir tester des traitements potentiels. Cependant, ces modèles sont souvent incomplets et ne reflètent pas toute la complexité que l'on retrouve dans l'HTP sévère chez l'homme, ils sont plutôt le reflet d'HTP modérées. De plus, il faut toujours rester prudent quant à l'extrapolation des résultats entre animaux et humains.

##### A. HTP induite par la monocrotaline

La monocrotaline est un alcaloïde pyrrolizidine provenant d'une plante subtropicale, la *Crotalaria spectabilis*. En 1967, un cas d'HTP fut rapporté chez une femme ayant ingéré une grande quantité des graines de cette plante<sup>318</sup>. A la suite de ce cas, les scientifiques ont développé des modèles de rats faisant de l'HTP après une mono-injection de 60 mg/kg de monocrotaline (**MCT**)<sup>319</sup>. Chez le rat, la MCT est métabolisée par les cytochromes-P450 du foie en MCT pyrrole. La MCT pyrrole induit alors une dysfonction endothéliale dans la circulation pulmonaire. Cette dysfonction se caractérise par une hyperplasie de l'endothélium, une hypertrophie de la média et une augmentation de l'inflammation. Cependant, ce modèle ne présente pas de lésions plexiformes (en page 60) comme on l'observe dans l'HTP humaine. Ce remodelage qui se met en place suite à l'injection de MCT contribue à réduire le diamètre des petits vaisseaux, à augmenter les résistances périphériques à l'écoulement ainsi qu'à augmenter la PAP<sub>m</sub><sup>320, 321</sup>. Après 3 semaines, une hypertrophie compensatoire du ventricule cardiaque droit apparaît, suivie d'une insuffisance cardiaque après 3 à 5 semaines suivant l'injection de MCT<sup>322</sup>. Du fait des caractéristiques hémodynamiques et du remodelage observés chez ces rats, l'HTP développée s'apparente aux HTAP humaines du groupe 1 de la classification<sup>323</sup>.

##### B. HTP induite par une hypoxie chronique

Des modèles animaux d'HTP ont été développés après une exposition à une hypoxie chronique (**HC**) de 3 semaines minimum chez la souris et le rat. Ce modèle correspond aux HTP humaines du groupe 3 de la classification. En laboratoire, des caissons hypobares sont

utilisés pour simuler une altitude de 5500 m avec une pression atmosphérique de 380 mm Hg (contre 760 mmHg au niveau de la mer). La mise en place de l'HTP dans ce modèle fait suite à une vasoconstriction hypoxique prolongée des AIP. À terme, ceci conduit à une muscularisation des petites AIP, à une hypertrophie de la média et à une dysfonction endothéliale (en page 59). Après 3 semaines, on constate une augmentation significative de la PAPm ainsi qu'une hypertrophie compensatoire du ventricule cardiaque droit. Toutefois, aucune thrombose ni lésion plexiforme ne sont retrouvées dans ce modèle<sup>320, 321</sup>. La particularité de ce modèle est que l'HTP est réversible au bout de 3 semaines lorsque les animaux sortent des caissons hypobares.

### C. Autres modèles animaux

Il existe d'autres modèles animaux d'HTP, moins utilisés. Les rats Fawn-hooded (FHR) développent une HTP spontanément à basse altitude<sup>323</sup>. Un autre modèle de rats mimant les HTP dues à des malformations cardiaques a été mis en place par un rétrécissement du diamètre de l'artère pulmonaire par chirurgie. L'augmentation de la postcharge du ventricule cardiaque droit conduit à une sténose de l'AIP et à une hypertrophie du ventricule droit<sup>323</sup>.

Ces modèles ayant parfois quelques limites, les modèles simples peuvent être combinés afin de mettre en place une HTP plus sévère. Au laboratoire, le modèle combiné de MCT et HC a été développé. Ce modèle présente une HTP plus sévère avec notamment la présence de lésions plexiformes<sup>320</sup>. Un autre modèle combiné est celui de l'HC avec une monoinjection de SUGEN 5416 (20 mg/kg) qui est un antagoniste du récepteur au VEGF. Ce modèle développe également une HTP sévère accompagnée de lésions plexiformes<sup>323</sup>.

## 5. Le paradoxe des hormones dans l'HTP

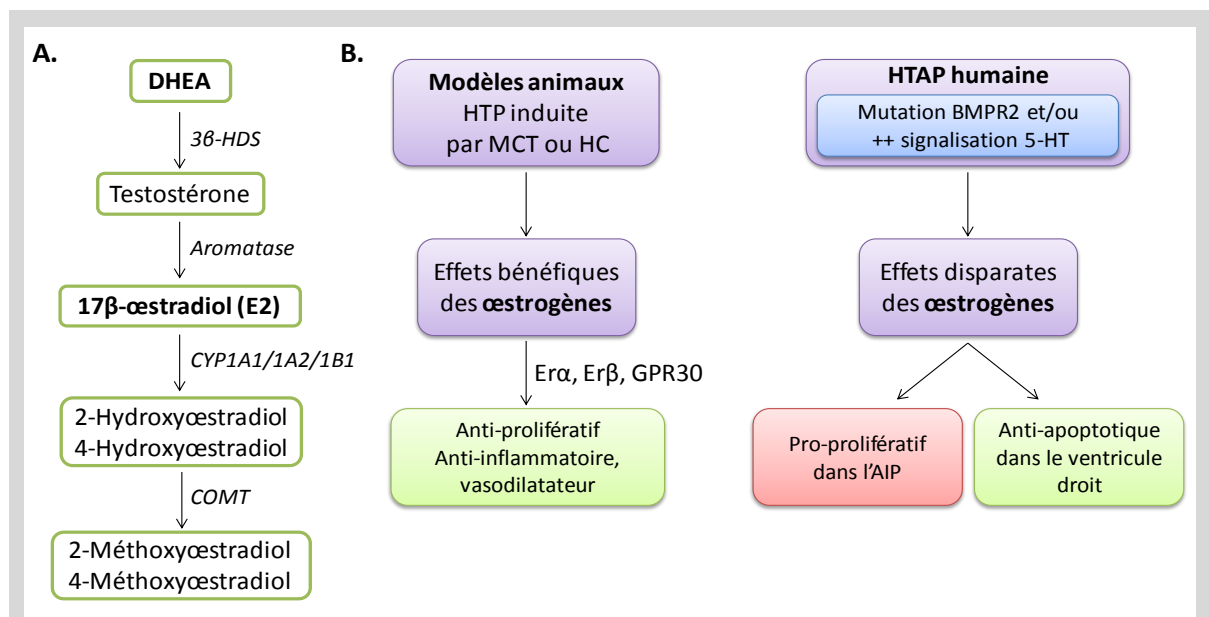
Chez l'humain, la prévalence de l'HTP est plus importante chez les femmes que chez les hommes (1,9 femmes pour 1 homme en France). Malgré cela, les femmes survivent mieux à l'HTP, notamment grâce à un profil hémodynamique plus favorable (PAPm plus faible) et une meilleure fonction du ventricule cardiaque droit<sup>324</sup>. Le paradoxe vient du fait que seuls les modèles animaux mâles développent une HTP, les femelles en sont protégées. Cette protection leur est conférée par les hormones sexuelles et plus particulièrement les œstrogènes. Ceci est corroboré par le fait que chez les femelles rats ovariectomisées, l'injection de MCT ou un séjour en HC induit le développement d'une HTP, même plus sévère que chez les mâles. Cette HTP n'apparaît pas chez les femelles ovariectomisées supplémentées en 17 $\beta$ -œstradiol (E2). De plus, chez les mâles, l'administration d'E2 ou de son précurseur, la DHEA (déhydroépiandrostérone - **Figure 28A**) réduit le développement de l'HTP<sup>325</sup>.

L'AIP a la capacité d'élaborer des œstrogènes à partir de la testostérone car elle contient l'enzyme aromatase<sup>326</sup> (**Figure 28A**). Les œstrogènes agissent sur les CML et sur les



CE via des récepteurs à la fois membranaires et nucléaires (ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) mais aussi via un récepteur couplé aux protéines G (GPR30). Ainsi, chez les modèles de rats MCT et HC, les œstrogènes sont protecteurs vis-à-vis du développement de l'HTP grâce à un effet sur les AIP anti-prolifératif, anti-inflammatoire et vasodilatateur<sup>326, 327</sup> (**Figure 28B**). **Un article en annexe de ma thèse présente l'effet inhibiteur de la DHEA sur les CCDV de type T dans les CML d'AIP.**

Cependant, en dépit des effets bénéfiques qu'apportent les œstrogènes sur les modèles animaux, dans un contexte génétique différent (mutation de BMPR2) et/ou une augmentation de la voie de la 5-HT, les œstrogènes deviennent néfastes, comme c'est le cas chez l'humain. Dans les HTAP hérissables avec une mutation du gène BMPR2, on constate une diminution de l'expression du CYP1B1 qui est responsable de la transformation de l'E2 en 4-hydroxyœstradiol (**Figure 28A**). De ce fait, ces formes d'HTAP ont un taux d'E2 plus important. Les œstrogènes vont avoir un effet pro-prolifératif sur les AIP qui conduit à augmenter le remodelage des AIP et à en altérer les fonctions hémodynamiques. Cependant, les E2 auraient également un effet bénéfique au niveau cardiaque en ayant un impact anti-apoptotique sur le ventricule droit, ce qui augmente sa fonction. Ceci permettrait d'expliquer que les femmes développent plus d'HTAP que les hommes mais ont des altérations de la fonction cardiaque moins importantes<sup>326, 327</sup> (**Figure 28B**).



**Figure 28** : Le paradoxe des œstrogènes dans l'HTP. **A.** Voie de synthèse du 17 $\beta$ -œstradiol à partir de la déhydroépiandrostérone (DHEA). 3 $\beta$ -HDS : 3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase ; CYP1A1 : cytochrome *P*-450, famille 19, sous-famille A, gène du polypeptide 1 ; COMT : catéchol-*O*-méthyltransférase. **B.** Explication probable du paradoxe des œstrogènes via leurs effets bénéfiques sur les modèles animaux et à la fois bénéfiques et délétères chez l'humain, notamment chez les femmes. HC : hypoxie chronique ; MCT monocrotaline ; HTP : hypertension pulmonaire ; HTAP : hypertension artérielle pulmonaire ; ER : récepteur aux œstrogènes, GPR30 : récepteur couplé aux protéines G.

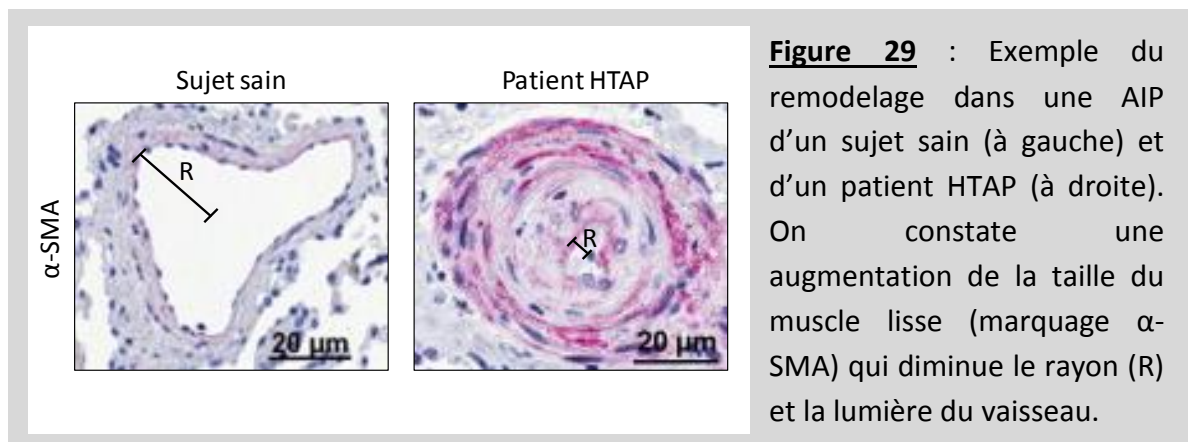
## 6. Les caractéristiques de l'HTP

### A. Les caractéristiques hémodynamiques

La PAP dépend du débit cardiaque ( $Q_c$ ) et des résistances vasculaires périphériques (RVP) :  $PAP = Q_c \times RVP$ . Les résistances vasculaires périphériques sont inversement proportionnelles au rayon du vaisseau. De ce fait, une petite diminution du rayon interne d'une artère peut avoir un impact majeur sur les résistances et donc sur la PAP. L'HTP se caractérise par une PAPm  $\geq 25$  mmHg, une pression capillaire pulmonaire  $\leq 15$  mmHg et une RVP  $> 3$  unités Wood lors du cathétérisme cardiaque droit<sup>314</sup>.

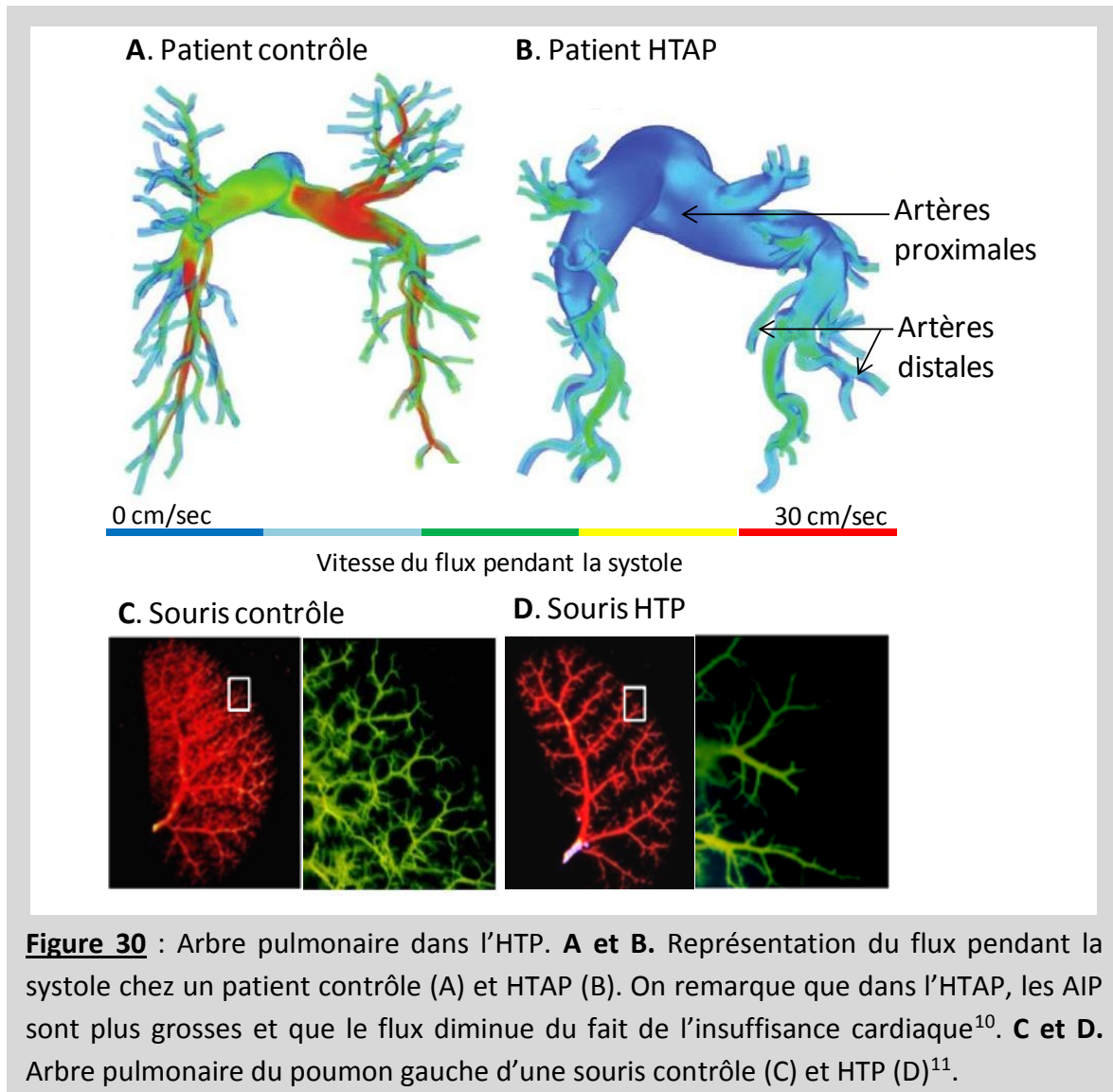
### B. Le remodelage des AIP dans l'HTP

Ainsi, lors de l'HTP, le diamètre interne des vaisseaux est réduit et plus particulièrement au niveau des petites AIP ( $< 500 \mu\text{m}$ ) (**Figure 29**). Différents mécanismes sont à l'origine de cette réduction du diamètre des vaisseaux : (a) une dysfonction endothéliale qui se caractérise à la fois par un défaut de vasodilatation et une réduction de la lumière du vaisseau par une prolifération excessive des CE ; (b) une muscularisation des petites AIP ; (c) une réactivité des AIP plus importante aux agents vasoconstricteurs.



**Figure 29** : Exemple du remodelage dans une AIP d'un sujet sain (à gauche) et d'un patient HTAP (à droite). On constate une augmentation de la taille du muscle lisse (marquage  $\alpha$ -SMA) qui diminue le rayon (R) et la lumière du vaisseau.

La **Figure 30A** montre un exemple du remodelage de l'AIP chez un patient HTAP. On constate que l'artère pulmonaire est plus grosse, à la fois au niveau des artères proximales et distales et qu'il y a moins d'artères distales. La **Figure 30B** montre l'arbre pulmonaire d'un poumon gauche chez un modèle de souris HTP. On constate qu'il y a moins de petites AIP du fait de la non pénétration du produit de contraste à cause de la vasoconstriction et du remodelage des petites AIP pré-capillaires.



**Figure 30** : Arbre pulmonaire dans l'HTP. **A et B.** Représentation du flux pendant la systole chez un patient contrôle (A) et HTAP (B). On remarque que dans l'HTAP, les AIP sont plus grosses et que le flux diminue du fait de l'insuffisance cardiaque<sup>10</sup>. **C et D.** Arbre pulmonaire du poumon gauche d'une souris contrôle (C) et HTP (D)<sup>11</sup>.

### C. La dysfonction endothéliale

Avec l'avancement de la pathologie, plusieurs lésions de l'endothélium apparaissent (plexiformes, néointima) et contribuent à réduire le diamètre interne des vaisseaux.

#### a) Les lésions endothéliales

Dans les stades précoces de la maladie, l'endothélium se retrouve lésé, comme abrasé. Lors de lésions directes, on a une augmentation de la production de vWF dont le taux sérique est augmenté chez les patients HTP, pouvant conduire à une augmentation de la résistance des vaisseaux par la formation de thrombus.

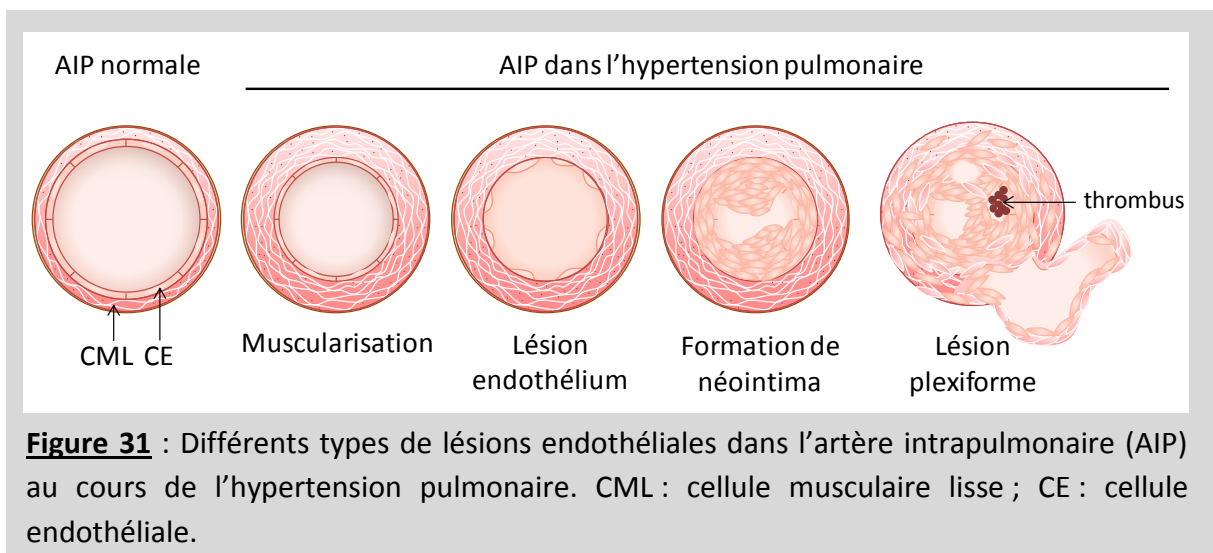
#### b) Les lésions plexiformes

Les lésions plexiformes sont des lésions complexes et désorganisées qui consistent en un plexus de petits canaux bordés de cellules endothéliales et de myofibroblastes, au centre

ou en continuité d'une AIP dilatée. Au niveau de ces lésions, on peut parfois observer un thrombus. Ces lésions plexiformes présentent une infiltration de cellules inflammatoires (monocytes, macrophages, lymphocytes T et B, cellules dendritiques). L'inflammation joue donc un rôle important dans le développement de l'HTP et notamment dans la dysfonction endothéliale<sup>328</sup>. On constate également une surprolifération des CE aboutissant à une fibrose concentrique de cellules qui tend à réduire la lumière des AIP<sup>321</sup>. Des travaux montrent également que les lésions plexiformes proviendraient de CE monoclonales résistantes à l'apoptose<sup>329</sup> (**Figure 31**).

### c) La néointima

La néointima consiste en couche de myofibroblastes et de matrice extracellulaire entre l'endothélium et la limitante élastique interne. Les mécanismes impliqués dans la migration de fibroblastes de l'adventice au travers des CML jusque sous l'endothélium sont encore peu connus<sup>330</sup> (**Figure 31**).



### d) La dysfonction endothéliale

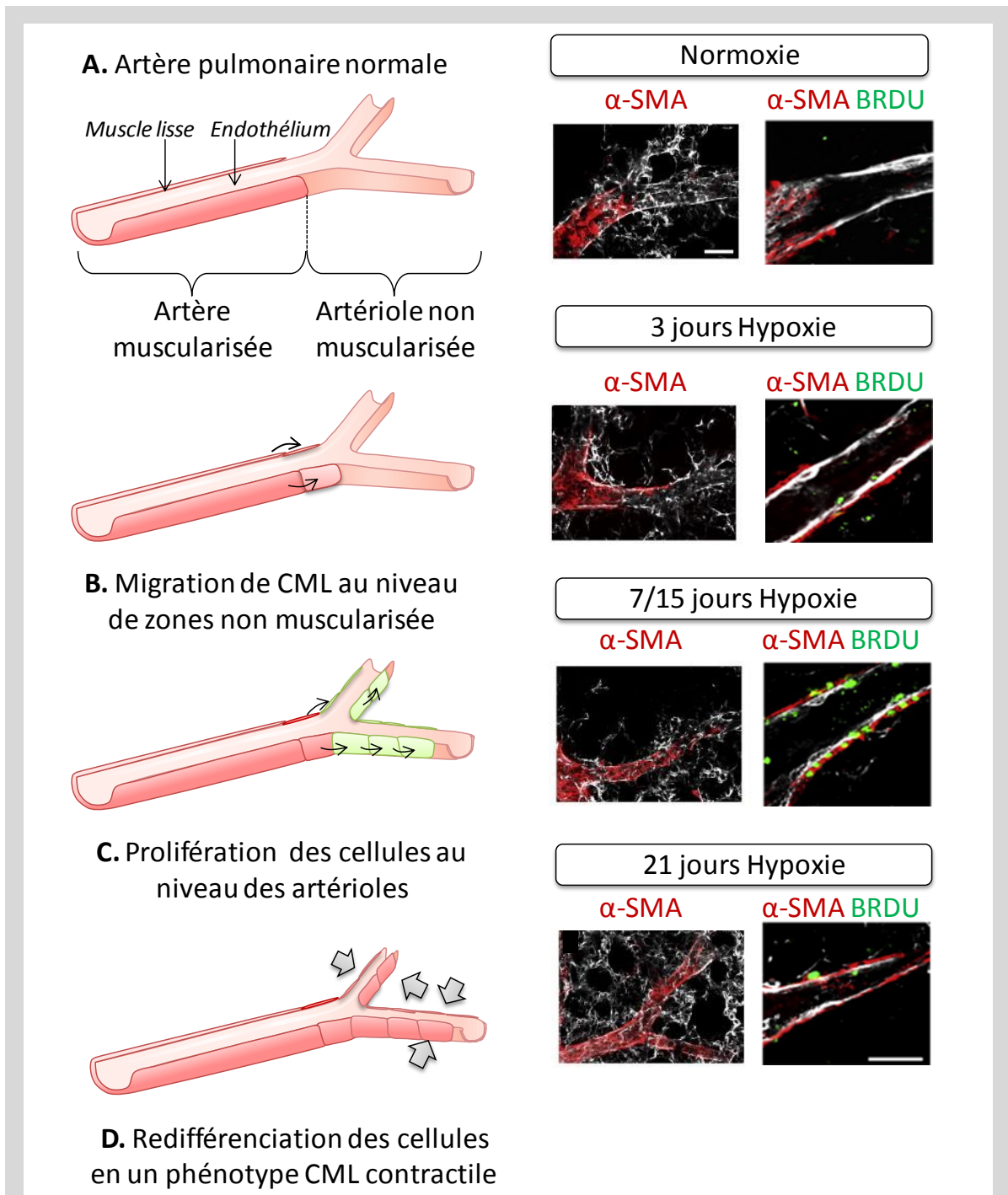
À la suite de ces lésions, les CE vont présenter une diminution de la production de NO, de prostacyclines et une augmentation de la production d'ET-1<sup>330, 331</sup>. Paradoxalement, la eNOS peut également être suractivée, produisant beaucoup plus de NO. Cependant, cette surproduction de NO est néfaste car il forme des peroxyntrites (ONOO<sup>-</sup>)<sup>332</sup> en se couplant avec l'anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) dont la quantité augmente dans l'HTAP<sup>333</sup>. Les ONOO<sup>-</sup> induisent la nitration et l'inactivation de protéines impliquées dans la vasodilatation. Ceci conduit à un défaut de relaxation des vaisseaux et donc à une augmentation de la contraction des AIP.

#### D. Prolifération et migration des CML

L'une des caractéristiques de l'HTP est la muscularisation des petites AIP. En effet, comme nous l'avons vu dans la première partie de l'introduction, les artéριοles pré-capillaires ne sont pas muscularisées et se composent uniquement d'une monocouche d'endothélium (**Figure 32A**). Une étude récente a montré qu'au cours du développement de l'HTP chez la souris, ces petites AIP vont progressivement se musculariser. Au départ, les CML vont migrer vers les zones non muscularisées en perdant leur phénotype contractile vers un phénotype migratoire (**Figure 32B**). Puis, une fois au niveau des artéριοles pré-capillaires, les CML vont proliférer (elles sont positives au BRDU, un marqueur nucléaire de la prolifération) (**Figure 32C**). Ensuite, ces nouvelles cellules qui entourent les petites artéριοles pulmonaires vont se redifférencier en CML au phénotype contractant (**Figure 32D**)<sup>21</sup>.

De plus, outre la muscularisation des petites AIP, une migration et une prolifération des CML au niveau des artères de plus gros diamètre se met également en place ce qui conduit à augmenter la taille du muscle lisse des AIP.

De nombreux mécanismes sont à l'origine de cette migration et de cette prolifération des CML. Par exemple, le taux sérique de facteurs de croissance tels que le PDGF, l'EGF, est augmenté dans les artères distales des patients HTP<sup>334</sup>. La régulation de nombreux microARN (miARN) influence également la migration et la prolifération des CML<sup>335</sup>. De plus, alors qu'à l'état physiologique, une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  conduit à la contraction des CML et des artères, en condition pathologique, le  $Ca^{2+}$  joue aussi un rôle dans la prolifération et la migration (voie NFAT par exemple).



**Figure 32** : Muscularisation des petites AIP dans l'HTP, d'après <sup>18</sup>. Les expériences ont été réalisées sur des coupes de poumon de souris lors d'une hypoxie chronique de 21 jours.  $\alpha$ -SMA :  $\alpha$ -smooth muscle actin représente les CML ; le BRDU est un marqueur des noyaux en prolifération. La muscularisation des AIP débute par une migration des CML (B) vers des zones dépourvues de CML. Après une phase de prolifération à partir de 7 jours d'hypoxie (C), les cellules se redifférencient en CML au phénotype contractile (D).



## E. Contraction des AIP dans l'HTP

### a) Modification de la signalisation calcique dans l'HTP

Dans l'HTP, l'homéostasie calcique est altérée et les CML ne sont plus capables d'apporter une réponse adaptée à un stimulus particulier. De ce fait, de nombreuses voies de signalisation calcique sont modifiées et conduisent soit à une plus forte augmentation soit à une augmentation maintenue dans le temps de la  $[Ca^{2+}]_i$ , ce qui résulte en plus forte contraction des CML, voire une migration et une prolifération. Ainsi, dans l'HTP, la vasoconstriction augmente de 20 fois les résistances vasculaires périphériques, par rapport aux conditions physiologiques<sup>275</sup>.

#### i. Les canaux $K^+$ et CCDV dans l'HTP

En conditions physiologiques, le potentiel transmembranaire de repos des CML d'AIP est de l'ordre de -50 mV. Dans l'HTP, les CML sont davantage dépolarisées, ce qui facilite l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les CCDV dont l'expression augmente ( $Ca_v3.2$  et  $Ca_v1.2$ )<sup>102</sup> (**Figure 33**). De plus, l'hypoxie aiguë (48 heures) a pour effet d'augmenter l'expression et l'activité des  $Ca_v3.2$  mais pas 3.1 dans des CML d'AIP en culture. Cette régulation s'effectue par la fixation du facteur inductible par l'hypoxie (HIF) sur un site élément de réponse à l'hypoxie qui est uniquement présent sur la séquence du gène du canal  $Ca_v3.2$ <sup>336</sup>. D'autre part, les canaux  $Ca_v3.1$  sont impliqués dans la prolifération des CML en réponse à des agents pro-prolifératifs<sup>337, 338</sup>. **Un article en annexe de ma thèse présente des résultats quant à l'implication des canaux  $Ca_v3.1$  dans le développement de l'HTP chez la souris.**

Le potentiel transmembranaire étant négatif, celui-ci est majoritairement contrôlé par un efflux d'ions positifs de la cellule tels que le  $K^+$ . Ainsi, chez le rat HC et chez les patients HTAP, on constate une réduction de l'expression et de l'activité de canaux potassiques ( $K_v$ ,  $K_{ATP}$ , TASK-1 et  $BK_{Ca}$ ), conduisant à une dépolarisation des CML<sup>275</sup> (**Figure 33**). Cette implication de la réduction des canaux  $K^+$  dans l'HTP est soulignée par le fait que des traitements visant à en augmenter l'activité (tels que la DHEA par exemple), améliorent l'HTP. En 2013, une étude a montré qu'un nouveau gène, KCNK3, est impliqué dans l'HTAP héréditaire et code pour un canal potassique : TASK-1. Chez ces patients, une mutation perte de fonction du gène KCNK3 induit une diminution de l'activité de ce canal, dépolarisant le potentiel transmembranaire des CML<sup>307</sup>.

#### ii. Les canaux TRP et l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}$ dans l'HTP

L'expression et l'activité de nombreux canaux TRP est augmentée dans l'HTP (en page 68). Ces canaux étant non sélectifs, leur activation conduit non seulement à un influx de  $Ca^{2+}$  plus important mais également à un influx de  $Na^+$ . Cette augmentation accrue de la  $[Na^+]_i$  conduit à inverser l'activité de l'échangeur  $Na^+/Ca^{2+}$  de la membrane plasmique. En mode

réverse, l'échangeur contribue à extruder le  $\text{Na}^+$  de la cellule mais fait entrer plus de  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>339</sup> (**Figure 33**).

### iii. L'homéostasie du RS des CML dans l'HTP

L'expression de nombreux canaux et protéines impliquées dans l'homéostasie calcique du RS est modifiée dans l'HTP. Parmi eux, on retrouve une augmentation de l'expression de Orai1, STIM1<sup>340</sup> et STIM2<sup>341</sup>. Cette augmentation de leur expression se traduit par une augmentation de l'influx capacitif (courant SOC) lors d'une vidange de  $\text{Ca}^{2+}$  du RS. Cet influx de  $\text{Ca}^{2+}$  participe à la fois à l'hyperréactivité des CML et à leur prolifération dans l'HTP.

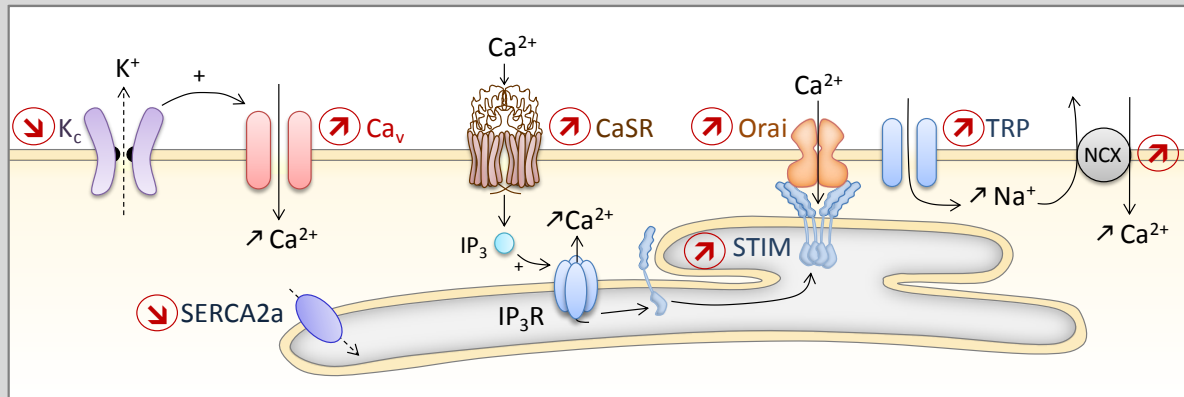
Récemment, une étude a montré que la pompe SERCA2a est largement impliquée dans l'HTP. En effet, chez des patients HTAP et des rats MCT, l'expression de SERCA2a diminue. Cette diminution de l'expression et donc de l'activité de SERCA2a conduit à augmenter davantage la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  basale, le repompage du  $\text{Ca}^{2+}$  dans le RS se faisant moins (**Figure 33**). La  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  étant plus élevée, celle-ci conduit à une augmentation de la prolifération et de la migration des CML d'AIP. Les auteurs ont montré que la réadministration par aérosol du gène SERCA2a couplé à un virus adéno-associé chez les rats MCT empêchait le développement de la maladie, à la fois au niveau des forces hémodynamiques et au niveau du remodelage cardiaque droit<sup>342</sup>. De plus, l'expression de SERCA2a diminue également dans le ventricule droit des rats MCT en insuffisance cardiaque et intervient dans l'apparition d'arythmies<sup>322</sup>.

### iv. Les CaSR dans l'HTP

Les CaSR ou Calcium sensing receptors sont des récepteurs couplés aux protéines G de la membrane plasmique activés par des cations extracellulaires ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ), des polypeptides (peptide B-amyloïde), des polyamines (spermine, spermidine, putrescine), des antibiotiques (néomycine, kanamycine) et des acides aminés (phénylalanine, tyrosine, tryptophane, glutamate). Leur activation conduit à augmenter la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  via une voie dépendant de l' $\text{IP}_3$ <sup>343</sup>. Plus la concentration calcique extracellulaire ( $[\text{Ca}^{2+}]_e$ ) est élevée, plus les CaSR vont être activés et augmenter la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , faisant de ces récepteurs des senseurs extracellulaires du  $\text{Ca}^{2+}$ . En conditions physiologiques, les CaSR permettent aux cellules d'avoir un retour sur la  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  et de la surveiller. En effet, lorsque du  $\text{Ca}^{2+}$  entre dans la cellule par des CCDV par exemple, une diminution locale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  se produit. Les CaSR peuvent donc être impliqués dans la surveillance de cette baisse de  $[\text{Ca}^{2+}]_e$  dans des microdomaines membranaires et induire en retour une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Des pompes calciques de la membrane plasmique (PMCA), à l'activité et à la structure similaires à celles des SERCA du RE/RS, vont être impliquées dans l'efflux de  $\text{Ca}^{2+}$  vers le milieu extracellulaire afin d'en rétablir l'homéostasie calcique locale. Enfin, le  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire pourrait également servir de messenger cellulaire paracrine entre cellules voisines<sup>344</sup>.



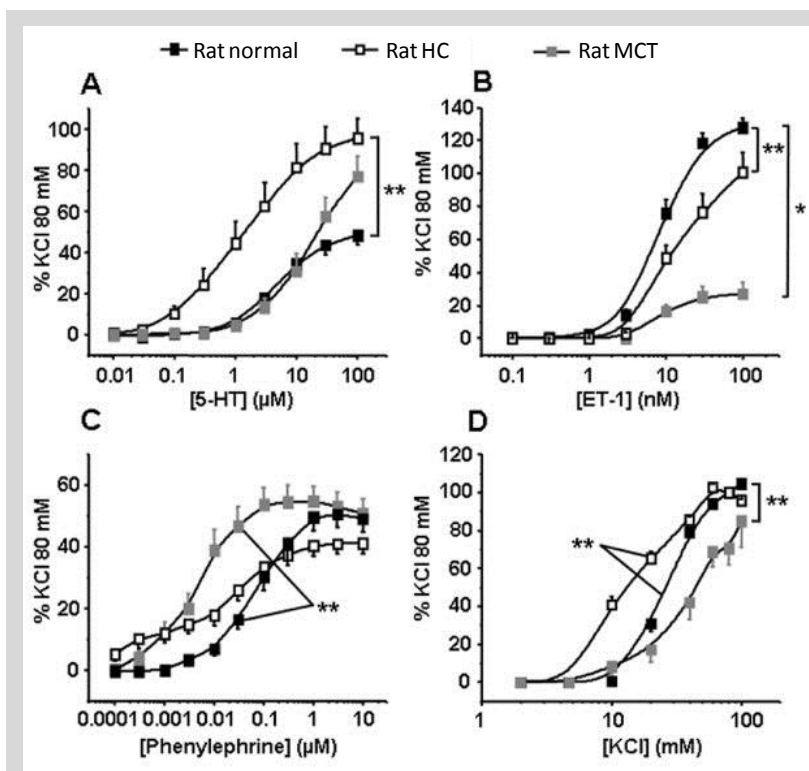
Dans l'HTP, l'expression et l'activité des CaSR sont très fortement augmentées. Ainsi, pour une même  $[Ca^{2+}]_e$ , la  $[Ca^{2+}]_i$  va beaucoup plus fortement augmenter, conduisant à une contraction et à une prolifération, plutôt qu'à une simple surveillance de la  $[Ca^{2+}]_e$ <sup>11</sup> (**Figure 33**).



**Figure 33** : Résumé des modifications des voies de signalisations dans l'HTP dans une CML d'AIP. On constate une augmentation de l'entrée de  $Ca^{2+}$  depuis le milieu extracellulaire et de sortie de  $Ca^{2+}$  du RS.

#### b) Les agonistes vasoconstricteurs

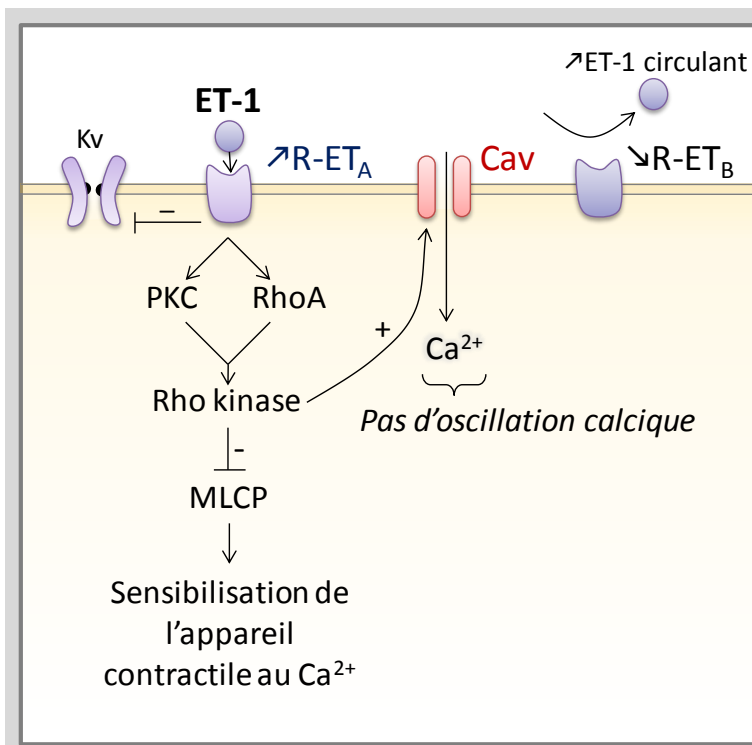
Les phénomènes de migration et de prolifération sont importants dans la mise en place de l'HTP. Cependant, c'est la force de contraction des AIP qui intervient dans le maintien de la maladie et dans l'augmentation des résistances périphériques à l'écoulement. Dans l'HTP, les AIP ont une hyperréactivité aux agonistes vasoconstricteurs, notamment à la sérotonine (5-HT) (**Figure 34A**)<sup>4</sup>.



**Figure 34** : Réactivité vasculaire aux agonistes vasoconstricteurs des AIP de rats normaux et de rats ayant une HTP à la suite d'une hypoxie chronique (HC) ou d'une injection de monocrotaline (MCT).  
**A.** Contraction à la 5-HT.  
**B.** Contraction à l'ET-1.  
**C.** Contraction à la phényléphrine.  
**D.** Contraction au KCl dépolarisant<sup>4</sup>.

### c) L'endothéline-1 dans l'HTP

Chez les rats souffrant d'HTP, la voie de signalisation de l'ET-1 est complètement différente<sup>345</sup>. Au final, les réponses calciques et la contraction ne sont pas modifiées, voire sont réduits chez les rats Wistar HC<sup>4, 346</sup> et MCT<sup>4, 347, 348</sup> (ce n'est pas le cas chez les rats Sprague-Dawley<sup>349</sup>). Chez les rats souffrant d'HTP, la pression étant plus élevée, les AIP sécrètent davantage d'ET-1 en réponse à l'étirement<sup>283</sup> et son taux sérique s'en trouve plus élevé<sup>347, 350</sup>. Face à une diminution de l'expression des R-ET<sub>B</sub>, l'expression des R-ET<sub>A</sub> augmente par compensation dans les CML<sup>351</sup>, modifiant la voie de signalisation associée à l'ET-1. L'activation des R-ET<sub>A</sub> a pour effet de sensibiliser l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup> par une voie RhoA/Rho kinase<sup>347, 352, 353</sup>. De plus, la Rho Kinase activerait des CCDV entraînant un influx calcique<sup>297</sup>. L'ET-1 induit également une inhibition des canaux K<sup>+</sup> voltage-dépendants, ce qui dépolarise la membrane plasmique et contribue à l'influx de Ca<sup>2+</sup> par les CCDV<sup>353, 354</sup>. Ainsi, en réponse à l'ET-1, le Ca<sup>2+</sup> augmente et n'oscille plus<sup>346</sup>, entraînant une contraction plus soutenue, même si son amplitude n'augmente pas par rapport aux rats normaux (**Figure 35**). L'ET-1 interviendrait également dans la prolifération des CML<sup>355</sup>. De plus, dans l'HTP, on observe une diminution de la production de NO et de PG(I<sub>2</sub>) en réponse à l'ET-1<sup>279, 283, 356</sup>, ce qui diminue la vasodilatation induite par l'ET-1 au niveau des cellules endothéliales.



**Figure 35** : Chez les rats souffrant d'HTP, l'ET-1 agit majoritairement sur les R-ET<sub>A</sub> dont l'expression augmente par rapport à celle des R-ET<sub>B</sub> qui diminue. L'activation des R-ET<sub>A</sub> a plusieurs effets : i. Inhibition des canaux K<sub>v</sub>; ii. Activation des canaux Ca<sub>v</sub> provoquant un influx calcique ; iii. Sensibilisation de l'appareil contractile au Ca<sup>2+</sup>. De plus, la diminution des R-ET<sub>B</sub> contribue à augmenter le taux sérique d'ET-1.

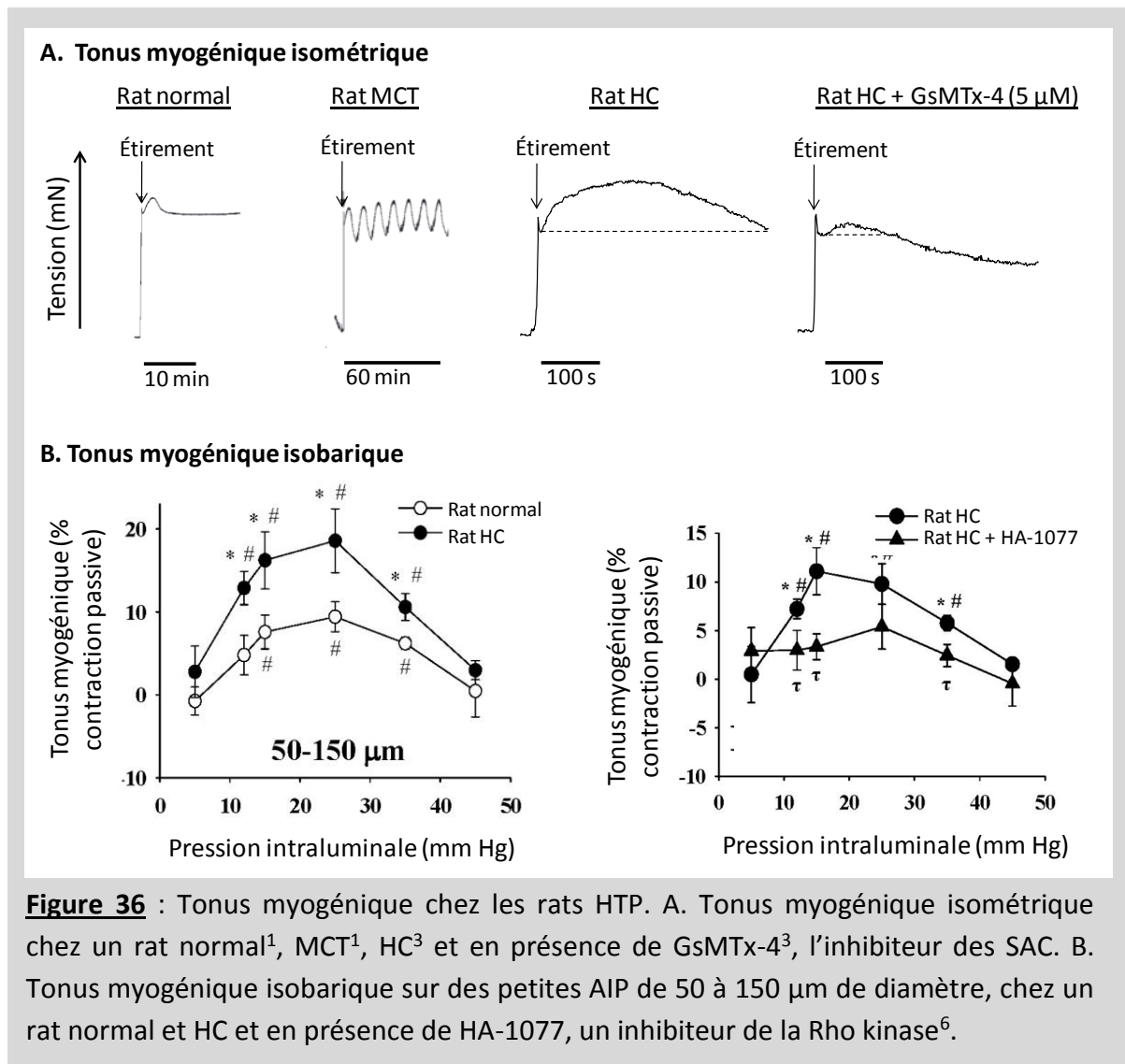
Dans l'HTP, les voies de signalisation calcique intracellulaire sont modifiées et conduisent à une plus forte augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CML et à une plus forte contraction des AIP. Mais qu'en est-il des forces mécaniques dans cette pathologie ? Nous l'avons vu, dans l'HTP, la pression dans l'artère pulmonaire est augmentée. Si cette pression augmente, cela signifie que les forces de tension pariétales et d'étirement augmentent également. Dans ce contexte, qu'en est-il du tonus myogénique dans l'HTP ?

## **7. Tonus myogénique dans l'hypertension pulmonaire**

Chez les rats normaux, le tonus myogénique est faible car contrebalancé par les mécanismes impliqués dans la vasodilatation afin de maintenir une faible pression dans l'AIP. Cependant, dans une condition pathologique telle que l'HTP, le tonus myogénique est augmenté et démasqué, révélant toute son importance.

Ainsi, les rats HC ont un plus fort tonus myogénique isométrique<sup>3</sup> (**Figure 36A**) et isobarique<sup>6</sup> (**Figure 36B**). Ce plus fort tonus myogénique est bloqué par le peptide inhibiteur des SAC GsMTx-4 (**Figure 36A**), suggérant un rôle des SAC dont l'activité augmente chez les rats HC<sup>3</sup>. De plus, de nombreux canaux TRP dont l'expression augmente pourraient être impliqués dans cette augmentation du tonus myogénique. En effet, l'expression des canaux TRPV4<sup>32, 66</sup>, TRPC6<sup>60, 357</sup>, TRPC1<sup>54</sup> et TRPC3<sup>275</sup> augmente dans les AIP de rats souffrant d'HTP (HC et MCT). Chez les patients HTAP, l'expression de TRPC6<sup>59</sup> augmente également.

Comme chez les rats normaux, le tonus myogénique chez les rats HC ne fait pas intervenir des CCDV. La contraction induite par un étirement s'expliquerait, en partie, par une sensibilisation de l'appareil contractile au  $Ca^{2+}$  par une voie RhoA/Rho kinase<sup>6</sup>. Chez les rats MCT, l'étirement provoque des contractions rythmiques (**Figure 36A**) qui font intervenir une production de phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). La PLA<sub>2</sub> contribue à la formation d'acide arachidonique et de ses dérivés (*via* une cyclooxygénase de type 1), tels que des précurseurs des prostaglandines (PGH<sub>2</sub>) à l'effet vasoconstricteur<sup>1</sup>.



**Figure 36** : Tonus myogénique chez les rats HTP. A. Tonus myogénique isométrique chez un rat normal<sup>1</sup>, MCT<sup>1</sup>, HC<sup>3</sup> et en présence de GsMTx-4<sup>3</sup>, l'inhibiteur des SAC. B. Tonus myogénique isobarique sur des petites AIP de 50 à 150 µm de diamètre, chez un rat normal et HC et en présence de HA-1077, un inhibiteur de la Rho kinase<sup>6</sup>.

## 8. Les cavéoles dans l'HTP

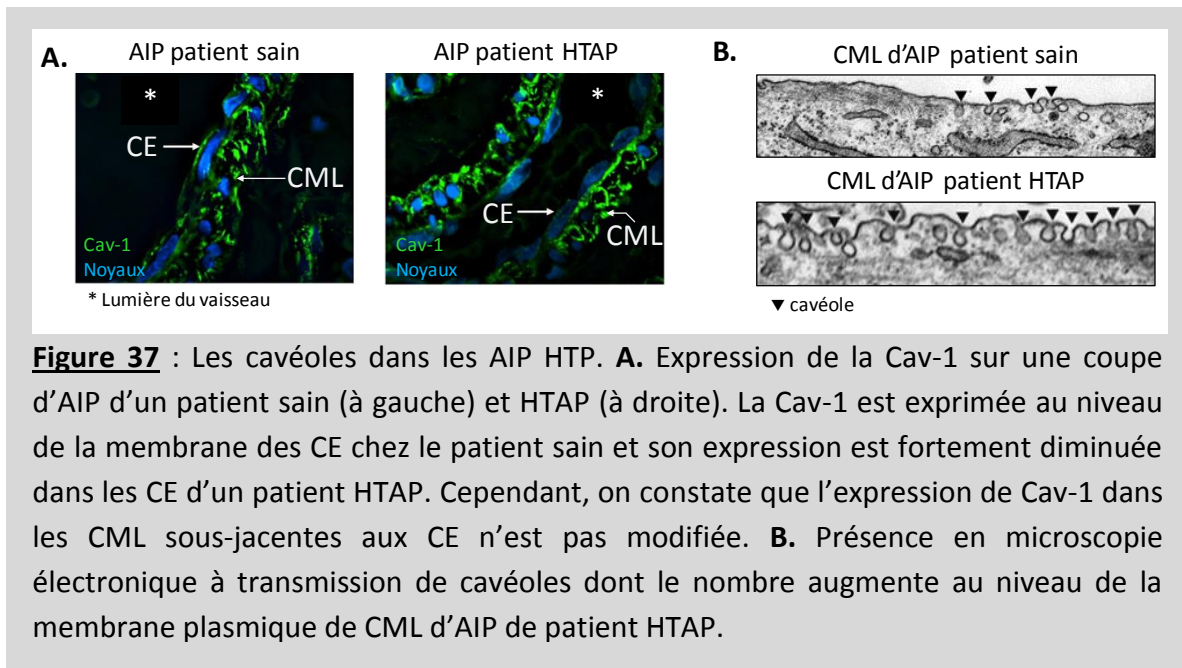
Nous l'avons vu, la présence des cavéoles dans le muscle lisse des AIP est controversée dans la littérature. Toutefois, l'expression de la Cavéoline-1 (Cav-1) est importante pour la physiopathologie de la circulation pulmonaire. En effet, les souris KO pour la Cav-1 développent spontanément une HTP avec une hypertrophie du ventricule cardiaque droit<sup>174</sup>. Chez ces souris, au niveau des CE, l'eNOS est suractivée et produit davantage de NO. Ce NO réagit avec l'anion superoxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) dont la quantité augmente<sup>333</sup>, ce qui produit des peroxynitrites ( $ONOO^-$ )<sup>332</sup>. Les  $ONOO^-$  ont pour effet de nitrosyler la PKG dont l'activité diminue, ce qui réduit la vasodilatation des AIP<sup>332</sup>. Ce rôle de la eNOS dans le développement de l'HTP chez les souris Cav-1<sup>-/-</sup> est renforcé chez une souris double KO pour la Cav-1 et la eNOS qui ne développe plus d'HTP<sup>332</sup>. De même, la

réexpression de la Cav-1 au niveau de l'endothélium des souris KO restaure un phénotype normal à la fois au niveau de l'AIP et de l'hypertrophie cardiaque<sup>358</sup>.

Chez l'homme, une étude de 2012 montre dans une famille souffrant d'HTAP, une mutation hétérozygote du gène codant pour la Cav-1. Cette famille ne présente pas de mutation des autres gènes classiques impliqués dans l'HTAP (BMPR2, ALK1, ENG, SMAD9) et après une analyse rétrospective, ce variant de CAV1 n'est pas présent chez des patients sains. Cette mutation est une délétion de 2 nucléotides (473C et 474A) qui a pour impact d'augmenter de 21 acides aminés le côté C-terminal de la Cav-1. Ceci masquerait le site d'ancrage de la Cav-1 aux cavéoles. On observe alors, chez ces patients HTAP, une diminution de l'expression de la Cav-1 et plus particulièrement au niveau des cellules endothéliales (**Figure 37A**)<sup>306</sup>. Une telle diminution de l'expression de la Cav-1 a été retrouvée dans de nombreuses études chez les patients HTAP<sup>196, 206, 332, 359, 360</sup> et sur des modèles de rats d'HTP. En effet, chez les rats MCT, l'expression de la Cav-1 (ainsi que de la Cav-2) diminue<sup>2, 197, 199, 202, 361, 362</sup> et cela, à partir de 1 semaine après l'injection de MCT<sup>363</sup>. De même, l'expression de la Cav-1, la Cav-2 et de Cavin-1 diminue sur les modèles de rat HTP SUGEN/hypoxie (SU/HYP) et FHR<sup>2</sup>. Par contre, chez le modèle de rat HC, l'expression de la Cav-1 ne varie pas en hypoxie chronique<sup>361, 364, 365</sup>.

Si l'expression de la Cav-1 diminue au niveau de l'endothélium, certaines études montrent également une augmentation de la présence de la Cav-1 au niveau des CML de patients HTAP idiopathique (**Figure 37B**)<sup>5, 204, 366</sup> ou d'HTP associée à une BPCO<sup>206</sup>. De façon intéressante, l'augmentation de l'expression de la Cav-1 dans les CML ne se retrouve que dans les AIP où la présence du vWF est diminuée<sup>197, 362, 367</sup>. Une diminution du vWF au niveau des AIP est un indicateur d'une lésion très importante ou d'une perte de l'endothélium. Cette lésion endothéliale s'accompagne alors d'une augmentation de cellules endothéliales circulantes et de vWF dans le sang (qui ne sont plus présents au niveau de l'AIP). Ainsi, chez les patients HTAP, le taux sérique de vWF est augmenté et son expression au niveau des AIP est réduite<sup>368-370</sup>. L'augmentation de vWF circulant peut conduire à augmenter les résistances périphériques vasculaires par la formation de thrombus.

De plus, de façon intéressante, on peut constater sur la **Figure 37A**, que l'expression de la Cav-1 dans les CML ne varie pas chez le patient présentant une mutation du gène CAV1, alors que l'expression de la protéine est réduite dans l'endothélium. Il est possible que l'on ait un profil d'expression génique différentiel en fonction du type cellulaire. Ceci pourrait également témoigner du fait que la mutation du gène CAV1 observée dans ces cas d'HTAP héritable n'a pas d'effet sur l'expression de la protéine Cav-1 à proprement parler mais plutôt sur sa stabilité. Ainsi, il est possible que les CML possèdent des protéines/ancrages qui stabilisent la protéine Cav-1 mutée, contrairement aux CE.



**Figure 37** : Les cavéoles dans les AIP HTP. **A.** Expression de la Cav-1 sur une coupe d'AIP d'un patient sain (à gauche) et HTAP (à droite). La Cav-1 est exprimée au niveau de la membrane des CE chez le patient sain et son expression est fortement diminuée dans les CE d'un patient HTAP. Cependant, on constate que l'expression de Cav-1 dans les CML sous-jacentes aux CE n'est pas modifiée. **B.** Présence en microscopie électronique à transmission de cavéoles dont le nombre augmente au niveau de la membrane plasmique de CML d'AIP de patient HTAP.

## 9. Les traitements actuels

En 1991, la survie des patients était de 48% à 3 ans<sup>371</sup>. 20 ans plus tard, en 2011, la survie à 3 ans est de 58%, sur une étude réalisée sur 190 patients en France<sup>324</sup>. Ainsi, même si les progrès en termes de traitement ont permis de réduire de 10% le taux de mortalité, l'HTP reste une pathologie pour laquelle le pronostic vital est rapidement mis en jeu pour encore de nombreux patients<sup>372</sup>.

L'objectif majeur pour les années futures est de passer d'une maladie invalidante et mortelle à une maladie chronique sans handicap majeur, afin d'améliorer la qualité de vie des patients. Les traitements actuels visent à corriger la dysfonction endothéliale et à inhiber la prolifération des CML afin de faire régresser les lésions d'hypertrophie et de remodelage vasculaire. Ces traitements incluent des inhibiteurs calciques, des dérivés de la prostacycline, des antagonistes des récepteurs de l'ET-1 et des inhibiteurs des phosphodiésterases de type 5 (PDE-5)<sup>373</sup> (**Figure 38**).

### A. Traitements symptomatiques

Dans les formes d'HTAP idiopathique, un traitement utilisé de manière systématique est un anticoagulant. Ce traitement vise à réduire les phénomènes de thrombose dans les petites AIP remodelées. Des diurétiques associés à un régime pauvre en sodium permettent également de réduire la volémie et diminuent les signes de surcharge ventriculaire droite. Enfin, une oxygénothérapie est envisagée pour 15 à 20% des patients qui présentent une hypoxie sévère ( $P_{aO_2} < 55$  mmHg) afin de limiter la vasoconstriction hypoxique. Cependant, ces types de traitements sont symptomatiques et il est nécessaire d'y adjoindre des traitements plus spécifiques visant à améliorer la qualité de vie des patients<sup>374</sup>.

### B. Les inhibiteurs calciques

L'un des premiers traitements utilisé chez les patients HTP est un inhibiteur des CCDV de type L (nifédipine, diltiazem, almodipine) qui vise à réduire l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  dans les CML. Les inhibiteurs calciques s'opposent ainsi à la vasoconstriction mais ont peu d'effet sur le remodelage vasculaire. Ainsi, les inhibiteurs calciques sont majoritairement indiqués chez les patients où les phénomènes de vasoconstriction prédominent sur le remodelage. Ces patients dits « répondeurs » sont caractérisés lorsque l'on observe une diminution d'au moins 10 mmHg de la PAPm lors de l'inhalation de NO au cours du cathétérisme cardiaque droit. De plus, étant donné que bloqueurs de CCDV ont un fort effet vasodilatateur au niveau de la circulation systémique, seuls les patients ayant une pression systémique moyenne adéquate ( $> 90$  mmHg) peuvent bénéficier de ce traitement. L'efficacité du traitement chronique avec ces inhibiteurs est une réduction de la dyspnée. Cependant, moins de 10% des patients ayant une HTAP idiopathique ou associée à la prise d'anorexigènes répondent positivement à ce traitement, les patients des autres groupes d'HTP n'y répondent pas du tout<sup>374, 375</sup>.

### C. Voie du NO

Lors de l'HTP, la biodisponibilité du NO diminue en raison de nombreux facteurs (découplage de la eNOS, diminution du niveau de L-arginine, augmentation de sa capture par l'hémoglobine ou l' $\text{O}_2^{\cdot}$ ). Au niveau des CML, le NO augmente la production de  $\text{GMP}_c$  vasodilatateur. Or, dans l'HTP, le taux de  $\text{GMP}_c$  diminue à cause d'une augmentation de phosphodiésterases de type 5 (PDE-5) qui convertissent le  $\text{GMP}_c$  en  $\text{GMP}$ <sup>374,372</sup>. Les inhibiteurs des PDE-5, tels que le Sildenafil permettent d'augmenter la concentration intracellulaire de  $\text{GMP}_c$  et donc augmente la vasodilatation des AIP et diminue la prolifération cellulaire. De plus, de nouveaux traitements comme le BAY 63-2521 sont en cours de test, celui-ci vise à stimuler directement la synthèse de  $\text{GMP}_c$  via une stimulation de la guanylate cyclase<sup>372</sup>.

### D. Voie de l'ET-1

L'endothéline-1 contribue à la vasoréactivité et à la prolifération des CML et son taux sérique augmente dans l'HTP. Il existe donc des inhibiteurs des récepteurs à l'endothéline-1 pour traiter les patients atteints d'HTP. Ce sont soit des inhibiteurs des  $\text{R-ET}_A$  et  $\text{R-ET}_B$  comme le Bosentan, soit des inhibiteurs sélectifs des  $\text{R-ET}_A$  comme l'Ambrisentan. Un nouvel inhibiteur dont la distribution tissulaire est plus spécifique est en cours d'utilisation: le Macitentan<sup>372, 372</sup>. De plus, contrairement au Bosentan, le Macitentan n'a pas d'effet hépatotoxique<sup>376</sup>.

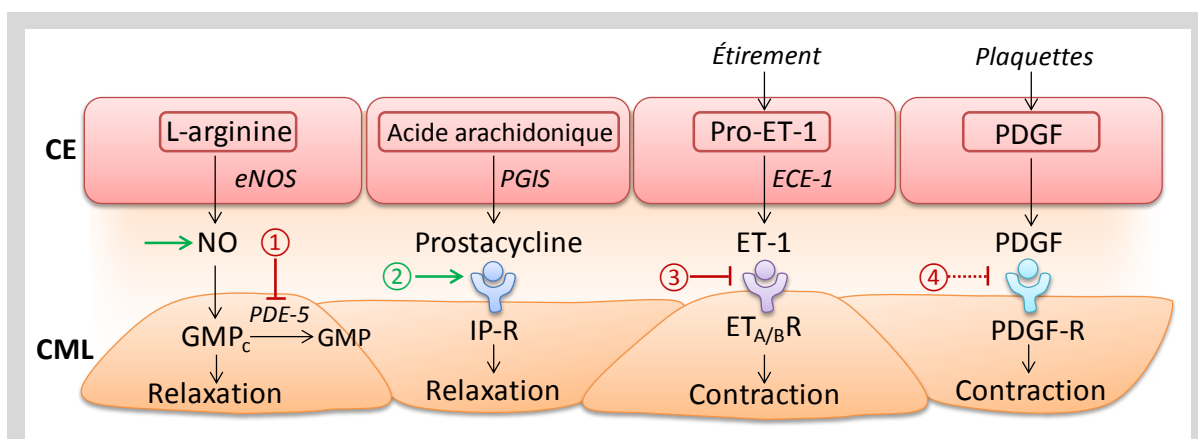


### E. Voie de la prostacycline

Les prostacyclines (PGI<sub>2</sub>) sont produites par les CE à partir de l'acide arachidonique. Le PGI<sub>2</sub> a un effet antithrombotique et vasodilatateur. Il agit sur des récepteurs membranaires (IP-R) et nucléaires (PPAR) au niveau des CML. Les IP-R sont des récepteurs couplés à une protéine G<sub>s</sub> ; leur activation conduit à augmenter le taux d'AMP<sub>c</sub> par l'adénylate cyclase. L'AMP<sub>c</sub> active la PKA à l'effet vasodilatateur. Dans l'HTP, la production de PGI<sub>2</sub> diminue. Ainsi, des dérivés des prostacyclines ont été développés afin de favoriser la vasodilatation des AIP<sup>374,372</sup>. Parmi les traitements classiques à base de dérivés des prostacyclines, l'Iloprost est inhalé, le Tréprostinil est administré par voie sous-cutanée et l'Époprosténol par voie intraveineuse. Cependant, les traitements en intraveineux ou sous-cutané sont lourds du fait de la cathétérisation et des douleurs locales engendrées. Quelques traitements par voie orale ont été développés (Selexipag) mais, actuellement, ces traitements entraînent des effets secondaires importants et les résultats obtenus sont peu encourageants<sup>372</sup>.

### F. Nouvelles cibles thérapeutiques

Les inhibiteurs des tyrosines kinases sont proposés car de nombreux résultats expérimentaux montrent que le PDGF, l'EGF et le FGF (des agonistes des récepteurs tyrosine kinase), induisent une forte prolifération et remodelage des AIP. Ainsi, l'Imatimib, un inhibiteur de tyrosine kinase est en cours d'évaluation comme traitement de l'HTP. D'autres traitements comme l'inhibition de la voie Rho-A, du transporteur à la sérotonine ou l'administration inhalée du peptide vasointestinal (qui a un effet vasodilatateur) sont en cours même si les premiers résultats ne montrent pas d'amélioration significative des symptômes<sup>372, 372</sup>.



**Figure 38** : Cibles thérapeutiques dans l'HTP. En ① les inhibiteurs des phosphodiésterases 5 (PDE-5) qui permettent d'augmenter le taux de GMP cyclique relaxant. En ② les inhibiteurs de la voie de la prostacycline. En ③ les inhibiteurs des récepteurs à l'ET-1. Et en ④ les nouvelles cibles thérapeutiques potentielles telles que les récepteurs au PDGF.



En fonction de l'état d'avancement de la maladie et de ses causes, ces médicaments peuvent être administrés par voie orale, en intraveineuse, en sous-cutanée ou par voie inhalée. Selon l'amélioration ou non de la maladie par les traitements, un traitement combiné peut également être proposé afin d'additionner les effets bénéfiques des médicaments<sup>372</sup>.

#### G. Transplantation pulmonaire et atrioseptostomie

Si les traitements pharmacologiques ne sont pas efficaces, la transplantation pulmonaire ou cardio-pulmonaire est proposée. La survie actuelle après transplantation pulmonaire est d'environ 80% à 1 an et 60% à 5 ans. La mortalité précoce est surtout due à une infection alors que la mortalité tardive reflète un rejet de la greffe<sup>374</sup>.

L'atrioseptostomie consiste à créer une communication entre l'oreillette droite et l'oreillette gauche afin de diminuer le volume du cœur droit suite soumis à la postcharge de l'artère pulmonaire. Même si cela conduit à diminuer la pression dans l'artère pulmonaire, le transport en O<sub>2</sub> est amélioré. Toutefois, la mortalité précoce est très élevée (14% à une semaine post-opératoire). Malgré cela, pour les patients qui survivent, l'amélioration des symptômes et des capacités fonctionnelles est énorme. L'atrioseptostomie représente une alternative pour les patients en attente d'une transplantation pulmonaire lors des HTAP sévères<sup>374</sup>.

En conclusion, si les traitements actuels permettent d'améliorer la qualité de vie de certains patients telle que l'amélioration des capacités d'exercice ou l'administration d'un traitement par voie orale plutôt que par voie intraveineuse par exemple<sup>374</sup>. Toutefois, malgré les avancées réalisées depuis plus de 100 ans dans les connaissances de l'HTP, les traitements actuels ne permettent pas de guérir les malades de l'HTP qui demeure une maladie grave et complexe, notamment due aux nombreuses formes qui la caractérise et à sa composante multifactorielle. Ainsi, la meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans le développement et le remodelage qui se met en place au cours de la pathologie, et plus particulièrement au niveau cellulaire, est importante pour le développement de futures cibles thérapeutiques.

# OBJECTIFS DE LA THÈSE



**N**ous l'avons vu au cours de cette introduction, la signalisation calcique au sein des CML est un élément important dans la régulation du tonus des AIP. La question est de savoir quels pourraient être les remodelages subcellulaires de cette signalisation calcique impliqués dans l'HTP. La présence des SAC, des cavéoles, des RyR, des IP<sub>3</sub>R, des SERCA, des mitochondries et des lysosomes, a été décrite dans l'AIP ; mais quelles sont leurs interactions respectives ? Dans cette thèse, j'ai essayé de mieux comprendre comment ces partenaires calciques sont impliqués dans l'homéostasie calcique pour fournir une réponse calcique adaptée à un stimulus et plus particulièrement à un étirement. Dans un deuxième temps, je me suis intéressé aux modifications de cette signalisation calcique dans l'HTP conduisant à une plus forte vasoconstriction des AIP.

Je présenterai en premier des résultats qui montrent comment l'organisation subcellulaire des RyR, des SERCA, des mitochondries et des lysosomes est importante dans les réponses calciques à l'étirement, chez des rats normaux et des rats souffrant d'HTP (rats HC et rats MCT). Dans un deuxième temps, le rôle des pompes SERCA3 dans l'homéostasie calcique des AIP sera étudié. Ensuite, je détaillerai comment les cavéoles peuvent être impliquées dans la mécanotransduction dans les CML d'AIP. Enfin, dans une dernière partie, des résultats préliminaires sur la présence du canal Piezo1 seront présentés.



# MATÉRIEL ET MÉTHODES



## 1. Les rats hypoxiques chroniques (HC) et monocrotalines (MCT) : deux modèles expérimentaux d'HTP

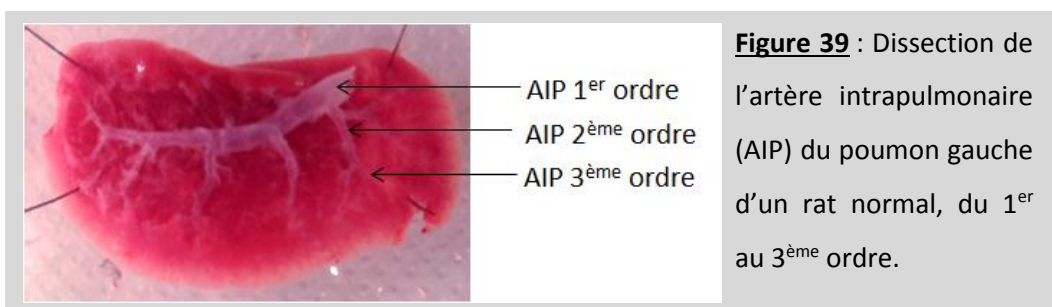
Trois populations de rats mâles de souche Wistar sont utilisées : des rats de 250-350 grammes élevés dans des conditions standard (rats contrôles, **Ctrl**) et deux modèles de rats présentant une hypertension pulmonaire. Les premiers développent la pathologie à la suite d'une hypoxie chronique (rats **HC**). Pour cela ils sont élevés pendant 3 semaines dans un caisson hypobare (50 kPa) mimant la vie en haute altitude (à 5500 m). La baisse de la pression barométrique dans les caissons va engendrer une diminution de la PO<sub>2</sub> alvéolaire et capillaire. Cette hypoxie pulmonaire provoque alors une vasoconstriction des AIP qui vise à ramener le rapport ventilation/perfusion égal à 1. Mais de façon prolongée, ici 3 semaines, l'hypoxie contribue au remodelage des AIP et à l'HTP.

Le second modèle utilisé est représenté par des rats injectés à la monocrotaline (60 mg/kg) (rats **MCT**). La monocrotaline, une fois métabolisée par le foie, va produire un composé pyrrolique qui altère l'endothélium vasculaire et conduit à une HTP.

Un indicateur de l'HTP est l'hypertrophie du ventricule cardiaque droit qui est estimée par le rapport de Fulton (poids de la paroi du ventricule droit sur poids de la paroi du ventricule gauche + septum). Les rats Ctrl ont un rapport de Fulton de  $0,23 \pm 0,01$ , les rats HC de  $0,54 \pm 0,02$  et les rats MCT de  $0,63 \pm 0,02$ . On considère que l'HTP est validée lorsque le rapport est supérieur à 0,3.

## 2. Isolement des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires de rat (CML d'AIP)

Après une euthanasie des rats par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (190 mg/kg), les poumons sont prélevés et placés dans une solution isotonique à 310 mOsmol (**Tableau 2**). Les AIP du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> ordre sont micro-disséquées sous une loupe binoculaire (**Figure 39**), ouvertes longitudinalement et l'endothélium est abrasé. Le tissu récupéré, principalement de la *média*, est ensuite digéré de façon enzymatique par de la papaïne (0,4 mg/mL), de la collagénase de type 1 (0,3 mg/mL) et du dithiothréitol (DTT - 0,3 mg/mL) qui optimise l'action de la papaïne en se plaçant dans un milieu réducteur. Cette digestion s'effectue pendant 15 minutes à 37°C dans une solution d'HBSS (Hank's Buffered Salt Solution) à faible Ca<sup>2+</sup> (50 µM) contenant 1 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumine).



**Figure 39** : Dissection de l'artère intrapulmonaire (AIP) du poumon gauche d'un rat normal, du 1<sup>er</sup> au 3<sup>ème</sup> ordre.



Après 2 rinçages en HBSS faible  $\text{Ca}^{2+}$ , les CML d'AIP sont dispersées mécaniquement par des allers/retours dans une pipette de verre siliconée et rodée, pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite centrifugées 5 min à 4°C à 250 G et le culot remis en suspension dans du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 1% d'acides aminés non essentiels, 1% d'antibiotiques (pénicilline (100 U/mL) et streptomycine (0.1 mg/mL)) et supplémenté en 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules sont placées soit sur des lamelles de verre de 30 mm de diamètre préalablement recouvertes de collagène, soit dans une plaque 96 puits à bord noir. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C contenant 20% d' $\text{O}_2$ , 5% de  $\text{CO}_2$ , en atmosphère humide.

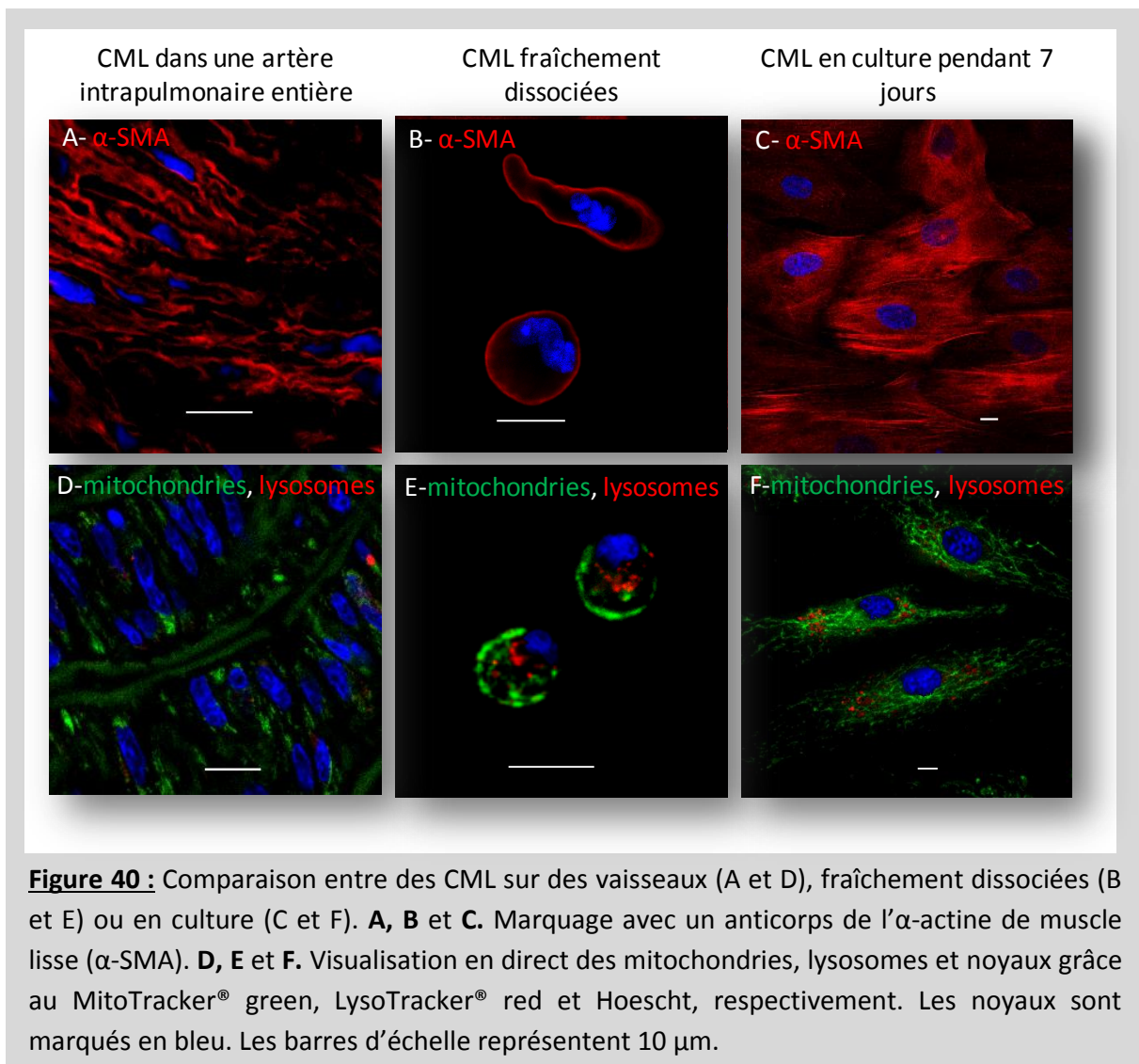
	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	Hepes	6 D-glucose	Mannitol	CaCl <sub>2</sub>	pH
Solution isotonique (310 mOsmol)	91,3	5,9	1,2	10	14	91	2,2	7,4
Solution hypo-osmotique (225 mOsmol)	91,3	5,9	1,2	10	14	-	2,2	7,4
Solution isotonique confocal (310 mOsmol)	62,3	5,9	1,2	10	14	148	2,2	7,4
Solution hypo-osmotique confocal (170 mOsmol)	62,3	5,9	1,2	10	14	-	2,2	7,4
Solution intrapipette KCl	-	145	2	10	-	-	-	7,25

**Tableau 2 :** Concentrations en mM des solutions utilisées pour la dissection, les chocs osmotiques et le patch-clamp.

→ Remarque sur la culture des cellules

Les cellules obtenues par ce processus de dissociation ont un aspect rond, contrairement à ce que l'on pourrait s'attendre pour des CML. En effet, dans un vaisseau, les CML sont fusiformes et allongées (**Figure 40A**). Le processus de dissociation décrit ci-dessus a pour effet de casser les liaisons intercellulaires. Une fois dissociées les unes des autres, la majorité des CML adoptent alors la forme la plus stable énergétiquement, c'est-à-dire la sphère (**Figure 40B**). Les CML d'AIP isolées ici seront utilisées dans un délai maximum de 24 heures afin d'éviter tout passage dans un état prolifératif éloigné de leur état au sein du vaisseau, mais aussi toute dé-différenciation cellulaire. Comme on peut l'observer sur la **Figure 40D et Figure 40E**, le premier changement d'aspect qui apparaît dans la culture de CML d'AIP, est une augmentation de leur taille. En effet, que ce soit une CML dans un vaisseau ou fraîchement dissociée, leur taille moyenne est d'environ 15  $\mu\text{m}$ . Mais lorsque ces cellules sont mises en culture, à partir de 4 jours,, leur taille augmente (hypertrophie) et peut aller jusqu'à 150  $\mu\text{m}$ . En plus de ce changement de taille, l'organisation intracellulaire est elle aussi modifiée, notamment par une augmentation de la biogenèse et de la dynamique des mitochondries, mais aussi par un changement de localisation de nombreuses protéines ou de leur expression, telle que les RyR<sup>377-379</sup>. Le cytosquelette d' $\alpha$ -actine de

muscle lisse ( $\alpha$ -SMA) est également modifié. En effet, sur dans des vaisseaux et sur des CML fraîchement dissociées, il est localisé en sous-membranaire (**Figure 40A et Figure 40B**). Par contre, lors de la culture des CML, des fibres de stress apparaissent sur toute la cellule (**Figure 40C**). Pour ces raisons, les études présentées dans cette thèse seront uniquement effectuées sur des CML d'AIP fraîchement dissociées afin de rester au plus proche de la physiologie des cellules telle qu'elle pouvait l'être dans l'artère.

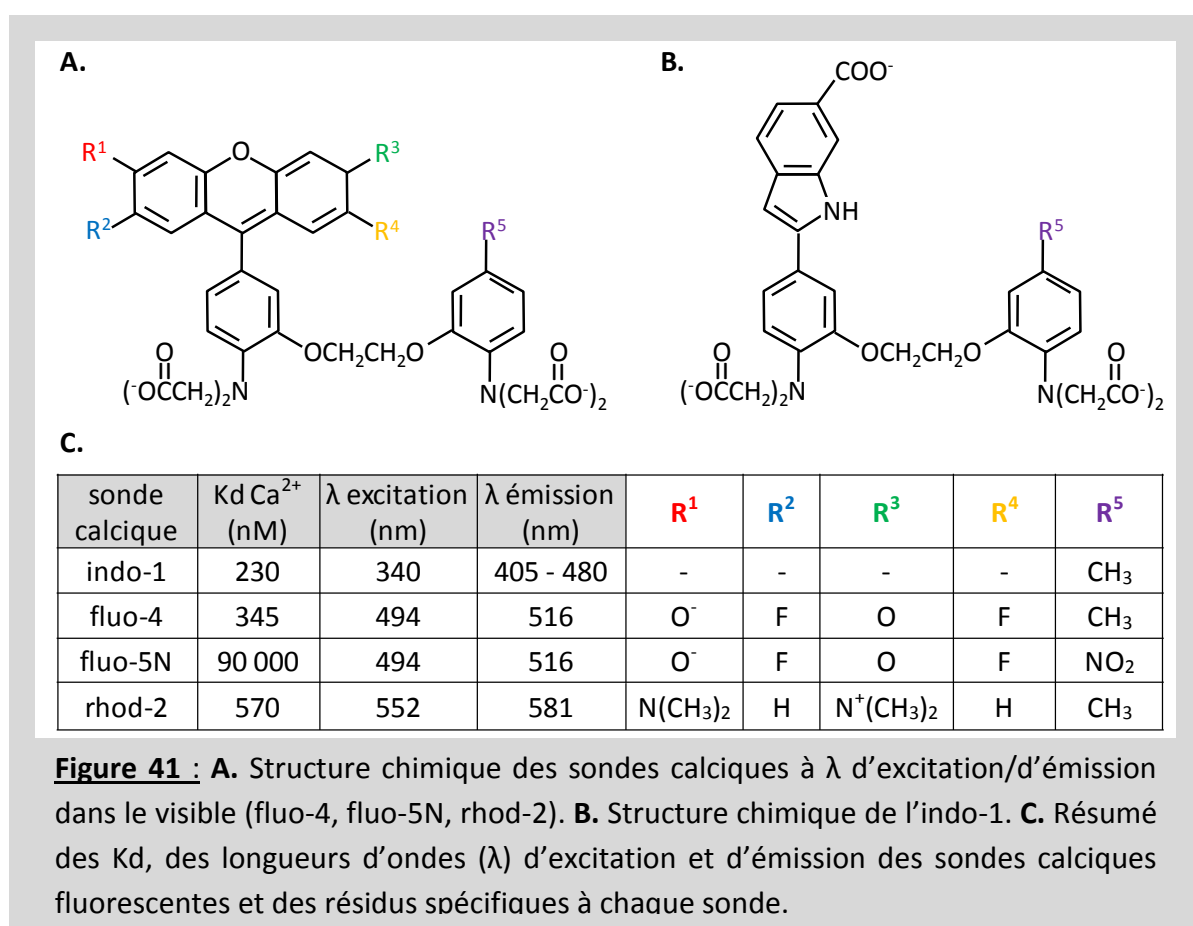


### 3. Les sondes calciques fluorescentes, des outils pour suivre en direct les flux calciques intracellulaires

Afin de mesurer la concentration en  $\text{Ca}^{2+}$  dans différents compartiments cellulaires (cytoplasme, réticulum endoplasmique, mitochondrie), différentes sondes calciques fluorescentes sont utilisées. Ces sondes sont toutes dérivées du BAPTA ou de l'EGTA, des chélateurs de  $\text{Ca}^{2+}$ , leur conférant ainsi la capacité de lier le  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pour permettre le passage des sondes depuis le milieu extracellulaire jusque dans la cellule, une fonction acétoxyéthyl ester (AM) est ajoutée à la molécule. Cette fonction AM rend la sonde non polarisée et insensible au calcium mais surtout perméable à la membrane plasmique des cellules. Une fois dans la cellule les estérases endogènes vont cliver la fonction AM et piéger la sonde dans le cytoplasme. Les sondes indo-1 ou fluo-4 présentent un Kd de 230 et 345 nM, respectivement, ce qui leur permet d'être sensibles aux variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  qui est d'environ 150 nM (**Figure 41**).

La sonde rhod-2 a la particularité d'être chargée positivement (**Figure 41**) et de posséder un Kd de 570 nM. De ce fait, cette sonde va être préférentiellement attirée par la mitochondrie dont le potentiel de membrane interne est fortement chargé négativement. La sonde fluo-5N possède un Kd plus élevé de 90  $\mu$ M, ce qui permet à cette sonde de détecter des variations de concentrations calciques plus élevées, comme dans le réticulum endoplasmique. En optimisant les conditions d'incubation de cette sonde (à 37°C, 1 heure), il est alors possible de la concentrer au sein du réticulum endoplasmique et donc d'y mesurer la concentration calcique.



Chacune de ces sondes, une fois excitée à la longueur d'onde appropriée, émet une fluorescence dont l'intensité varie avec la liaison du Ca<sup>2+</sup> à la sonde. Plus la concentration calcique est élevée, plus ce Ca<sup>2+</sup> va se lier aux sondes, modifiant l'intensité de fluorescence émise. Des photomultiplicateurs permettent de transformer l'énergie lumineuse émise par

les sondes en une énergie électrique, détectée par l'ordinateur. L'indo-1, contrairement aux autres sondes utilisées (fluor-4, fluor-5N et rhod-2), présente la particularité d'être ratiométrique (mono excitation, double émission), ce qui permet de mesurer des variations de concentration calciques plus précises et comparables entre elles (en page 87).

#### **4. Les sondes fluorescentes pour la détection d'organites**

Afin de pouvoir visualiser de façon dynamique les différents organites présents au niveau des cellules, des sondes fluorescentes ont été utilisées : MitoTracker® Green, LysoTracker® Red et ER-Tracker™ Blue-White pour visualiser respectivement les mitochondries, lysosomes et le réticulum.

Le MitoTracker Green possède un demi-groupe thiol réactif. Cette sonde va diffuser de façon passive à travers la membrane plasmique et les membranes des organites. Une fois dans les mitochondries, la sonde qui est au départ non fluorescente, va s'oxyder, ce qui lui confère sa fluorescence. Par un processus de conjugaison à des protéines mitochondriales via son groupement thiol, la sonde va alors rester piégée au sein des mitochondries et permettra de visualiser, en direct, leur dynamique (fission et fusion, par exemple).

Le LysoTracker® Red a la capacité de traverser les membranes. A pH neutre, la sonde est faiblement protonée et donc très faiblement fluorescente. Elle a la capacité de s'accumuler préférentiellement dans des organites ovoïdes et à pH acide, tels que les lysosomes où elle devient fortement protonée et fluorescente.

Le ER-Tracker™ Blue-White a la capacité de se fixer aux lipides membranaires avec une haute sélectivité pour le réticulum endoplasmique et marque très faiblement les mitochondries.

#### **5. Electrophysiologie par la technique de patch-clamp**

##### **A. Mesure des courants ioniques en mode voltage imposé**

L'électrophysiologie a été utilisée pour mesurer l'intensité de courants d'ions à travers les membranes cellulaires. La technique du patch clamp repose sur la loi d'ohm :  $U=RI$ .  $R$  représente principalement la résistance de la membrane plasmique. Ainsi, lorsqu'une pipette est placée en configuration cellule attachée (**Figure 42 (1)**), s'il n'y a pas de fuite entre la pipette de verre et la membrane de la cellule, la résistance est maximale (GΩ). Une pipette de verre remplie d'une solution saline connectée à une électrode permet d'imposer le potentiel transmembranaire ( $U$ ). Lorsqu'un canal sous la pipette s'ouvre suite à un stimulus (comme un étirement par exemple), la résistance diminue et un courant d'ions ( $I$ ) se crée à travers ce canal. Ce courant est alors mesuré et visualisé sur l'ordinateur.

L'amplitude du courant  $I$  dépend de la résistance des canaux ouverts et du gradient électrochimique ( $I = (U_{imp} - U_{éq})/R$ ). Le gradient électrochimique est représenté par la différence de potentiel entre le potentiel imposé ( $U_{imp}$ ) et le potentiel d'équilibre de l'ion ( $U_{éq}$ ). Pour chaque ion  $U_{éq}$  est calculé par l'équation de Nernst :  $U_{éq(ion)} = -\frac{RT}{ZF} \times \ln \frac{[ion]_e}{[ion]_i}$ . Dans cette équation  $R$  est la constante des gaz parfaits ( $8,3144621 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$ ),  $T$  est la température en Kelvin,  $F$  est la constante de Faraday ( $96\,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$ ) et  $Z$  est la valence de l'ion. Les ions vont traverser le canal selon leur gradient électrochimique. De façon simplifiée, les ions chargés positivement seront attirés vers l'intérieur de la cellule si le potentiel imposé est plus faible que le potentiel d'équilibre donné par l'équation de Nernst et inversement. Les courants sont mesurés grâce au système d'acquisition (poste Biologic RK400 couplé au logiciel d'acquisition Pclamp10). La jonction entre le milieu extracellulaire et le milieu intrapipette est corrigée électroniquement et les courants capacitifs sont compensés.

Ici, le stimulus permettant d'activer les SAC est un étirement. Pour cela, deux méthodes sont mises en place.

a) L'étirement par une pipette de patch-clamp

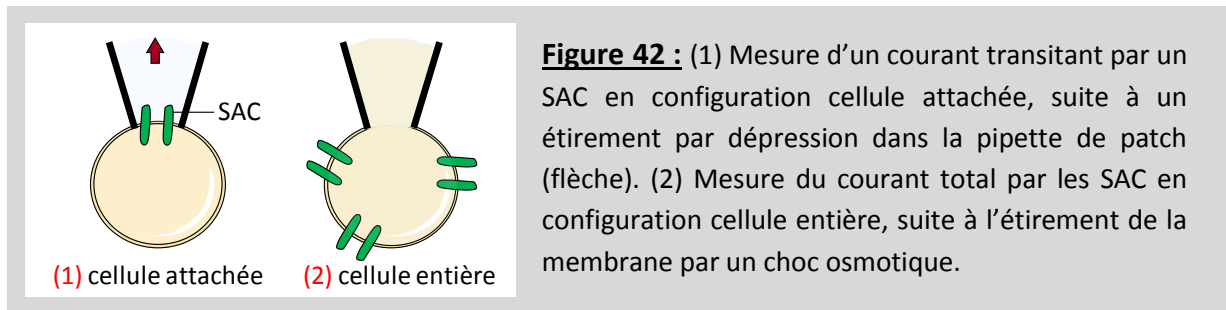
La première consiste à étirer la membrane de la cellule à l'aide de la pipette de patch, en configuration cellule attachée. Pour cette configuration (**Figure 42 (1)**), des étirements de la membrane plasmique sont réalisés à l'aide d'une seringue reliée à la pipette de patch de façon à créer des dépressions qui activeront les SAC (mesurées avec un manomètre). Dans cette configuration (cellule attachée), des pipettes dont la résistance est de  $5 \text{ M}\Omega$  sont utilisées et seuls les enregistrements dont la résistance après le « seal » est supérieure à  $1 \text{ G}\Omega$  sont conservés. Afin de mesurer à la fois les courants entrants et sortants de la cellule, un protocole à deux étapes a été élaboré : à partir d'un potentiel imposé à  $0 \text{ mV}$ , des dépolarisations de  $+80 \text{ mV}$  de la cellule sont effectuées pour mesurer les courants entrants d'ions positifs et des hyperpolarisations de  $-80 \text{ mV}$  pour mesurer les courants sortants d'ions positifs (et inversement pour les ions négatifs). La solution intrapipette utilisée est la solution isotonique qui équivaut au milieu extracellulaire, présentée dans le **Tableau 2**.

b) L'étirement par un choc osmotique

Une deuxième technique qui permet d'activer les SAC a consisté à réaliser des chocs osmotiques sur les cellules. Les cellules sont d'abord placées dans un milieu isotonique ( $310 \text{ mOsmol}$ ), puis sont exposées à une solution hypo-osmotique ( $225 \text{ mOsmol}$ ) grâce à une pipette d'éjection placée à proximité de la cellule grâce à de l'azote comprimé.

Ce choc hypo-osmotique provoque une entrée d'eau dans la cellule, son gonflement et étire ainsi toute sa membrane plasmique (le volume de la cellule augmente de  $15,9 \pm 1,3 \%$  ( $n=30$  cellules)). De cette façon, c'est l'ensemble des SAC de la cellule qui sera activé (**Figure 42 (2)**) (voir le détail des solutions dans le **Tableau 2**).

En configuration cellule entière, des rampes de -80 mV à +80 mV sont effectuées à partir d'un potentiel maintenu à -80 mV, permettant d'apprécier à la fois l'entrée et la sortie d'ions dans les cellules à la suite du choc osmotique. La solution intrapipette utilisée est une solution de KCl (**Tableau 2**).

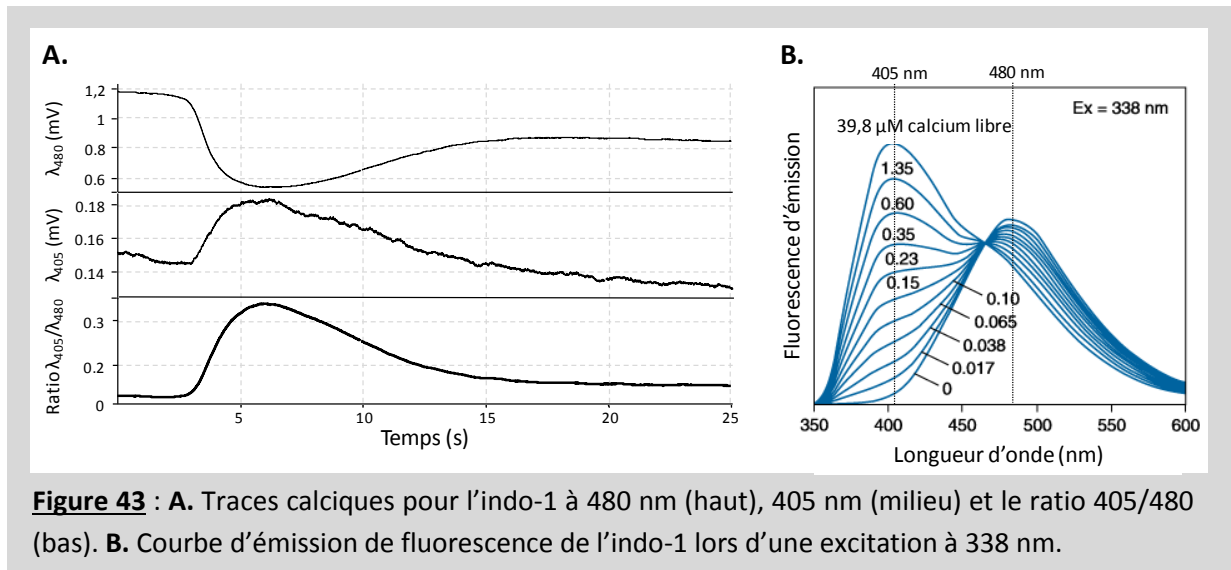


### B. Mesure des variations de potentiel de membrane en mode courant imposé

Si l'on peut mesurer des courants d'ions à travers la membrane plasmique, cela signifie que le potentiel transmembranaire des cellules peut être modifié en conséquence. Afin de mesurer toute modification du potentiel transmembranaire, le poste de patch-clamp est passé en mode « courant imposé », en configuration cellule entière (solution intrapipette de KCl).

## 6. La microspectrofluorimétrie en indo-1 en simultané avec l'électrophysiologie

Si le poste d'électrophysiologie permet de mesurer les courants d'ions et de  $\text{Ca}^{2+}$  traversant la membrane, un moyen d'estimer les variations de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  au sein d'une cellule est d'utiliser en simultané une sonde calcique fluorescente : l'indo-1. Les cellules sont incubées pendant 30 minutes avec la sonde perméante indo-1 AM à 5  $\mu\text{M}$ . Une fois les CML chargées en indo-1, un faisceau d'excitation filtré à 380 nm est dirigé sur les cellules qui vont émettre une fluorescence mesurée à 405 nm et à 480 nm grâce à deux photomultiplicateurs. Ces signaux sont recueillis par un diviseur analogique qui donne en continu le rapport de fluorescence  $R_{\text{fluo}} = \lambda_{405} / \lambda_{480}$  permettant d'estimer la variation globale de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . En effet, lorsque la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  augmente, la fluorescence à 405 nm augmente et celle à 480 nm diminue. Les données sont ensuite recueillies par un logiciel d'acquisition (Pclamp10). L'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  est donnée sous forme du ratio de fluorescence  $\lambda_{405} / \lambda_{480}$  et le  $\Delta$  correspond à la différence entre le niveau de  $\text{Ca}^{2+}$  avant une stimulation (niveau basal) et le pic maximal après la stimulation (**Figure 43**).



**Figure 43** : A. Traces calciques pour l'indo-1 à 480 nm (haut), 405 nm (milieu) et le ratio 405/480 (bas). B. Courbe d'émission de fluorescence de l'indo-1 lors d'une excitation à 338 nm.

## 7. Contraction isométriques

Les AIP de 1<sup>er</sup> ordre sont divisées en petits segments de 1,5-2 mm de diamètre. Ces anneaux artériels sont montés dans un système de cuves à organes isolé contenant une solution iso-osmotique à 302 mOsmol (en mM : NaCl 34 ; KCl 4,7 ; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 ; Glucose 6 ; NaHCO<sub>3</sub> 12 ; MgSO<sub>4</sub> 1,2 ; Mannitol 182) à 37°C bullée avec 15% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub> pour les AIP Ctrl et 9% d'O<sub>2</sub> et 5% de CO<sub>2</sub> pour les AIP de rats HC. Une tension initiale de 0,8 g est appliquée pour les AIP Ctrl et de 1,5 g pour les AIP de rats HC. Les anneaux d'AIP sont laissés au repos pendant 1 h et les cuves sont rincées toutes les 15 min. Ensuite, une stimulation de KCl (80 mM) est appliquée afin de préparer le vaisseau puis lavée 3 fois. Toutes les AIP sont incubées pendant 15 min avant le choc osmotique avec du L-NAME (100  $\mu$ M). Pour les chocs osmotiques une précontraction à la phényléphrine (30  $\mu$ M) est effectuée pendant 5 min pour normaliser la contraction au choc osmotique de 230 mOsmol qui est effectuée en suivant en ajoutant 2 mL d'une solution à 120 mOsmol (sans mannitol) à 3 mL de la solution à 302 mOsmol, dans la cuve.

## 8. Immunofluorescence

Afin d'identifier la localisation des différentes protéines étudiées au cours de cette thèse, des marquages basés sur l'utilisation d'anticorps primaires et secondaires couplés à des fluorochromes sont effectués. Les marquages ont tous été visualisés sur un microscope confocal (Nikon D-Eclipse C1). La microscopie confocale permet de visualiser des objets dans un seul plan focal de 250 nm d'épaisseur, sans être parasité par la fluorescence des plans adjacents inférieurs et supérieurs, grâce à un sténopé (« pinhole » en anglais) qui bloque la lumière émanant des autres régions de l'échantillon. Afin d'obtenir des signaux précis, l'échantillon est balayé par différents lasers dans les directions X, Y et Z.



Les immunofluorescences ont été réalisées sur différents types d'échantillons : sur cellules isolées, sur tissu entier et sur coupes de tissu.

#### A. Immunofluorescence sur cellules isolées

Les cellules sont placées dans une plaque 96 puits à bord noir et fond fin. Après fixation avec 4% de paraformaldéhyde (PFA) à 4°C durant 15 min, perméabilisation et saturation des sites aspécifiques au PBS 1X – Tween-20 0,05% - BSA 4% (PTB 4%) pendant 45 minutes, les CML d'AIP sont incubées toute la nuit à 4°C avec des anticorps primaires (AC I<sup>mR</sup> – voir le **Tableau 3**). L'utilisation du tween-20 est préférable à celle du Triton-X100, plus agressif qui a tendance à trop endommager les membranes cellulaires et les protéines s'y trouvant. Ici, une fixation au PFA est préférable à une fixation au méthanol qui peut lui aussi perturber l'intégrité des membranes. J'ai parfois observé des marquages radicalement différents en fonction d'une fixation au PFA ou au méthanol (comme pour RyR1 ou RyR2, par exemple). Le lendemain, après 2 lavages en PBS 1X, les cellules sont incubées 2 heures à température ambiante avec des anticorps secondaires (AC II<sup>ndR</sup>) couplés à des fluorochromes différents et dirigés contre les AC I<sup>mR</sup> (Alexa 546 dirigé contre les AC I<sup>mR</sup> de lapin et Alexa 488 dirigé contre les AC I<sup>mR</sup> de souris, 1/200<sup>ème</sup>, Invitrogen). Pour les contrôles négatifs, l'anticorps primaire n'est pas appliqué. Lors des expériences de co-marquages, une réincubation avec les AC I<sup>mR</sup> est effectuée la nuit à 4°C, suivie d'une incubation avec les AC II<sup>ndR</sup> appropriés le lendemain. À la suite de cela, 2 lavages en PBS 1X sont opérés puis les noyaux sont marqués au DAPI (0,2 µg/mL, Sigma-Aldrich) pendant 5 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées au PBS 1X et imagées directement avec la plaque 96-puits sur l'objectif à immersion à huile X60 d'un microscope confocal inversé (Nikon D-Eclipse C1). L'acquisition des images est réalisée avec le logiciel EZ-C1 3.91.

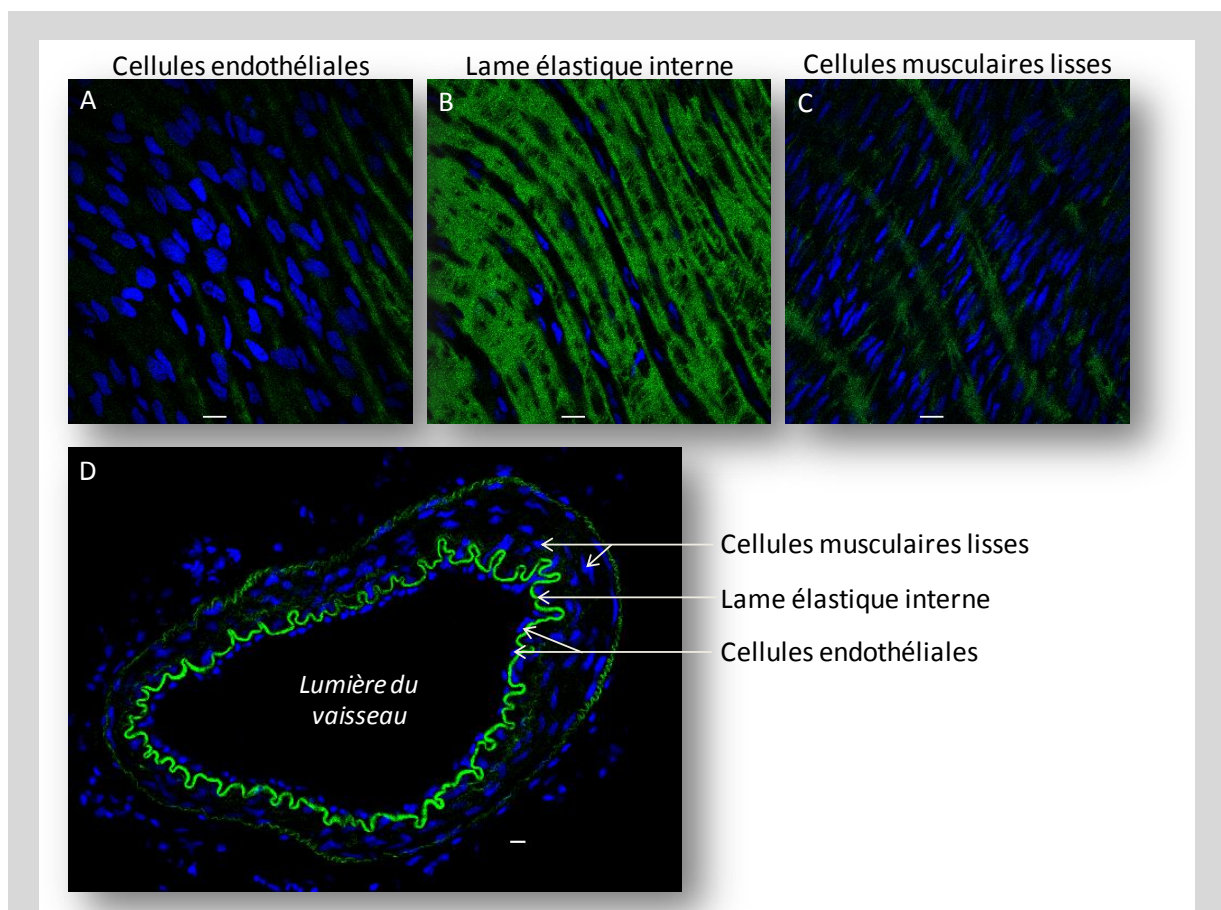
#### B. Immunofluorescence sur artère entière en « en face »

Les artères sont disséquées puis directement incubées 30 minutes dans du PTB 4% additionné d'acide pluronique (1 µM) qui facilitera l'entrée ultérieure des anticorps. Après cette étape de blocage/saturation des sites aspécifiques, les artères sont incubées toute la nuit à 37°C dans des tubes fermés contenant les AC I<sup>mR</sup> dans du PTB 4% + ac. pluronique. Cette opération se fait à 37°C car à ce stade, les artères sont non fixées. La fixation préalable ne permet pas la pénétration des anticorps jusque dans les couches de CML, c'est pour cette raison que les AC I<sup>mR</sup> sont incubés à 37°C en présence d'ac. pluronique. Le lendemain, après 2 rinçages en PBS 1X, les artères sont fixées 15 min au PFA 4% à température ambiante, sous agitation rotative. Après 2 lavages en PBS 1X, le tissu est incubé avec les AC II<sup>ndR</sup> appropriés (1/200<sup>ème</sup>) pendant 2 heures à 37°C. L'excès d'anticorps est éliminé par 2 rinçages au PBS 1X puis les artères sont incubées 10 min dans du hoechst (1/500<sup>ème</sup> – Sigma –Aldrich) qui permet de marquer les noyaux en bleu. Le hoechst, contrairement au DAPI, pénètre plus facilement dans les couches cellulaires des vaisseaux. Les artères sont ouvertes longitudinalement et placées à plat en « en face » entre deux lamelles de verre et du liquide



de montage (Dako fluorescent mounting medium). Les images sont acquises au microscope confocal (Nikon D-Eclipse C1).

→ Les premières cellules observées en « en face » sont les cellules endothéliales. Elles forment une monocouche dont les noyaux sont ovoïdes, d'environ 10  $\mu\text{m}$  (**Figure 44A**). Elles présentent une forte expression de la connexine 43 (Cx 43), de la eNOS (principalement en sous-membranaire et associée à l'appareil de Golgi) et sécrètent du vWF. Lorsque l'on remonte dans la préparation, apparaît alors la couche de limitante élastique interne qui autofluoresce en vert due à la présence de collagène (**Figure 44B**). Cette lame élastique, fortement repliée, possède des fenêtres qui permettent le contact et la jonction entre CE et CML. En surface de la limitante élastique apparaissent les cellules musculaires lisses (**Figure 44C**). Les noyaux sont plus petits, fins et sont disposés de manière perpendiculaire à ceux des cellules endothéliales sous-jacentes.



**Figure 44 :** Artère intrapulmonaire (A, B et C) en « en face » sur une même artère en faisant varier la hauteur (z) : **A.** cellules endothéliales. **B.** lame élastique interne qui autofluoresce en vert. **C.** cellules musculaires lisses aux noyaux perpendiculaires à ceux des cellules endothéliales. **D.** Coupe transversale de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur d'une AIP. Les noyaux sont marqués en bleu. Échelle : 10  $\mu\text{m}$ .

### C. Immunofluorescence sur coupes d'artères

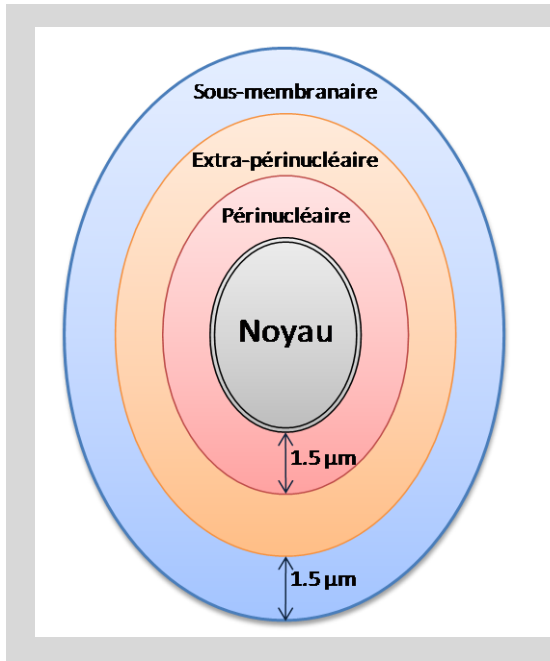
Les artères sont disséquées puis immédiatement fixées au PFA 4% pendant 15 min, sous agitation rotative. Après 2 rinçages au PBS 1X, les artères sont incluses dans de l'OCT (optimal cutting temperature compound) et le tout est placé à -20°C pour que l'OCT congèle avec l'artère en son centre. Des coupes d'artères de 10 µm d'épaisseur sont ensuite réalisées au cryostat (Leica) sur des lames Ultra Plus Super Frost. Plus les coupes sont fines et sans replis, plus les marquages seront uniformes. Après 2 heures de séchage des lames à 40°C pour permettre à l'excès d'OCT de s'évaporer, les coupes sont entourées d'un « cercle magique » au Dako Pen puis incubées 5 min dans du SDS 1% afin de démasquer les épitopes des protéines d'intérêt (300 µL/lame, pas davantage, sinon le cercle se casse). Après 2 rinçages au PBS 1X, les coupes sont incubées dans du PTB 3% pendant 45 min afin de perméabiliser/saturer les sites aspécifiques. Les lames sont ensuite incubées toute la nuit à 4°C avec les AC I<sup>mR</sup> dans une chambre humide pour éviter toute évaporation d'anticorps. Le lendemain, après 2 rinçages au PBS 1X, les coupes sont incubées avec les AC II<sup>ndR</sup> couplés à un Alexa 546 (1/200<sup>ème</sup>) pendant 2 heures à température ambiante puis rincées de nouveau avant d'être incubées 5 min au hoechst. Le montage avec une contre-lamelle s'effectue au Dako fluorescent mounting medium. Les lames sont observées au microscope confocal (Nikon).

→ Les artères possèdent une autofluorescence verte de la lame élastique interne qui forme de nombreux replis. Cette lame élastique permet de se repérer et de distinguer les cellules endothéliales du côté de la lumière du vaisseau, des cellules musculaires lisses sous-jacentes (**Figure 44D**).

## 9. Analyse de la distribution et de la colocalisation des protéines

Afin de déterminer précisément la localisation des différentes protéines étudiées par immunomarquage, les cellules ont été divisées en 3 surfaces distinctes : une zone périnucléaire à 1,5 µm autour du noyau, une zone sous-membranaire à 1,5 µm sous la membrane plasmique et une zone extra-périnucléaire se situant entre les deux premières zones (**Figure 45**)<sup>18</sup>. Lorsque le noyau est proche de la membrane plasmique, cette zone à la fois périnucléaire et sous-membranaire est exclue de l'analyse. Avec le logiciel NIS-Elements, l'intensité de fluorescence dans chaque zone est quantifiée puis normalisée par rapport à l'intensité de fluorescence totale de la cellule, comme un ratio.

De même, pour l'analyse de la colocalisation entre protéines, le coefficient de Pearson a été déterminé grâce au logiciel NIS-Elements. La colocalisation a été validée lorsque le coefficient est supérieur à 0,80 dans toutes les cellules testées.



**Figure 45 :** Zones d'analyse au sein d'une cellule. Trois zones sont définies : une zone sous-membranaire à 1,5 µm sous la membrane plasmique (en bleu). Une zone périnucléaire à 1,5 µm autour du noyau (en rouge). Une zone entre ces deux précédentes appelée extra-périnucléaire.

## 10. Western blot (WB)

Le Western blot permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire et d'apprécier leur expression relative dans différentes conditions. La majeure partie des protéines étudiées ici sont des protéines de haut poids moléculaire (telles que les RyR ~565 kDa ou Piezo1 ~290 kDa). Cependant, afin de normaliser les résultats, la  $\beta$ -actine, de bas poids moléculaire (~42 kDa), est aussi nécessaire. Il a donc fallu réaliser des gels gradients de 3-15% pour séparer sur un même gel les protéines de haut et de bas poids moléculaire.

Les tissus (cœur, cerveau, muscle, artères) sont disséqués et homogénéisés dans un potter placé dans de la glace, dans du tampon d'extraction (5 mM tris-HCl pH=7,5 ; 100 mM NaCl ; 0.5 mM EDTA ; 5 mM orthovanate de sodium ; 1% déoxycholate de sodium ; 1% triton X-100 ; 1% NP-40 ; 1% SDS ; 1% inhibiteurs de protéases ; q.s.p. PBS 1X), pendant 10 minutes. Après homogénéisation des tissus, le surnageant est centrifugé 6 min à 4°C à 10 000 G afin d'éliminer les débris cellulaires restants. La quantité totale de protéines dans le surnageant est ensuite dosée selon le protocole de Lowry (kit Bio-rad).

Pour l'électrophorèse, les échantillons sont repris dans du tampon de charge dénaturant 5X (312 mM tris-HCl pH=8.8 ; 5% SDS ; 125 mM DTT ; 0.5 mM EDTA ; 12.5% glycérol ; 0.005% bleu de bromophénol ; q.s.p. H<sub>2</sub>O), puis chauffés pendant 5 min à 90°C afin de dénaturer les protéines. Ensuite, 20 à 50 µg de protéines sont déposés dans les puits et mises à migrer dans un gel gradient de tris-acétate de 3-15% d'acrylamide/bisacrylamide, pendant 1h15, dans du tampon tris-tricine contenant du sodium bisulfite. Le tris-acétate permet une meilleure détection des protéines de haut poids moléculaire et le sodium bisulfite permet au tout de rester dans un milieu réducteur, ce qui conserve mieux les protéines dans le gel.

Le pourcentage d'acrylamide est important pour la formation du gel. Ainsi, pour séparer des protéines de moyen et haut poids moléculaire (au dessus de 50 kDa), il est préférable d'utiliser un ratio 37,5/1 d'acrylamide/bisacrylamide. Ce ratio permettra d'avoir un maillage plus lâche et une meilleure diffusion des grosses protéines dans le gel. A l'inverse, pour les protéines de bas poids moléculaire (en dessous de 50 kDa), une solution de 29/1 d'acrylamide/bisacrylamide permettra d'obtenir un maillage plus resserré et ainsi une meilleure résolution (des bandes plus fines, une meilleure séparation des protéines phosphorylées,...).

Après la migration, les protéines sont transférées en liquide (tampon tris-bicine contenant du sodium bisulfite, de l'EDTA et 10% d'éthanol) sur une membrane de PVDF pendant 19 heures à 40 V puis 1 heure à 140 V, à 4°C. Les protéines de haut poids moléculaire ont plus de difficulté à être transférées sur la membrane. C'est pour cette raison que le transfert s'effectue sur un temps long de 19 heures à faible voltage. Ce temps est optimal pour le transfert de protéines de plus de 200 kDa. De plus, l'utilisation de seulement 10% d'éthanol (au lieu de 20%) évite au haut du gel qui est plus fin de se déshydrater, pouvant entraîner une perte d'information.

La membrane est ensuite saturée pendant 30 min dans 2% de lait demi-écrémé (Régilait) dilué dans du PBS 1X – Tween-20 0,05%. La quantité de lait nécessaire au blocage va dépendre de l'affinité de l'anticorps. Ainsi, plus on augmente la concentration de lait, plus la membrane va être saturée, y compris les sites de fixation de l'anticorps. Un anticorps qui aura une faible affinité pour son épitope nécessitera un blocage dans moins de lait (2%) qu'un anticorps très affin (5%). Après cette étape, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires (**Tableau 3**) dilués dans du lait 2%. Le lendemain, après 3 rinçages de 5 min chacun au PBS 1X – Tween-20 0,05%, la membrane est incubée avec les anticorps secondaires appropriés couplés à la peroxydase (HRP, au 1/10 000<sup>ème</sup> - Biorad), pendant 2 heures à température ambiante. Après 3 lavages de 5 min chacun, les protéines d'intérêt sont détectées par chimioluminescence (kit Millipore) grâce à une caméra Fujifilm LAS-3000.

Anticorps	Lot et fournisseur	Dilution en IF	Dilution en WB	Poids moléculaire
RyR1	XA7B6 – Millipore	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	565 kDa
RyR2	ARR-002 - Alomone labs	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	562 kDa
RyR3	ARR-003 - Alomone labs	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	551 kDa
Serca2a	fourni par le Dr. Regis Bobe (INSERM U689 - Hôpital Lariboisière, Paris, France)	1/200 <sup>ème</sup>	1/3000 <sup>ème</sup>	109 kDa
Serca2b		1/200 <sup>ème</sup>	1/3000 <sup>ème</sup>	115 kDa
Serca3a		1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	109 kDa
Serca3bc		1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	114 kDa
Cav-1 [7C8]	ab37141 – abcam	1/500 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	19 et 22 kDa

$\alpha$ -SMA	A5228 - Sigma Aldrich	1/500 <sup>ème</sup>	-	42 kDa
Calponine	sc-28545 – Santacruz B.	1/50 <sup>ème</sup>	-	33 kDa
$\beta$ -actine	A5316 – Sigma Aldrich	-	1/25000 <sup>ème</sup>	42 kDa
Piezo1 PT	15939-1-AP - Proteintech	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	290 kDa
vWF	AB7356 – Millipore	1/500 <sup>ème</sup>	-	309 kDa
eNOS	610296 – BD Bioscience	1/200 <sup>ème</sup>	1/1000 <sup>ème</sup>	133 kDa

**Tableau 3** : Résumé des anticorps utilisés pour l'immunofluorescence (IF) et le western blot (WB).

### 11. Les différents inhibiteurs utilisés

Afin de comprendre le rôle des différents récepteurs et pompes présents à la surface et au sein des cellules, ceux-ci sont inhibés par différents agents pharmacologiques sélectifs pour chacun d'eux. Les RyR sont bloqués par de fortes concentrations en ryanodine (100  $\mu$ M) et plus sélectivement, les RyR-1 et RyR-3 avec 10  $\mu$ M de dantrolène. Les IP<sub>3</sub>R sont inhibés par 1  $\mu$ M de xestospongine C. Les SERCA2a et SERCA2b sont bloquées par 1  $\mu$ M de thapsigargine (TG) et 10  $\mu$ M d'acide cyclopiazonique (CPA), respectivement. Les SERCA3 sont inhibées par du tBHQ (10  $\mu$ M). Les canaux calciques présents à la surface des lysosomes sont bloqués par du Ned-19 (100  $\mu$ M). Les cavéoles sont déstructurées en enlevant le cholestérol des membranes par de la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD, 5 mM). Les SAC sont bloqués par la toxine GsMTx-4 qui s'insère dans les membranes et maintient ces canaux dans un état fermé ; les BK<sub>Ca</sub> sont bloqués sélectivement par de l'ibériotoxine (IbTx à 1  $\mu$ M). Toutes ces drogues sont appliquées au moins 15 min avant les enregistrements, sauf la ryanodine qui est incubée 30 min et la M $\beta$ CD 1 heure avant à 37°C.

### 12. Tests statistiques

Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur standard de la moyenne. Chaque expérience a été répétée plusieurs fois (le n sur chaque histogramme indique le nombre de cellules testées pour chaque condition et N le nombre de rats utilisés). Pour comparer plusieurs échantillons indépendants (supérieurs à deux), des tests non paramétriques (Kruskal-Wallis) et paramétrique ANOVA ont été utilisés, suivi d'un test post-hoc de Dunnet. Des tests de Student (paramétrique) ou de Mann-Whitney (non paramétrique) ont également permis de comparer deux échantillons indépendants entre eux. Les différences sont considérées comme statistiquement significative lorsque  $P < 0,05$ .

# RÉSULTATS ET DISCUSSION



## Étude des voies de signalisation calciques induites par l'étirement dans les CML d'AIP

Alors que dans l'AIP le tonus myogénique a été préalablement décrit sur des vaisseaux entiers, les voies de signalisations calciques induites par l'étirement ne sont pas connues au niveau cellulaire. Il est certain que l'influx de  $Ca^{2+}$  par les SAC contribue à l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  induite par l'étirement mais qu'en est-il des réserves calciques intracellulaires ? Quel est l'impact d'un étirement sur l'activité des SAC et le potentiel transmembranaire ? Comment l'organisation des réserves calciques intracellulaires, des différentes isoformes de RyR et de SERCA dans les CML d'AIP permet d'amplifier un stimulus mécanique (étirement) ou hormonal (ET-1) de façon spécifique ? Et enfin, quelles sont les modifications de ces voies de signalisations dans l'hypertension pulmonaire ?

Cette première partie de résultats permettra d'apporter des éléments de réponse à ces questions. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article paru le 15 Juillet 2014 dans **Cardiovascular Research**.

**« STRETCH-INDUCED  $Ca^{2+}$  SIGNALLING IN VASCULAR SMOOTH MUSCLE CELLS DEPENDS ON  $Ca^{2+}$  STORE SEGREGATION »**

**Guillaume Gilbert**, Thomas Ducret, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau et Jean-François Quignard



**ABSTRACT**

**Aims:** Calcium is a key second messenger that can be mobilized from both the extracellular medium and intracellular calcium stores. Pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) respond to stretch by a calcium increase, a mechanism enhanced during pulmonary hypertension (PH). We investigated the role of the spatial organization between plasma membrane stretch-activated channels (SAC) and intracellular calcium stores (sarcoplasmic reticulum (SR), mitochondria and lysosomes) in response to stretch.

**Methods and Results:** Studies were performed in freshly isolated PASMC from both control and two different rat models of PH (chronically hypoxic and monocrotaline-treated rats). Co-immunolabellings revealed that the subcellular segregation between each subtype of SR ryanodine receptors (RyR1, RyR2 and RyR3), SERCA2 pumps (SERCA2a and SERCA2b), mitochondria or lysosomes in freshly isolated PASMC, differs from control and PH PASMC. In control PASMC, stretching the membrane activates a Ca<sup>2+</sup> influx through SAC. This influx is amplified by cell hyperpolarization, a calcium release by subplasmalemmal RyR1 and is then buffered by mitochondria. In two different PH rats models, the calcium response to stretch is enhanced due to hyper-reactivity of SAC and a greater calcium amplification by all RyR subtypes.

**Conclusions:** The spatial organization of RyR and calcium stores in PASMC is important for cell signaling and plays a causal role in PH.

## **INTRODUCTION**

The pulmonary circulation is involved in the control of the blood oxygenation by the lung. Characterized by a low pressure and high flow, the tone of this circulation is controlled by variations in the intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) within *media* pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC)<sup>380, 381</sup>. Whereas signaling pathways in response to hormonal stimuli like endothelin-1 (ET-1) are relatively well described in intrapulmonary arteries (IPA)<sup>289</sup>, much less is known regarding calcium signaling pathways triggered by the mechanical forces developed by the blood flow<sup>382</sup>. Yet, an increase in blood pressure is felt by SMC and induces their contraction, a phenomenon called myogenic tone<sup>383</sup>. The latter is counteracted in IPA by phenomena such as vessel recruitment and distensibility in order to maintain a low value of pressure. However, under pathological conditions such as pulmonary hypertension (PH), the myogenic tone is increased and unmasked<sup>3</sup>, maybe underlying different cellular signaling pathways.

While in IPA the myogenic tone mechanism was previously described in vessels<sup>3</sup>, little is known about calcium signaling pathways induced by stretch at the cellular level. Plasma membrane stretch-activated channels (SAC) are able to transduce the mechanical signal of stretch into a contractile response since their activation allows a calcium influx from the extracellular medium to the cytosol<sup>3, 41, 384</sup>. Although calcium influx through SAC undoubtedly contributes to the stretch-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase and thus vessel contraction, we hypothesize that intracellular calcium stores in PASMC could also be involved in this  $[Ca^{2+}]_i$  rise by a mechanism of calcium amplification. PASMC display a specific intracellular organization of calcium stores and protein partners with segregated mitochondria, lysosomes and proteins of the sarcoplasmic reticulum (SR). Calcium trafficking linked to SR stores is controlled by different proteins of the SR membrane: calcium release channels like ryanodine receptors (RyR1, RyR2 and RyR3) and IP3 receptors (IP3R) as well as Sarco/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase pumps (SERCA2a and SERCA2b) that re-uptake calcium into the SR<sup>210, 213, 273, 381, 385</sup>. This segregation supports specific signaling pathways as described for the ET-1 calcium response<sup>240, 256, 257</sup>.

In this study, we investigate how the spatial organization of calcium stores is important for cell signaling pathways in response to a mechanical stimulus e.g. stretch. Furthermore, we examine whether this signaling pathway is altered during pulmonary hypertension (PH) by using two classical animal models which mimic human PH<sup>386</sup>: (1) the chronically hypoxic rat that leads to PH with similar properties to human hypoxic PH and (2) the monocrotaline-treated rat that leads to a severe PH.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animal models**

Wistar male rats were bred in agreement with the Local Animal Care Ethics Committee (Comité d'Éthique Régional d'Aquitaine – referenced AP 2/11/2005). 200-350 g rats were randomly assigned into 3 groups: normoxic rats (Nx) were housed in ambient room air, chronically hypoxic rats (CH) were exposed three weeks in a hypobaric chamber (50 kPa) and monocrotaline rats (MCT) were intraperitoneally injected with 60 mg/kg of MCT. For experiments, rats were euthanized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (190 mg/kg).

### **PASMC isolation, electrophysiological recordings and microspectrofluorimetric measurement of $[Ca^{2+}]_i$**

PASMC were obtained by enzymatic dissociation of *media* as previously described<sup>3</sup>. Voltage-clamp and current-clamp recordings were made with a standard patch-clamp technique, coupled to a microspectrofluorimetric indo-1 setup. Cells were bathed in the 310 mOsmol solution. The  $Ca^{2+}$ -sensitive fluorescent probe indo-1 was used to record changes in  $[Ca^{2+}]_i$  in cells. Mechanical stretch was performed by applying to the back end of the patch pipette a negative pressure of -40 mmHg by suction<sup>3</sup> or by an osmotic shock with a hypo-osmotic 225 mOsmol solution (Supplementary Table 1).

### **Fluorescence confocal imaging**

In real-time fluorescence imaging, fluo-4/AM (2  $\mu$ M), rhod-2/AM (1  $\mu$ M) and fluo-5N/AM (10  $\mu$ M) probes were used for measuring cytosolic ( $[Ca^{2+}]_i$ ), mitochondrial ( $[Ca^{2+}]_m$ ) and reticulum ( $[Ca^{2+}]_{SR}$ ) calcium, respectively. An osmotic shock of 225 mOsmol was performed to induce stretch. MitoTracker<sup>®</sup> Green FM (2  $\mu$ M), LysoTracker<sup>®</sup> Red DND-90 (100 nM) and ER-Tracker<sup>™</sup> Blue-White DPX (5  $\mu$ M) were incubated in live cells for visualizing mitochondria, lysosomes and sarcoplasmic reticulum, respectively. PASMC were observed under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope.

### **Analysis of fluorescent labeling**

For analysis, cells were subdivided into two defined areas that exclude the DAPI labeled nucleus: the subplasmalemmal area [S] of 1.5  $\mu$ m under the plasma membrane and the perinuclear area [P] within 1.5  $\mu$ m of the DAPI nucleus, as previously described<sup>18</sup>. When the nucleus was located close to the plasma membrane, this perinuclear/subplasmalemmal area was not analyzed. For co-immunostaining, Pearson's coefficient was used to determine the colocalization level with the Nis-Elements software. The colocalization was validated when the coefficient was >0.80 in all tested cells (Supplementary S7).

### **Data and statistical analysis**

Results are expressed as mean  $\pm$  standard error of mean (s.e.m). Statistical analysis is performed on cells (the number *n* of tested responsive cells is indicated in each bar graph figure). *N* indicated the number of rats used for each experiment. ANOVA test were performed to determine a statistical difference, differences with  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$  were considered significant. A Student's *t* test was performed for Figure 2D and a two-way ANOVA for Figure 5 and 6D. All statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad).

## **RESULTS**

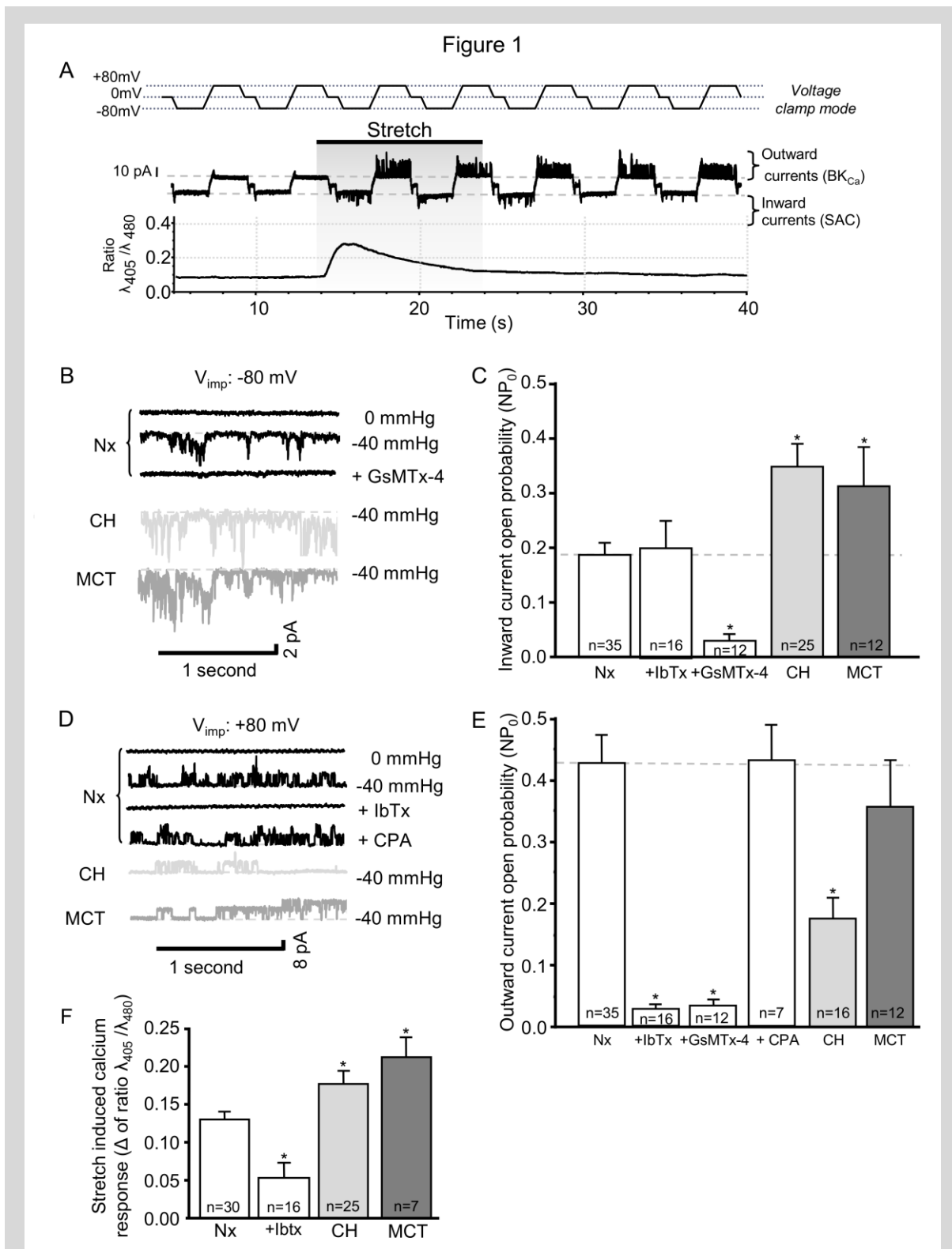
### **A calcium influx through SAC activates BK<sub>Ca</sub> channels in PASMCM from normoxic rats.**

In a cell-attached configuration, a stretch was induced by a negative pressure of -40 mmHg applied *via* the patch-clamp pipette, to the plasma membrane of freshly isolated PASMCM from normoxic rats (Nx-PASMCM). At -80 mV, a stretch induced a small inward unitary current (Figure 1A-B) that was blocked by the specific SAC blocker GsMTx-4 (5  $\mu$ M) (Figure 1B-C). Several SAC were present under the patch-clamp pipette and thus multiple inward currents were recorded in the same time. At +80 mV, together with the SAC current, a large unitary outward current was recorded (Figure 1A-D), inhibited by Iberiotoxin (IbTx, 1  $\mu$ M), a specific inhibitor of large conductance calcium-activated potassium channels (BK<sub>Ca</sub> channels) (Figure 1D-E). In absence of extracellular calcium, a stretch only activated SAC currents but not BK<sub>Ca</sub> currents (supplementary S1) pointing out that BK<sub>Ca</sub> channels were not directly activated by stretch but by the calcium influx through SAC.

Simultaneously with patch clamp, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> variations in cells were estimated with the indo-1/AM calcium probe. A membrane stretch induced a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase which was concomitant with SAC and BK<sub>Ca</sub> activities (Figure 1A, bottom). This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase was reduced in the presence of IbTx (Figure 1F) and abolished in absence of extracellular calcium (Supplementary S1). Altogether, these data suggest that a stretch induces a calcium influx through SAC which, in turns, directly activates BK<sub>Ca</sub> channels since a depletion of internal calcium stores with cyclopiazonic acid (CPA, 10  $\mu$ M), a SERCA inhibitor, did not alter BK<sub>Ca</sub> activity observed after a stretch (Figure 1D-E).

### **Alteration of SAC and BK<sub>Ca</sub> channels activities in PASMCM from PH rats.**

When the same stretch was applied in CH or MCT-PASMCM the SAC current was enhanced in comparison with that observed in Nx-PASMCM (Figure 1B-C). By contrast, BK<sub>Ca</sub> current was reduced in CH-PASMCM but unchanged in MCT-PASMCM (Figure 1D-E). The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase observed after a stretch was greater in PASMCM from PH rats than in Nx ones (Figure 1F). This may suggest that PASMCM from PH rats, present a hyper-reactivity to stretch. Same results were obtained by measuring whole-cell currents after an osmotic shock of 225 mOsmol (Supplementary S2), a common used protocol used for stretch cells.



**Figure 1. A calcium influx through SAC activates BK<sub>Ca</sub> channels in Nx and PH PASM.** Stretch is applied by a depression of -40 mmHg in a patch clamp pipette in a cell-attached configuration. **A. Top:** Voltage clamp protocol. **Middle:** In a Nx- PASM, in a cell-attached configuration, a stretch induces inward currents (through SAC at -80 mV) followed by outward currents (through BK<sub>Ca</sub> channels at +80 mV). **Bottom:** Simultaneously, the stretch induces a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase. **B and D.** Example of unitary inward (**B**) and outward currents (**D**) before and after a stretch in Nx, CH and MCT PASM, in absence or presence of GsMTx-4 (5  $\mu$ M), IbTx (1  $\mu$ M) or CPA (10  $\mu$ M). **C and E.** Summary of the open probability of unitary inward (**C**, N=3-5) and outward currents (**E**, N=3-5), after a stretch. **F.** Amplitude of the calcium peak induced by a stretch is enhanced in CH or MCT PASM as compared to Nx ones (N=3-5). \* indicates a significative difference for p < 0.05 with the Nx condition.

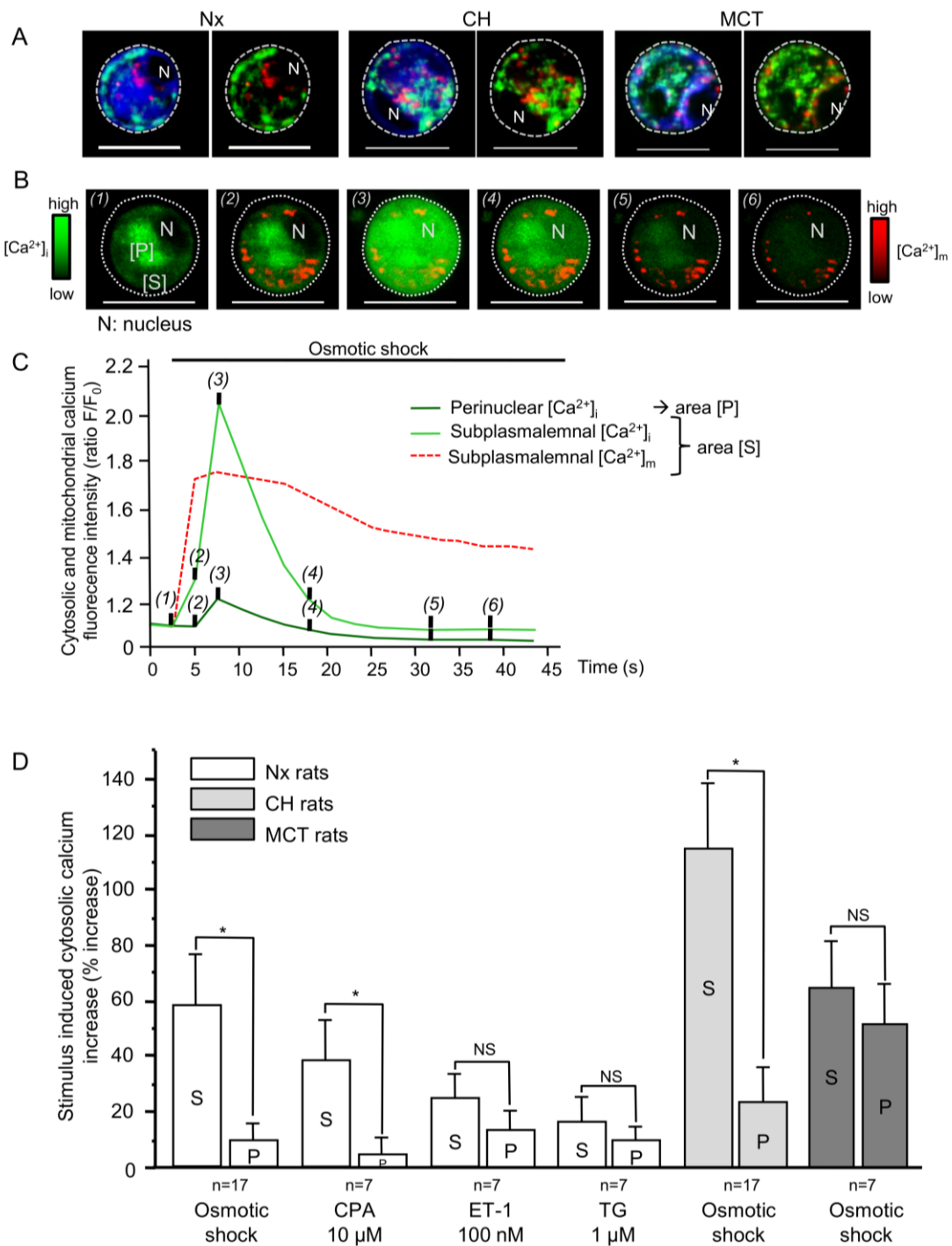
The activation of BK<sub>Ca</sub> channels by an osmotic shock hyperpolarized the plasma membrane potential of Nx-PASMC. This cellular hyperpolarization was reduced in CH-PASMC in accordance with the reduced activity of BK<sub>Ca</sub> channels previously observed (Figures 1E) but unchanged in MCT-PASMC (Supplementary S3).

### **Sarcoplasmic reticulum calcium stores are involved in the stretch-induced calcium response.**

We further studied the involvement of intracellular calcium stores in stretch-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase. Firstly, we examined the subcellular segregation of each calcium stores using live fluorescent probes. In Nx-PASMC, whereas the SR was distributed in the whole cell area (in blue), mitochondria (in green) were present in a subplasmalemmal area and lysosomes (in red) were mostly present around the nucleus (N), forming two distinct clusters (Figure 2A). By contrast, in PH-PASMC, mitochondria and lysosomes are distributed both in subplasmalemmal and perinuclear areas (Figure 2A).

Secondly, real-time fluorescence imaging for [Ca<sup>2+</sup>] in the cytosol ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) and mitochondria ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub>) was measured by a confocal microscope using fluo-4/AM and rhod-2/AM (Supplementary S4), respectively. [Ca<sup>2+</sup>] increases were measured in two distinct areas: subplasmalemmal ([S]) and perinuclear ([P]) (Figure 2B). In Nx-PASMC, a stretch induced by an osmotic shock (225 mOsmol solution) increased [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> of 58 ± 18% in the subplasmalemmal area which was followed by a minor perinuclear calcium increase of 10 ± 6% (Figure 2D and Supplementary S4B). Simultaneously with the cytosolic calcium rise, the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> was increased in subplasmalemmal mitochondria (Figure 2B-C). This indicates that mitochondria do not participate to the stretch-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> rise but rather buffer it.

Thirdly, in order to investigate the implication of the SR calcium in the stretch-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> variations was measured with the ratiometric calcium probe indo-1/AM. An osmotic shock induced a rapid calcium increase in Nx-PASMC (Figure 3A). This [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response was strongly reduced by GsMTx-4 (5 μM) and completely abolished in absence of extracellular calcium (Figure 3B). Ryanodine (an inhibitor of all RyR subtypes, 100 μM) and dantrolene (RyR1 and RyR3 antagonist<sup>14</sup>, 10 μM) (Figure 3A-B) reduced osmotic-shock induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase of 24%. By contrast, the calcium response to an osmotic shock remained unaffected in presence of the IP<sub>3</sub> receptor (IP<sub>3</sub>R) antagonist xestospongin C (1 μM) or L-type voltage gated calcium channel (VGCC) inhibitor nifedipine (1 μM) (Figure 3B). Likewise, lysosomes are not implicated in this calcium response since blockade of lysosomal calcium channels with trans-Ned-19<sup>268, 269</sup> (100 μM) did not modify the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> response (Figure 3B). These data indicate that RyR, and, more precisely, RyR1 or RyR3 of the SR, are implicated in the stretch-induced [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase *via* a calcium-induced calcium release mechanism (CICR) initiated by the calcium influx through SAC.



**Figure 2. Osmotic shocks increase  $[Ca^{2+}]_i$  in a subplasmalemmal area which is buffered by subplasmalemmal mitochondria.** **A.** Mitochondria, lysosomes and sarcoplasmic reticulum are stained in green, red and blue, respectively. In Nx- PASM, mitochondria are present in a subplasmalemmal area whereas lysosomes are mostly present around the nucleus. In CH or MCT-PASM, mitochondria and lysosomes are distributed in the whole cell area. N indicates nuclei locations. Scale bar: 10  $\mu$ m. **B.** Panel series of images of fluo-4/AM ( $[Ca^{2+}]_i$  in green) and rhod-2/AM (mitochondrial calcium ( $[Ca^{2+}]_m$ ) in red) recorded in an isolated CH-PASM after an osmotic shock of 225 mOsmol at the confocal microscope. N indicates the nucleus, [S] the subplasmalemmal calcium area and [P] the perinuclear calcium area. **C.** Curve representing the  $[Ca^{2+}]_i$  and  $[Ca^{2+}]_m$  as the ratio  $F/F_0$ , during time. **D.** Summary of the amplitude of the calcium peak observed in Nx (N=4-8), CH (N=5) and MCT (N=5) rat PASM subplasmalemmal (S) and perinuclear (P) areas. Osmotic shocks in Nx and CH PASM or an acute application of CPA (10  $\mu$ M, 20 sec) induce a greater  $[Ca^{2+}]_i$  in the subplasmalemmal area than in the perinuclear one. An acute application of ET-1 (100 nM, 20 sec), TG (1  $\mu$ M, 20 sec) or osmotic shocks in MCT PASM induce a calcium rise simultaneously and in equal concentration in the whole cell (both S and P areas). \* indicates a significant difference for  $p < 0.05$  between the subplasmalemmal and perinuclear areas. NS: non significant.



### **Calcium amplification by SR is enhanced in MCT but not in CH-PASMC.**

In PH rats, the calcium response to an osmotic shock was higher in both CH and MCT rats; and even higher in MCT rats than in CH rats (Figure 3D-F). As for Nx-PASMC, calcium responses in PH-PASMC were reduced by GsMTx-4, ryanodine and dantrolene but also by xestospongine C (Figure 3D-F). Furthermore, RyR's and IP<sub>3</sub>R's antagonists reduced the calcium response by 28% in CH-PASMC but by 62% in MCT-PASMC, whereas it was reduced by 24% in Nx-PASMC (Figure 3). These data indicate that amplification by RyR and IP<sub>3</sub>R is more important in PASMC from MCT rats, than from CH or Nx rats. In accordance with this greater calcium amplification by SR observed in MCT-PASMC (Figure 3F), an osmotic shock induced a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase both in subplasmalemmal and perinuclear areas (64 ± 16% and 52 ± 14%, respectively) (Figure 2D and Supplementary S4C). By contrast, in CH-PASMC, the [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increased by 117 ± 23% in a subplasmalemmal area was followed by a perinuclear increase by 23 ± 13% (Figure 2B-C-D). As observed for Nx rats, [Ca<sup>2+</sup>]<sub>m</sub> increased after an osmotic shock in PH-PASMC (Figure 2C and Supplementary S4C).

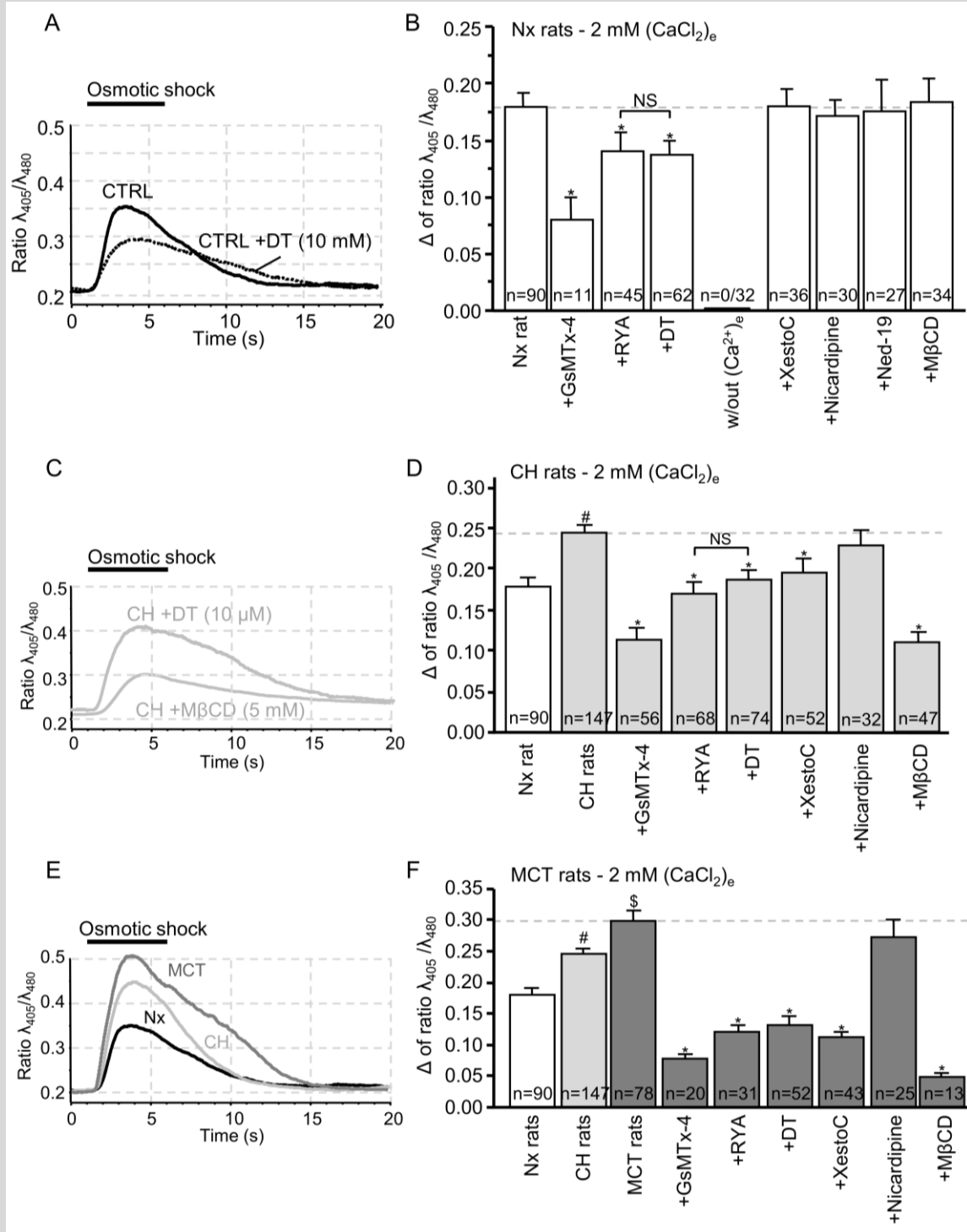
### **RyR and SERCA2 pumps are segregated in PASMC from normoxic and PH rats.**

To better understand the involvement of RyR subtypes in local calcium variations observed after an osmotic shock, we examined their subcellular segregation in freshly isolated PASMC. Because SR calcium homeostasis is also controlled by the activity of SERCA2 pumps, co-immunostaining for RyR subtypes (RyR1, RyR2 and RyR3) and SERCA pumps (SERCA2a and SERCA2b) were performed.

In Nx-PASMC, the three RyR subtypes expressed were differentially distributed. RyR1 was the only subtype present in the subplasmalemmal area and did not colocalize with RyR2 (Figure 4A) and RyR3 (Figure 4B) which were present in the whole cell and in the perinuclear region, respectively. SERCA2b pumps were present in a subplasmalemmal region and colocalized with RyR1 (Figure 4C); whereas SERCA2a were in the perinuclear region, and colocalized with RyR3 (Figure 4D). SERCA2a and SERCA2b formed two distinct clusters and they did not colocalize together (Figure 4E).

In CH-PASMC, the labeling for RyR1 and RyR2 was the same as in Nx rats (Figure 4A). However, RyR3 had both a perinuclear and a subplasmalemmal labeling, even if, in this latter area RyR3 did not colocalize with RyR1, still forming two distinct clusters (Figure 4B). Besides, RyR1 still colocalized with SERCA2b in the subplasmalemmal level (Figure 4C) and RyR3 with SERCA2a both in perinuclear and subplasmalemmal areas (Figure 4D). By contrast, the subcellular expression of RyR and SERCA2 in MCT-PASMC was completely different since RyR and SERCA2 were redistributed in the whole cell SR without any defined pattern. That is, RyR1 colocalized with RyR2, RyR3 and SERCA2b in the cell and RyR3 colocalized with SERCA2a at both perinuclear and subplasmalemmal levels. Figure 4F schematically





**Figure 3.** Involvement of SR in calcium responses to an osmotic shock in normoxic, CH and MCT rats. Original traces (A, C, E) and summary bar graph responses (B (N=4-15), D (N=4-15), F (N=4-6)) of osmotic shock induced calcium response measured with indo-1 in Nx-PASMC (A, B) CH-PASMC (C, D) and MCT-PASMC (E, F); with 2 mM extracellular calcium. For all rats, calcium responses are significantly smaller in presence of GsMTx-4 (5  $\mu$ M), ryanodine (RYA, 100  $\mu$ M), dantrolene (DT, 10  $\mu$ M) but not altered trans-Ned-19 (Ned-19, 100  $\mu$ M), nicardipine (1  $\mu$ M). In Nx-PASMC, the responses are completely abolished in absence of extracellular calcium (+ 1 mM EGTA). In CH-PASMC and MCT-PASMC, calcium responses are also reduced by Xestospongine C (XestoC, 1  $\mu$ M) and methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD, 5 mM). \* indicates a significant difference for  $p < 0.05$  with the condition without any inhibitor for Nx, CH, MCT -PASMC. # indicates a significant difference for  $p < 0.05$  with the Nx condition, \$ with the CH condition. NS: non significant.

summarizes the distribution of RyR and SERCA2 in Nx, CH and MCT rats and statistical analysis for localization and colocalization is illustrated in Supplementary S6 and S7.

### **RyR1 and SERCA2b are involved in the calcium response to an osmotic shock in Nx and CH rats.**

Immunolabelings in Nx-PASMC has shown that RyR1 is associated with SERCA2b in a subplasmalemmal area whereas RyR3 is associated with SERCA2a in a segregated perinuclear zone (Figure 4), forming two discrete stores. A previous study shown that, in PASMC, cyclopiazonic acid (CPA) preferentially inhibit one ER store refilled by SERCA2b pump whereas thapsigargin (TG) a distinct ER store refilled by SERCA2a<sup>240</sup> (Supplementary S8). Yet, acute application of CPA (10  $\mu$ M) increased  $[Ca^{2+}]_i$  mainly in a subplasmalemmal area whereas TG (1  $\mu$ M) elicited also a calcium rise in a perinuclear region (Figure 2D). Therefore, CPA is able to empty RyR1-containing SR calcium stores and TG to empty RyR3-containing SR calcium stores.

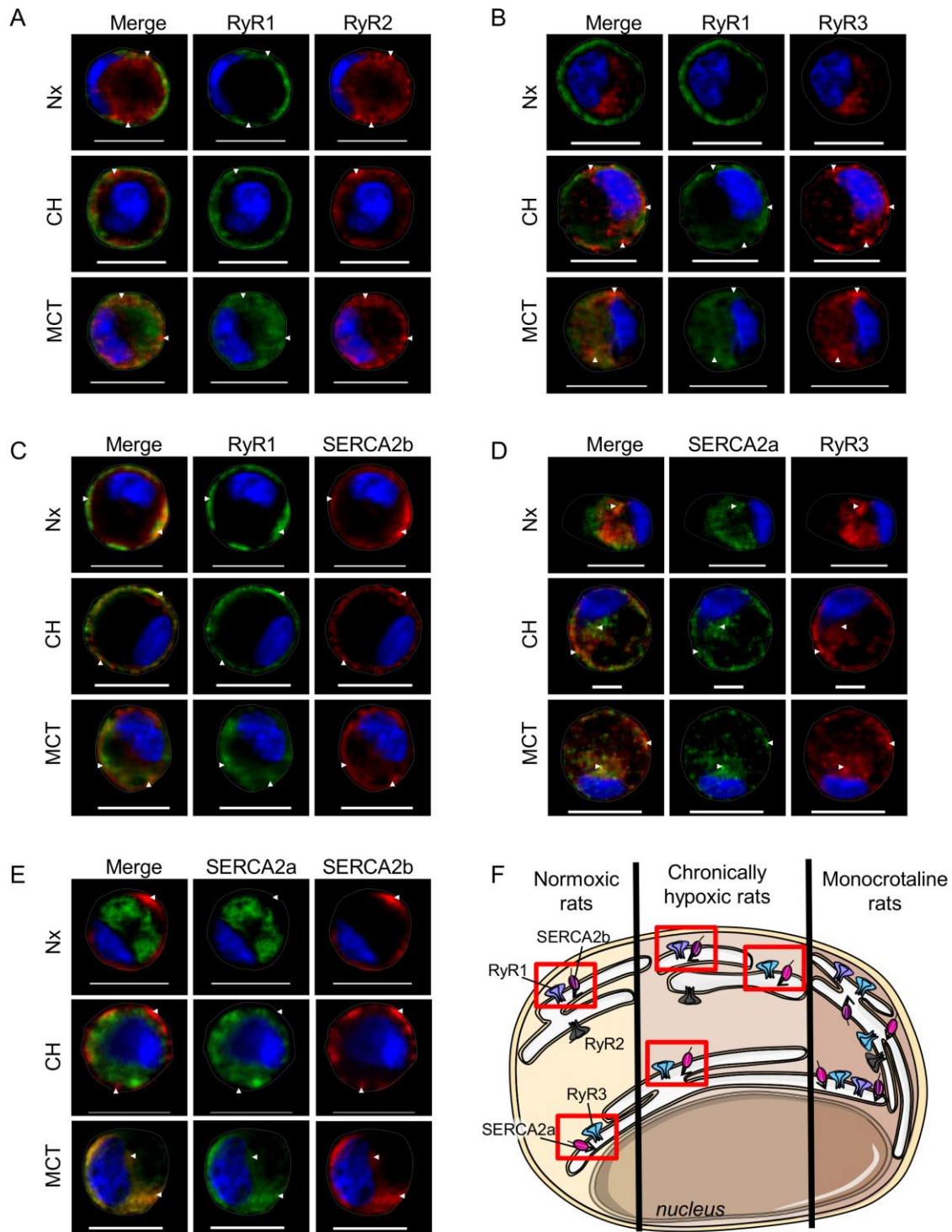
Figure 5 shows that osmotic shock-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase was reduced by CPA but not by TG, indicating that the RyR subtype involved in the CICR is the RyR1 subtype.

By contrast to osmotic shock-induced calcium responses, ET-1 which increases  $[Ca^{2+}]_i$  *via* a RyR3 dependent pathway induced a calcium increase which was only inhibited by TG and not by CPA (Supplementary S5).

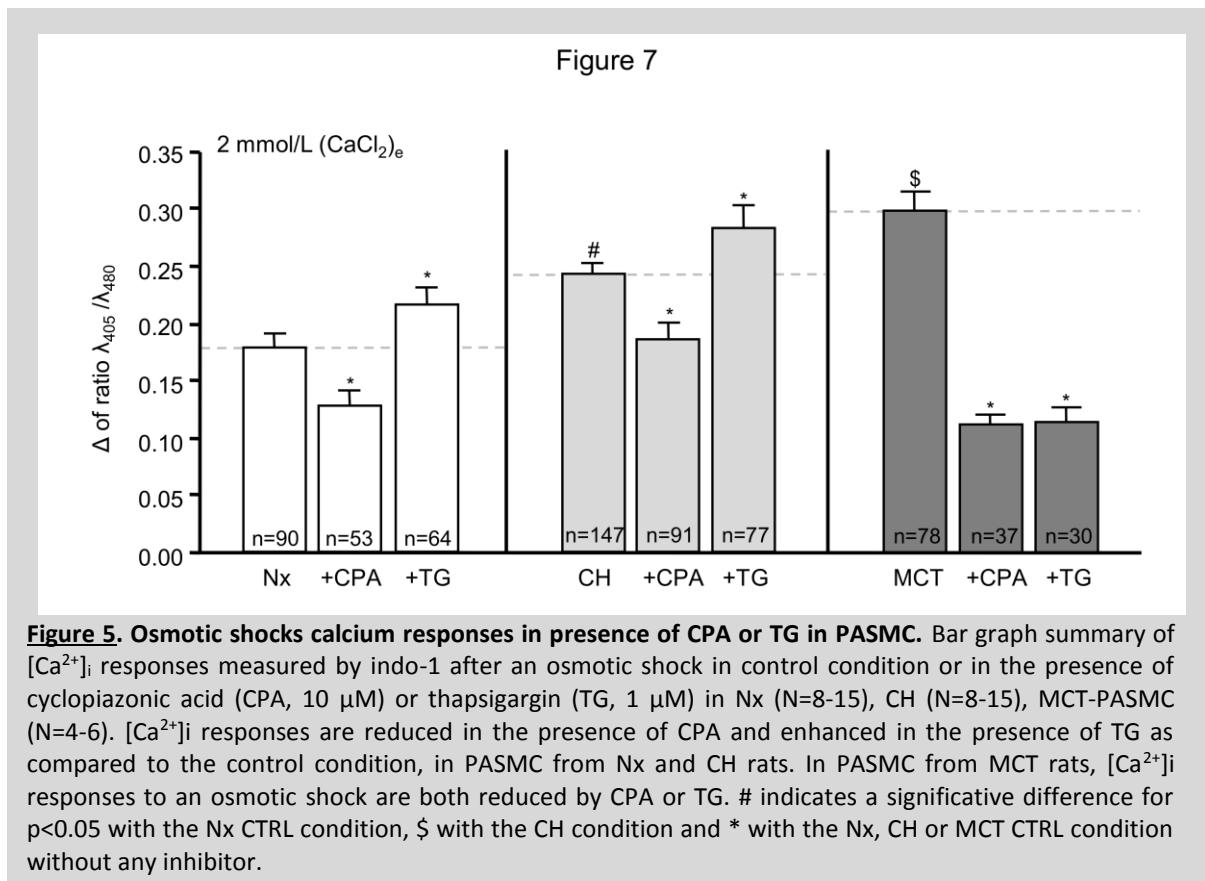
In CH-PASMC, although RyR1 and RyR3 were present in the subplasmalemmal area, they constituted two different clusters and each subtype was still associated to a specific SERCA pump, as in Nx rats. Thereby, CPA was still able to empty RyR1 SR calcium stores and TG, RyR3 ones. Osmotic shock-induced  $[Ca^{2+}]_i$  responses were only reduced by CPA but not by TG (Figure 5), showing that, in PASMC from CH rats, RyR1 is, again, the RyR subtype involved in the CICR mechanism. In MCT-PASMC, where the subcellular localization of RyR subtypes and SERCA2 pumps is diffused and where the CICR is greater, both TG and CPA were able to reduce by 62% calcium responses to an osmotic shock (Figure 5).

### **Another calcium store is present in PASMC from PH rats.**

When an osmotic shock is applied in the absence of extracellular calcium, no calcium response is observed in Nx-PASMC (Figure 3), but in CH-PASMC, a calcium increase is measured (Figure 6). This calcium increase is reduced by GsMTx-4, ryanodine, dantrolene, xestospongin C, CPA and TG but not by nifedipine, a  $Ca^{2+}$  and  $Na^+$  free solution or trans-Ned-19 (Figure 6B). SR calcium is implicated in this response because an osmotic shock induced a depletion of SR calcium (measured with the fluo-5N probe) in absence of extracellular calcium only on CH rats (Figure 6D). Finally, we observed that *caveolae* are essential in these calcium responses because they were fully inhibited when cells were pre-treated with the *caveolae* disrupter M $\beta$ CD (5 mM, Figure 6A-B). These data indicate that an



**Figure 4. Immunolabeling of RyR and SERCA pumps in Nx, CH and MCT rat PASM.** Images showing the distribution labeling of RyR1 (green), RyR2 (red), RyR3 (red), SERCA2a (green) and SERCA2b (red) and co-immunostainings between these proteins, as indicated (**A.** RyR1 and RyR2; **B.** RyR1 and RyR3; **C.** RyR1 and SERCA2b; **D.** SERCA2a and RyR3; **E.** SERCA2a and SERCA2b) in PASM from Nx, CH and MCT rats. Arrow heads indicate some staining points. Nucleuses are stained in blue by DAPI. Scale bar: 10  $\mu$ m. In Nx PASM, RyR1 colocalize with SERCA2b in the subplasmalemmal area whereas RyR3 colocalize with SERCA2a in the perinuclear area. In CH PASM, RyR1 colocalize with SERCA2b in perinuclear area in distinct clusters than RyR3 and SERCA2a which are present both in perinuclear and subplasmalemmal levels. In MCT PASM, RyR subtypes and SERCA2 pumps are expressed in both areas. **F.** Schematic representation of the distribution of RyR subtypes and SERCA2 pumps summarizing immunostaining from A to E.

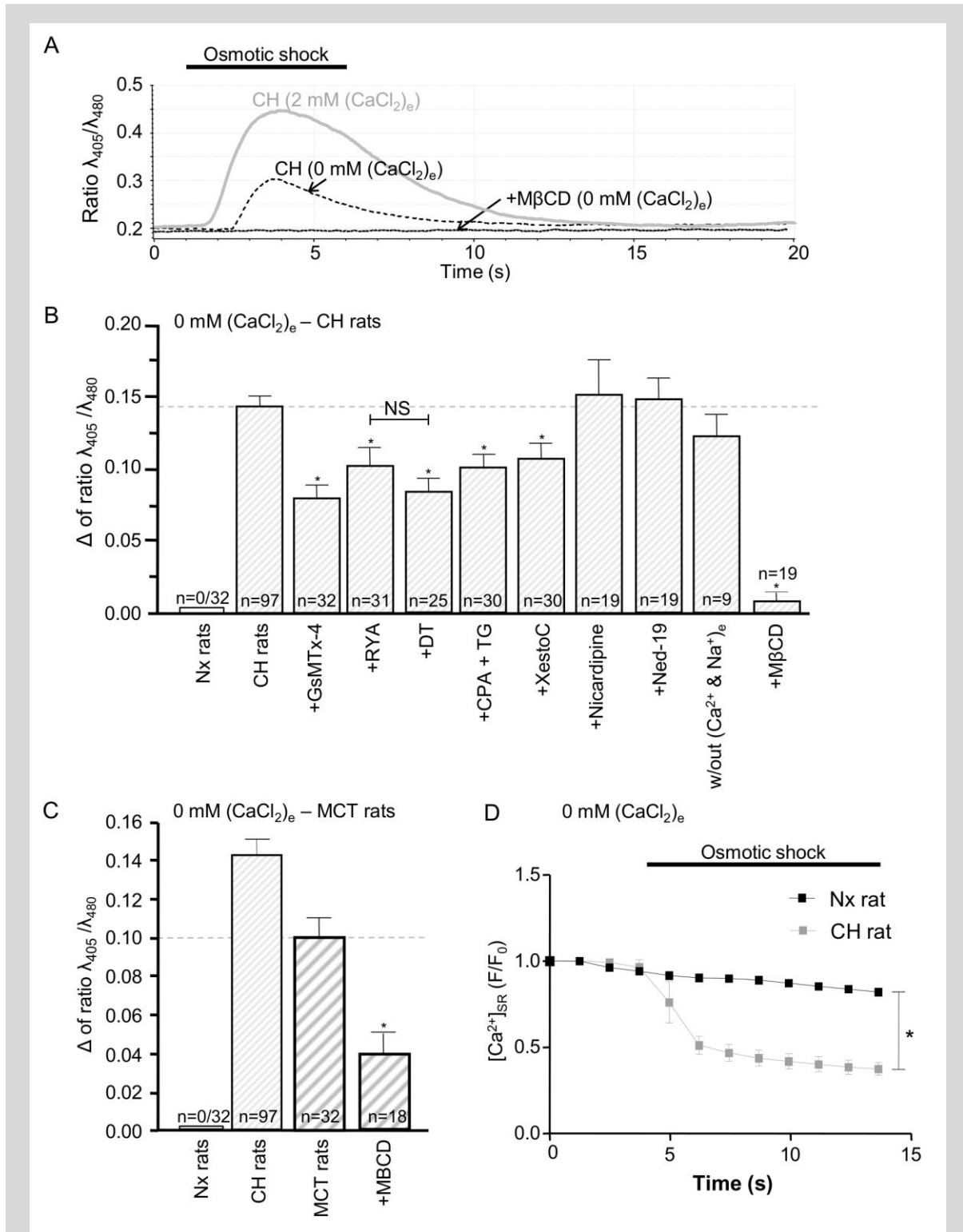


additional mechanism is present in PH rats involving *caveolae*. This was further confirmed by the fact that osmotic shock-induced  $[Ca^{2+}]_i$  response in presence of extracellular calcium were also strongly reduced by M $\beta$ CD in PH-PASMC (Figure 3D), but not in Nx-PASMC (Figure 3B).

## DISCUSSION

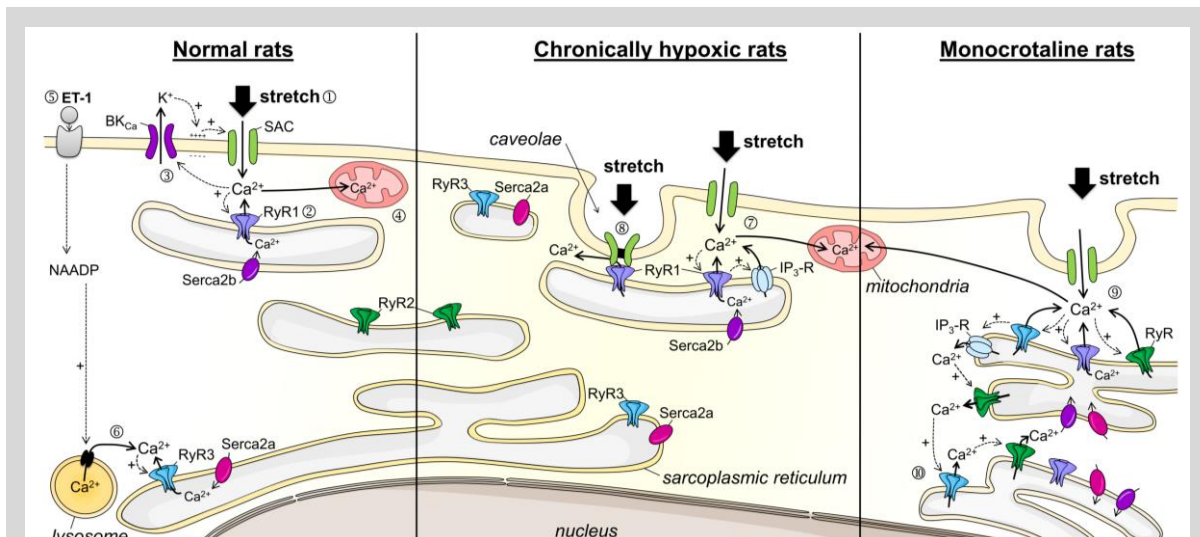
We report that the specific spatial organization of calcium stores is important for specific calcium responses, according to the stimulus. Our study also reveals that calcium responses to stretch are increased under pathological conditions like PH and that this increase is associated to a different spatial distribution of RyR subtypes.

Stretch of PASM by either a patch-clamp pipette or an osmotic shock activates SAC as we previously described<sup>3</sup>. The stretch induces a calcium entry through SAC that directly activates iberiotoxin-sensitive potassium channels (BK<sub>Ca</sub> channels). The potassium efflux through BK<sub>Ca</sub> channels leads to cell hyperpolarization and increases the electrochemical gradient for calcium ions. By this mean, when SAC are activated and PASM stretched, the hyperpolarization amplifies the calcium entry through SAC and thus cell contraction<sup>11</sup>. Stretch-induced hyperpolarization also explains why VGCC are not implicated in the stretch-induced calcium response, as revealed by the absence of effect of VGCC antagonist nifedipine on stretch-induced  $[Ca^{2+}]_i$  increase.



**Figure 6.**  $[Ca^{2+}]_i$  responses to osmotic shocks in PASMC from PH rats in absence of extracellular calcium. **A.**  $[Ca^{2+}]_i$  responses measured by indo-1 recorded in a CH rat PASMC following an osmotic shock of 225 mOsmol in absence of extracellular calcium + 1 mM EGTA and with methyl- $\beta$  cyclodextrin (M $\beta$ CD). **B.** and **C.** Summary of the amplitude of the calcium peak observed after an osmotic shock in PASMC from CH (B: N=3-10; C: N= 4-10). **D.** Curve representing the  $[Ca^{2+}]_{SR}$  as the ratio F/F<sub>0</sub> during time after an osmotic shock.  $[Ca^{2+}]_{SR}$  is measured by confocal microscope with the fluo-5N probe. The  $[Ca^{2+}]_{SR}$  decrease after an osmotic shock in CH-PASMC (n=6, N=3) but not in Nx-PASMC (n=6, N=3).





**Figure 7. Summary of signaling pathways to stretch in Nx, CH and MCT-PASMC.** In normal rats, a stretch activates and allows a calcium influx through plasma membrane stretch-activated channels (SAC)①. This calcium entry activates RyR1 of the subplasmalemmal sarcoplasmic reticulum (SR) which allow a calcium amplification by this SR②. In the same time, the calcium influx through SAC activates BKCa channels, a potassium efflux ③ that hyperpolarizes the cell plasma membrane which in turn facilitates the calcium entry through SAC. Besides, the cytosolic calcium increase is rapidly buffered by subplasmalemmal mitochondria④. Conversely to stretch, the activation of endotheline-1 receptors by endotheline-1 (ET-1) induces the production of NAADP⑤. As previously reported<sup>38</sup>, the NAADP will activate lysosomal calcium channels which will activate perinuclear RyR3 and allow a calcium leak from this SR⑥. In chronically hypoxic rats, the same mechanism of calcium influx through SAC that activate subplasmalemmal RyR1 is present but with also the involvement of calcium sensitive IP<sub>3</sub> receptors (IP<sub>3</sub>-R)⑦. Furthermore, a calcium leak from the SR is observed without the involvement of extracellular calcium but involving caveolae⑧. In monocrotaline rats, the calcium influx through SAC which also involve caveolae will activate more RyR subtypes ⑨ and greater calcium amplification in the whole cell area is observed⑩.

In PASMC, we show that RyR1 are implicated in calcium release from the SR by a CICR mechanism after a stretch. RyR1 associated to SERCA2b are only present in subplasmalemmal SR whereas RyR3 and SERCA2a are expressed within the depth of the cell, around the nucleus. A similar subcellular localization pattern of RyR1/2 and RyR3 has been described in airway smooth muscle cells<sup>387</sup> but it is not ubiquitous in smooth muscle cells as in cerebral arteries RyR2 is the most expressed isoform in the subplasmalemmal area<sup>14</sup>. This segregation between RyR1 and RyR3 has previously been described in PASMC<sup>388</sup> but we extend these findings by showing that RyR3 are actually present in a different cluster from RyR1 since they do not colocalize together. Thereby, this spatial segregation of RyRs accounts for specific signaling pathways. For example, ET-1 allows a calcium leak from perinuclear lysosomes which is amplified by perinuclear RyR3<sup>240, 257</sup>. We confirmed that ET-1-induced calcium response is inhibited only when RyR3 associated calcium stores are emptied using TG. By contrast, our experiments show that the stretch amplification response by RyR1 is only inhibited by CPA; the exact opposite response to what is observed for ET-1. To confirm the involvement of RyR1 and SERCA2b, we also show that acute application of CPA or osmotic shock induces a calcium rise mostly in a subplasmalemmal region where only RyR1 are expressed and where the contractile apparatus is located in freshly isolated PASMC<sup>389</sup> (Supplementary S4D). Besides, it is noteworthy that previous results in PASMC indicate that RyR2 are involved in TRPV4 channels dependent calcium responses<sup>66</sup>.

Finally, the subcellular organization of other calcium stores than SR (mitochondria and lysosomes) also contributes to the specificity of signaling pathways. In freshly isolated PASMCM, we show that mitochondria are mostly located in a subplasmalemmal area whereas lysosomes are present in a perinuclear zone. Mitochondria do not contribute to the calcium increase induced by stretch but rather reduce the calcium spread by buffering the cytosolic calcium, probably to maintain the calcium homeostasis. Besides, lysosomes do not participate to the stretch-induced  $[Ca^{2+}]_i$  rise but rather to the calcium signaling pathway for ET-1, as previously described<sup>256</sup>.

These results were obtained in freshly isolated cells which shape are rounded, as compared to the more elongated shape observed in intact vessels. This change in the morphology of cells is linked to the dissociation process.

With respect to pathophysiological conditions such as PH, PASMCM, from both CH and MCT rats exhibit higher calcium responses to stretch, leading to a greater contraction of IPA, as previously shown<sup>3</sup>. This increased calcium response is due to a combination of three factors. (1) SAC from PH rats are hyperresponsiveness to membrane stretch and allow a higher calcium influx. (2) The CICR amplification by the SR is enhanced. In MCT-PASMCM, all RyR subtypes and SERCA2 pumps are redistributed in the whole cell area and participate to a greater amplification by 62% instead of 24% in Nx-PASMCM. Previous studies show that MCT rats develop a more severe PH than CH rats and this may result from this stronger reorganization of SR calcium proteins. Furthermore there is also a calcium amplification by IP<sub>3</sub>Rs. A likely hypothesis is that calcium itself, because of its larger concentration, could activate IP<sub>3</sub>R which are calcium sensitive<sup>390</sup>. (3) In CH-PASMCM, the amplification mechanism is different due to a specific coupling between SAC and RyR. The calcium increase in the subplasmalemmal level in CH-PASMCM is able to only activate RyR1 but not RyR3 (since only CPA, and not TG, is able to reduce calcium responses; Figure 5). A hypothesis could be that SAC and RyR1 are strongly coupled in CH rats. *Caveolae* are good candidates to participate to this coupling by forming a complex microenvironment adequate for bringing closer membrane SAC and SR RyR1. We show in CH-PASMCM, that the *caveolae* disrupter MβCD strongly reduces stretch-induced calcium responses (but not in Nx-PASMCM), possibly by separating SAC and RyR1. If SAC are physically coupled to RyR1, a change in SAC conformation will subsequently activate RyR1 leading to calcium leak from subplasmalemmal SR, without the contribution of extracellular calcium, as we shown (Figure 6). Depletion of SR calcium store (measured with the fluo-5N probe<sup>271</sup>) during stretch without extracellular calcium confirm that SAC could be coupled to SR by a mechanism different of CICR. Similar calcium responses to an osmotic shock in absence of extracellular calcium were previously observed in CH-PASMCM<sup>32</sup> but we further show that these responses are completely abolished with the *caveolae* disrupter MβCD. Furthermore, in MCT rat IPA and in human PH, caveolin-1 expression is augmented in SMC<sup>5, 362</sup> suggesting that *caveolae* are important in the pathogenesis of PH and can participate to increase the myogenic tone.

Altogether, these findings suggest that, for each stimulus, PASMC can mobilize a segregated calcium store independently and produce a biological response precisely adapted to the stimulation received by the pulmonary artery (summarized in the Figure 7). Indeed, we have shown by co-immunostaining and functionally experiments that (i) in the subplasmalemmal area, RyR1 are associated to SERCA2b and mitochondria to respond to a mechanical stretch stimulus, whereas (ii) in the perinuclear region, RyR3 are associated to SERCA2a and lysosomes which are recruited by ET-1. Moreover, in PH-PASMC, the equilibrium between the stimulus and the biological response is shifted to a greater calcium increase and *in fine*, to a larger IPA contraction mainly due to a hyperreactivity of SAC, a reorganization of all calcium stores and *caveolae*.

### **Acknowledgements**

We thank Dr Regis Bobe (U689 INSERM, Hôpital Lariboisière, Paris, France) for providing us with the SERCA2 antibodies.

### **Funding**

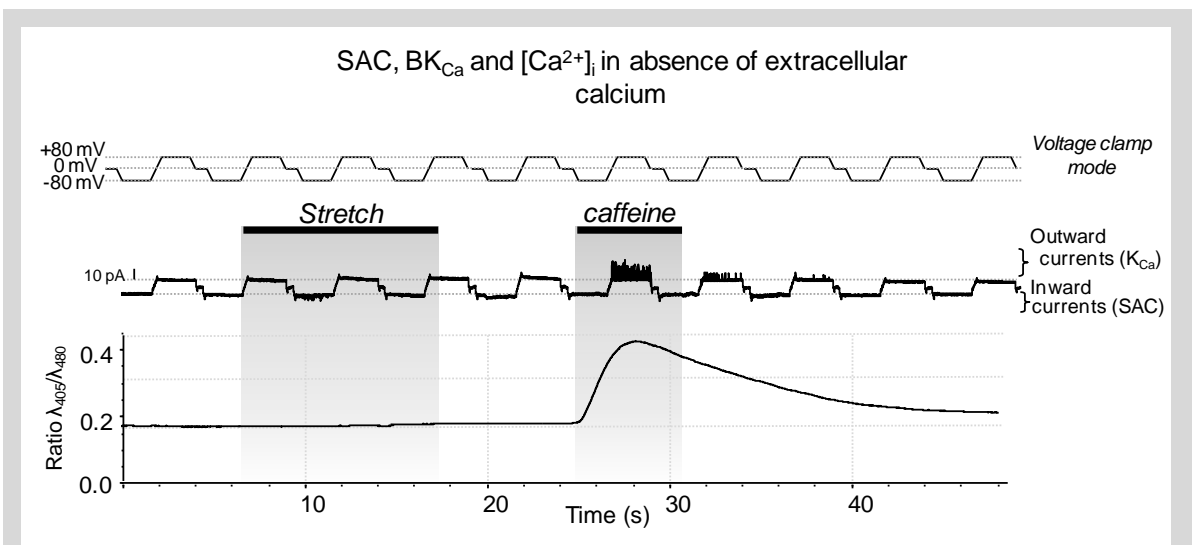
This work was supported by 'Conseil Régional d'Aquitaine'. Conflict of Interest: none declared



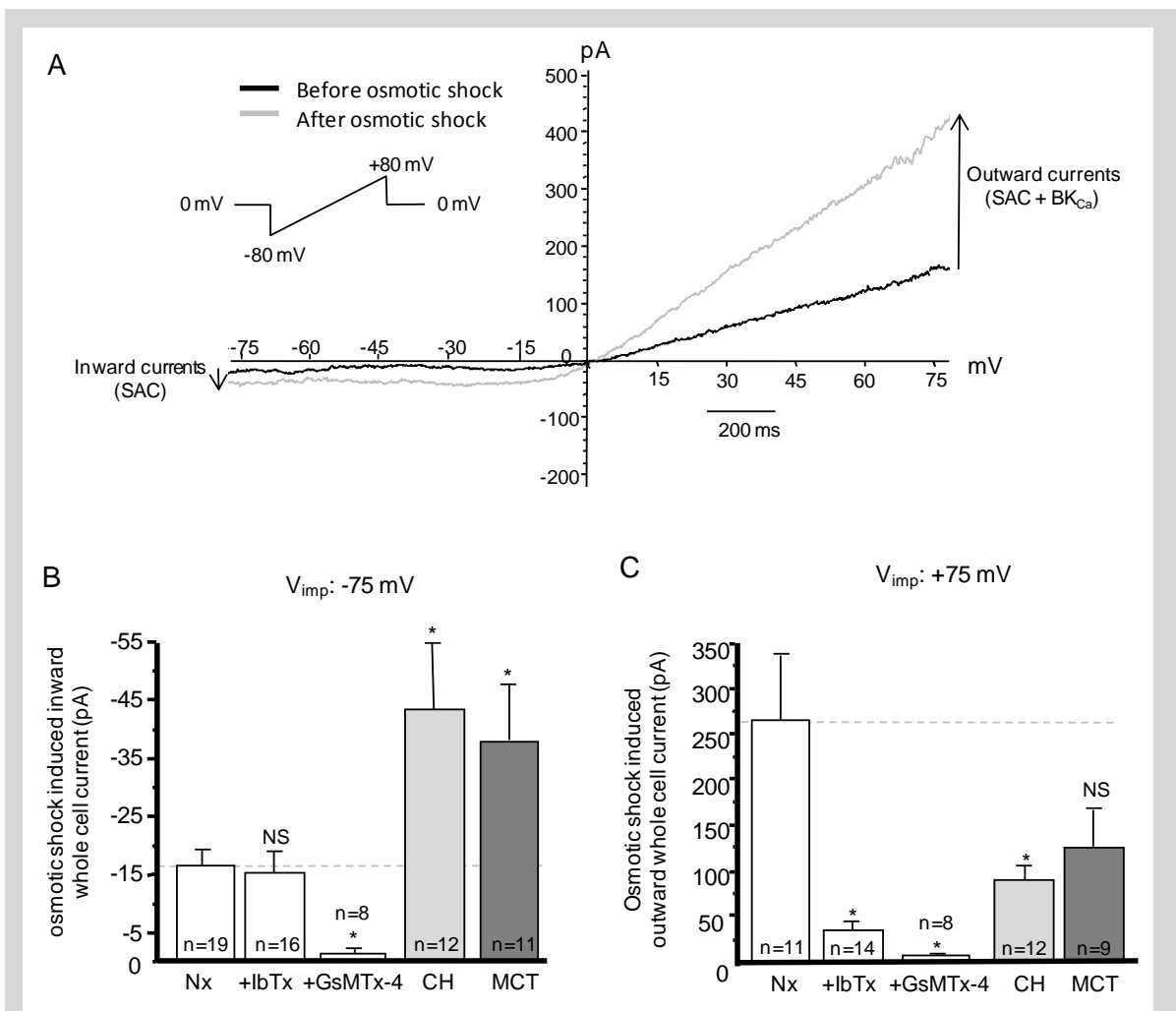
## Stretch-induced $\text{Ca}^{2+}$ signaling in vascular smooth muscle cells depends on $\text{Ca}^{2+}$ store segregation

Guillaume Gilbert, Thomas Ducret, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau and  
Jean-François Quignard

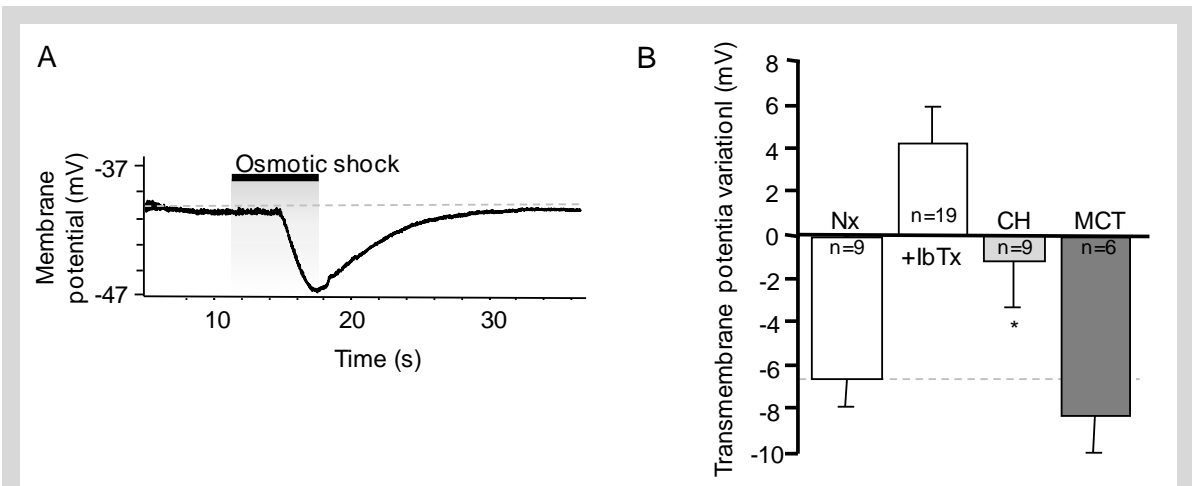
### Supplementary Figures



**Supplementary S1.**  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels are not directly activated by stretch. *Top:* Voltage clamp protocol. *Middle:* current trace observed in a Nx rat following a stretch induced by a depression of  $-40$  mmHg in a patch clamp pipette in a cell-attached configuration, without extracellular calcium +  $1$  mM EGTA followed by a caffeine (RyR activator) application. *Bottom:* simultaneous  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  measurement with the indo-1 calcium probe. When a stretch is applied, inward SAC currents are recorded but neither outward  $\text{K}_{\text{Ca}}$  current and calcium response is observed. Acute application of caffeine ( $10$  mM) induce a rapid  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  rise with a simultaneous activation of  $\text{K}_{\text{Ca}}$  channels (outward current) showing that  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels were present under the patch-clamp pipette.

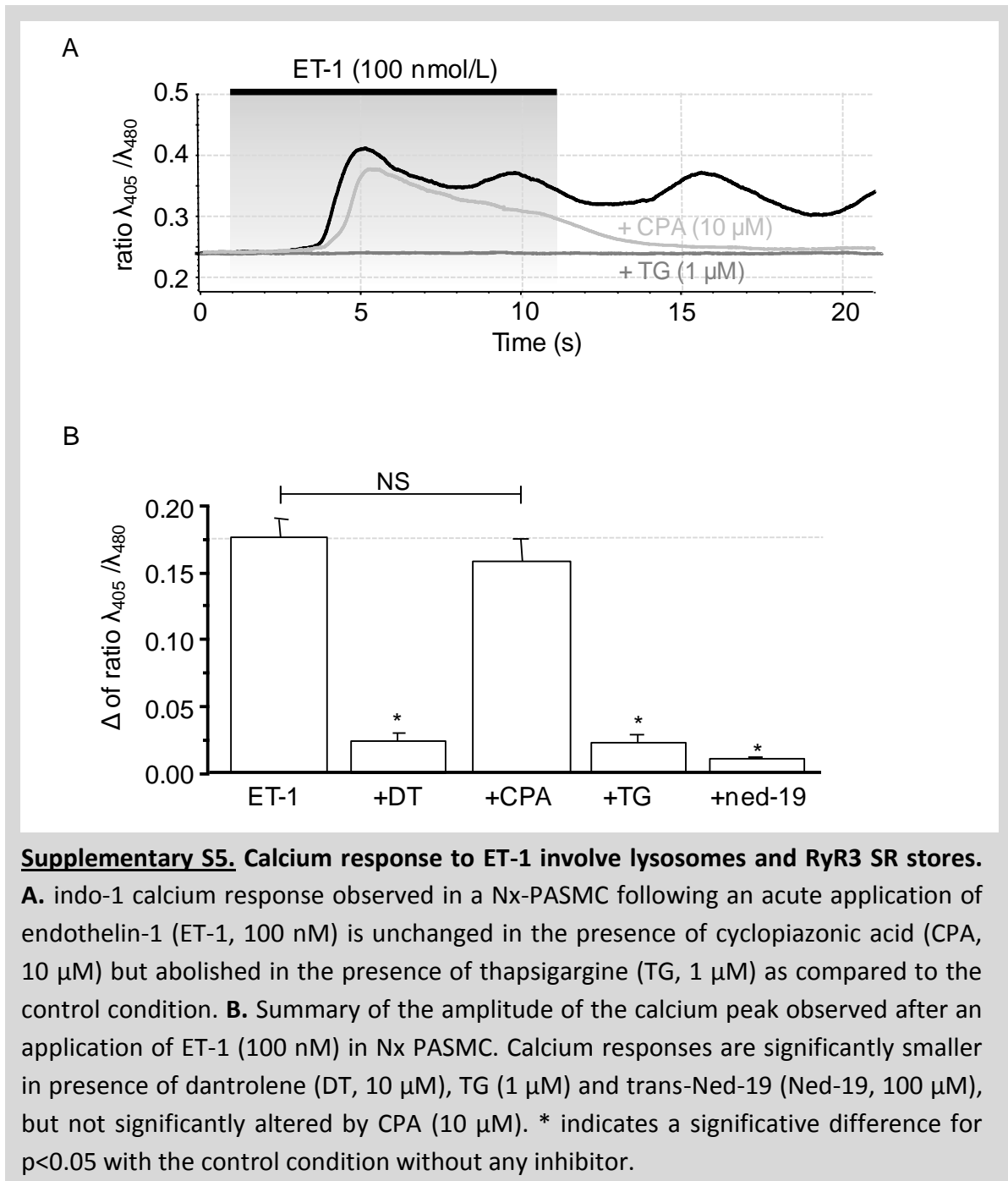


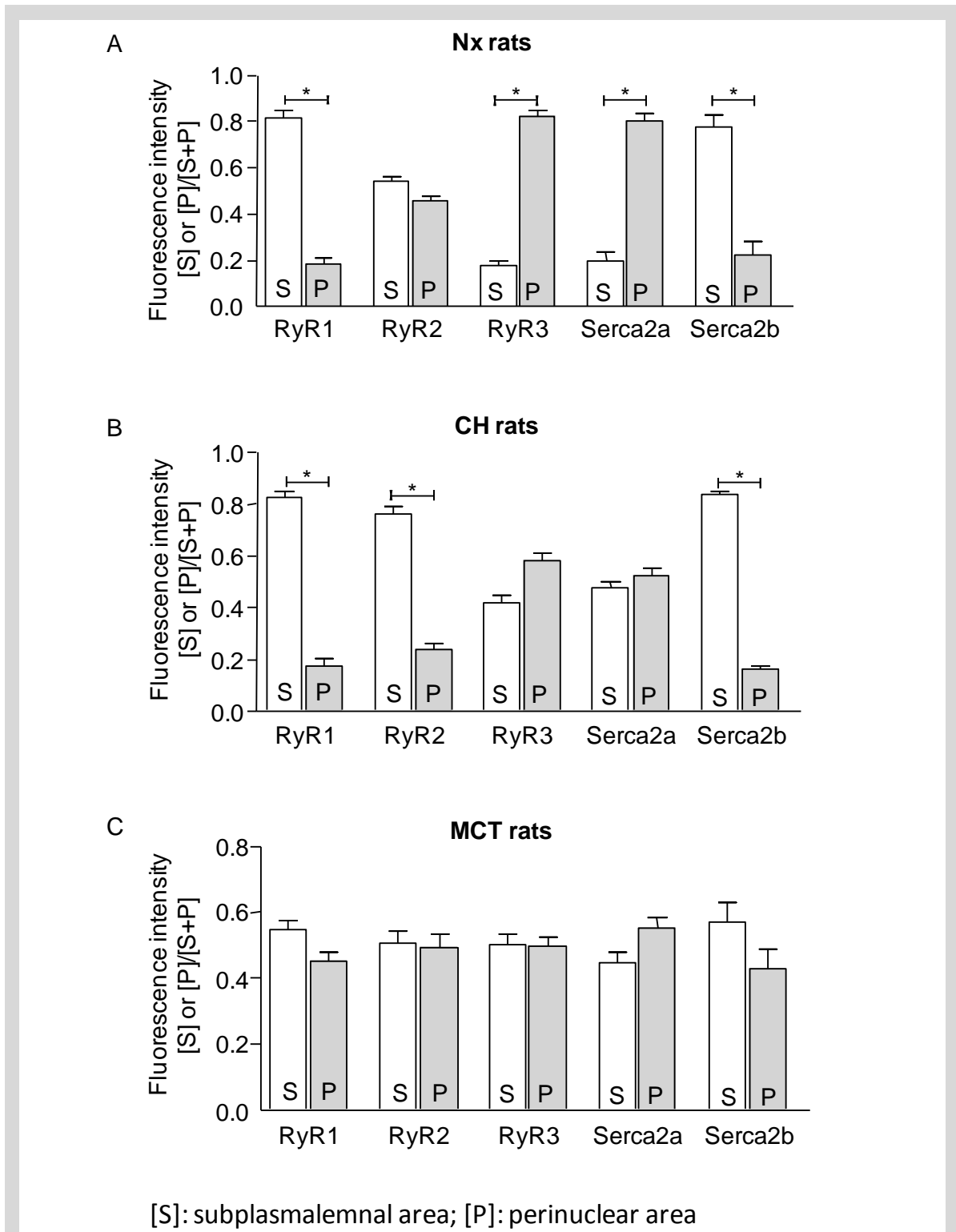
**Supplementary S2. An osmotic shock activates SAC and BK<sub>Ca</sub> channels.** Experiments were performed in a whole-cell configuration and stretch is induced by an osmotic shock of 225 mOsmol. **A.** in a Nx rat PASMCS, an osmotic shock of 225 mOsmol induces an inward current at negative potentials and an outward current at positive potentials. **B.** and **C.** Summary of the amplitude of inward currents (**B**) and outward currents (**C**) observed after an osmotic shock in Nx, CH and MCT PASMCS, in absence or presence of GsMTx-4 (5 μM) or IbTx (1 μM). Current amplitude of the inward SAC currents inhibited by GsMTx-4 toxin is greater in CH and MCT PASMCS as compared to Nx cells. Current amplitude of the outward BK<sub>Ca</sub> current inhibited by IbTx is smaller in CH PASMCS as compared to Nx and MCT cells. \* indicates a significant difference for p<0.05 with the Nx condition. NS: non significant.



**Supplementary S3. An osmotic shock induces PASMC hyperpolarization.** **A.** Example of a hyperpolarization trace observed in a Nx-PASMC after an osmotic shock of 225 mOsmol (current clamp mode). **E.** Summary of the induced transmembrane changes after an osmotic shock in Nx, CH and MCT-PASMC in absence or presence of IbTx (1  $\mu$ M). In Nx-PASMC, an osmotic shock hyperpolarized the plasma membrane. In the presence of IbTx (1  $\mu$ M), it induced a depolarization by unmasking the positive ionic entry through SAC thus demonstrating that the hyperpolarization was due potassium efflux through BK<sub>Ca</sub> channels. This cellular hyperpolarization was reduced in CH-PASMC in accordance with the reduced activity of BK<sub>Ca</sub> channels previously observed but unchanged in MCT-PASMC \* indicates a significative difference for p<0.05 with the Nx condition.







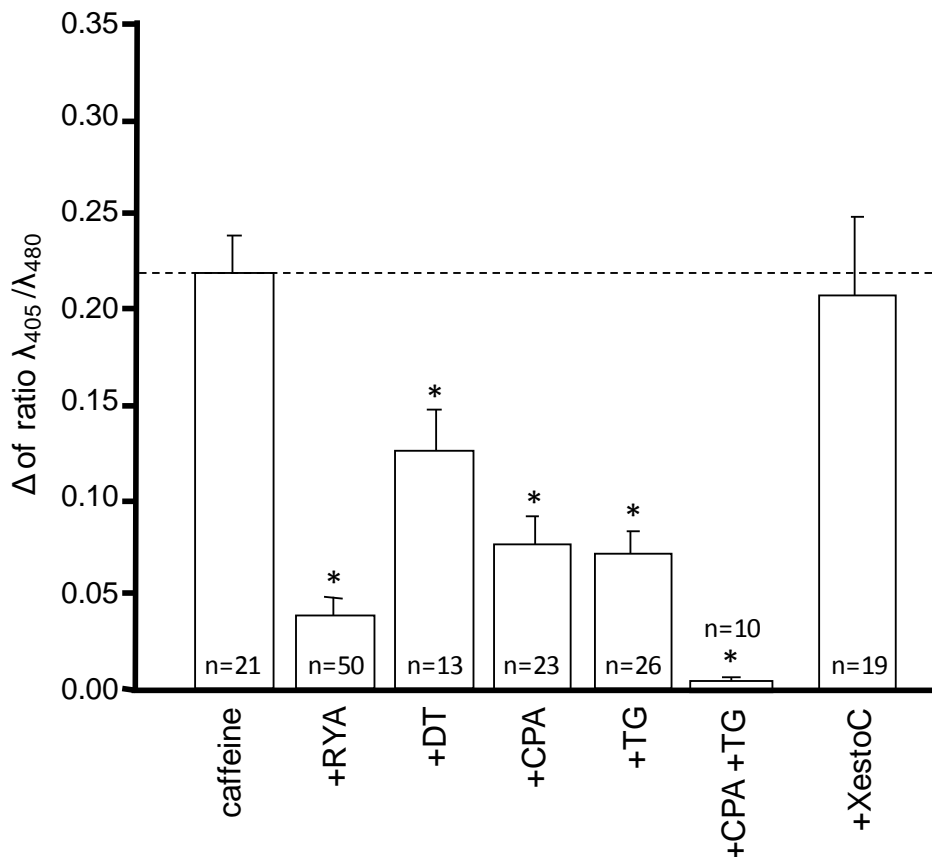
**Supplementary S6. Summary bar graph of Serca and RyR distribution in Nx, CH and MCT-PASMC. A. (Nx) B. (CH) C. (MCT)** bar charts summarizing the labeling patterns shown in Figure 4. It shows the density of labeling (fluorescence intensity normalized to the cell surface and total fluorescence intensity of the cell) in subplasmalemmal area [S] or perinuclear area [P] for Serca2a, Serca2b, RyR1, RyR2 and RyR3. \* indicates a significant difference for  $p < 0.05$  ( $n = 10$  cells at least for each condition).

Nx rats	RyR-2	RyR-3	Serca2b
RyR-1	0.73 ± 0.02	0.44 ± 0.06	0.90 ± 0.01
Serca2a	-	0.91 ± 0.01	0.65 ± 0.01

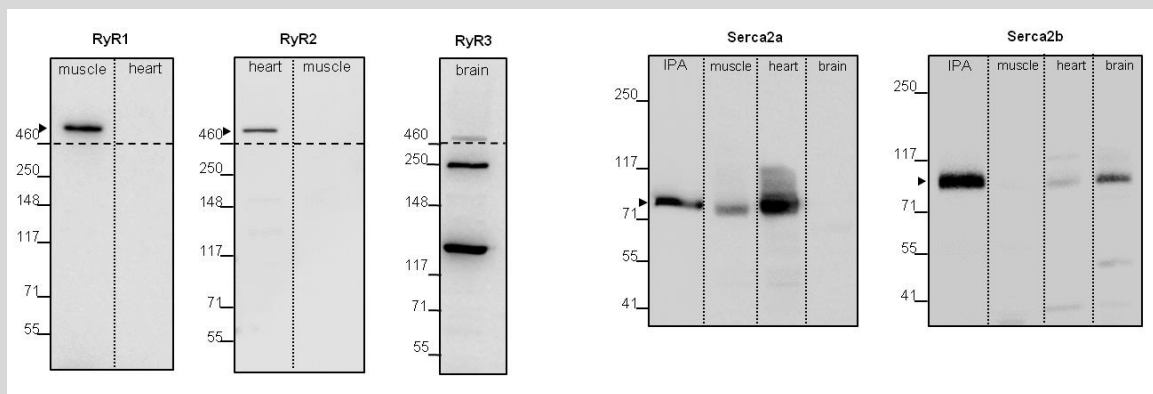
CH rats	RyR-2	RyR-3	Serca2b
RyR-1	0.78 ± 0.07	0.63 ± 0.05	0.91 ± 0.01
Serca2a	-	0.85 ± 0.02	0.60 ± 0.01

MCT rats	RyR-2	RyR-3	Serca2b
RyR-1	0.91 ± 0.01	0.89 ± 0.02	0.88 ± 0.01
Serca2a	-	0.82 ± 0.08	0.93 ± 0.01

**Supplementary S7. Summary table of the Pearson's coefficient between the different RyR and Serca2 isoforms.** For co-immunostainings, Pearson's coefficient ± S.E.M. was determined with the Nis-Elements software. The colocalization was validated when the coefficient was >0.80 in all tested cells (n=10 cells at least for each condition).



**Supplementary S8. Calcium responses to caffeine.** Indo-1 calcium response observed in a Nx-PASMC following an acute application of caffeine (10 mM) is partially inhibited in the presence of cyclopiazonic acid (CPA, 10  $\mu$ M) or thapsigargin (TG, 1  $\mu$ M) as compared to the control condition; but fully inhibited by the combination of both CPA and TG. Caffeine-induced calcium responses are inhibited by RyR antagonists (ryanodine – RYA (100  $\mu$ M) and Dantrolene (DT – 10  $\mu$ M)) but not by an IP<sub>3</sub>R antagonist (Xestospongine C – XestoC (1  $\mu$ M)). \* indicates a significant difference for p<0.05 with the control condition without any inhibitor.



**Supplementary S9. Western blot for SERCA2 and RyR.** Serca2a and Serca2b antibodies only detect a single band at the expected size in pulmonary arteries and in tissues that express a lot of each isoform (heart and skeletal muscle for Serca2a; and heart and brain for Serca2b). These antibodies did not cross react each other as Serca2a antibody only detect a band at 109 kDa whereas Serca2b antibody only detect a single higher band at 115 kDa.

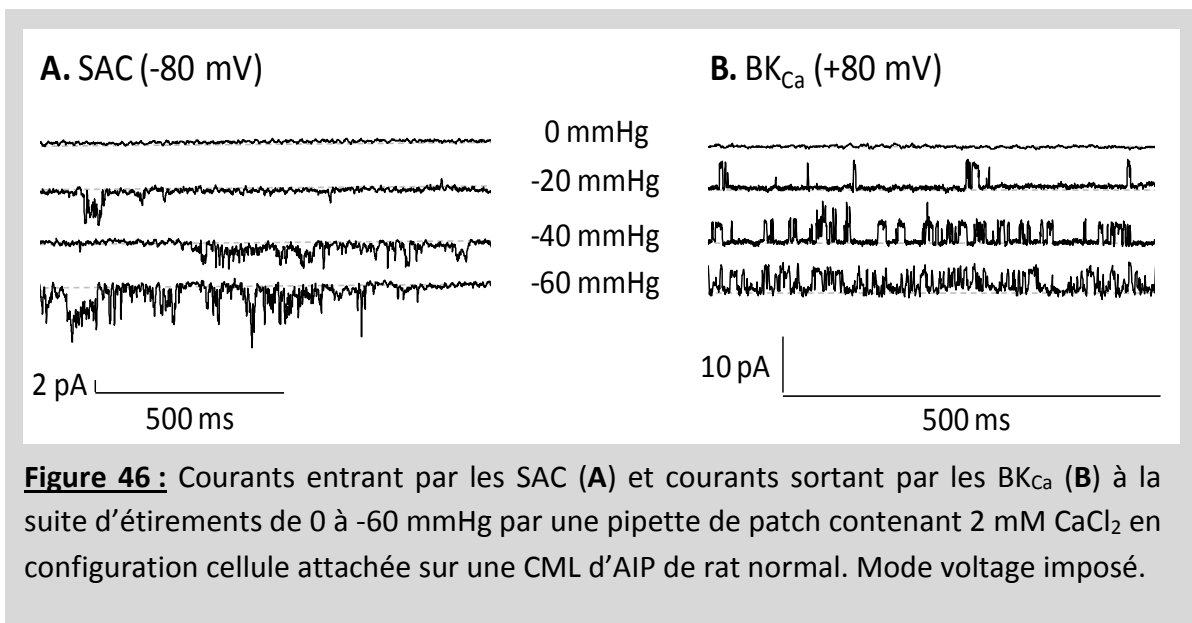
RyR1 antibody detect a single band at 565 kDa in skeletal muscle of rat leg. In heart lysate this band is not present. RyR2 antibody detect a single band at 565 kDa in heart. In skeletal muscle this band is not present. RyR3 antibody detect a band around 550 kDa in brain, as expected.



## Quelques résultats supplémentaires pour compléter ceux de l'article

### 1. Activité des SAC et des BK<sub>Ca</sub> en fonction du degré d'étirement

En configuration cellule attachée, plus on augmente les dépressions dans la pipette de patch, plus l'activité des SAC et des BK<sub>Ca</sub> augmente. Ceci suggère que plus l'étirement est important, plus il y aura de SAC activés qui vont s'ouvrir et faire entrer du Ca<sup>2+</sup> dans la cellule. Ainsi, plus le Ca<sup>2+</sup> va entrer, plus l'activité des BK<sub>Ca</sub> sera importante (**Figure 46**).

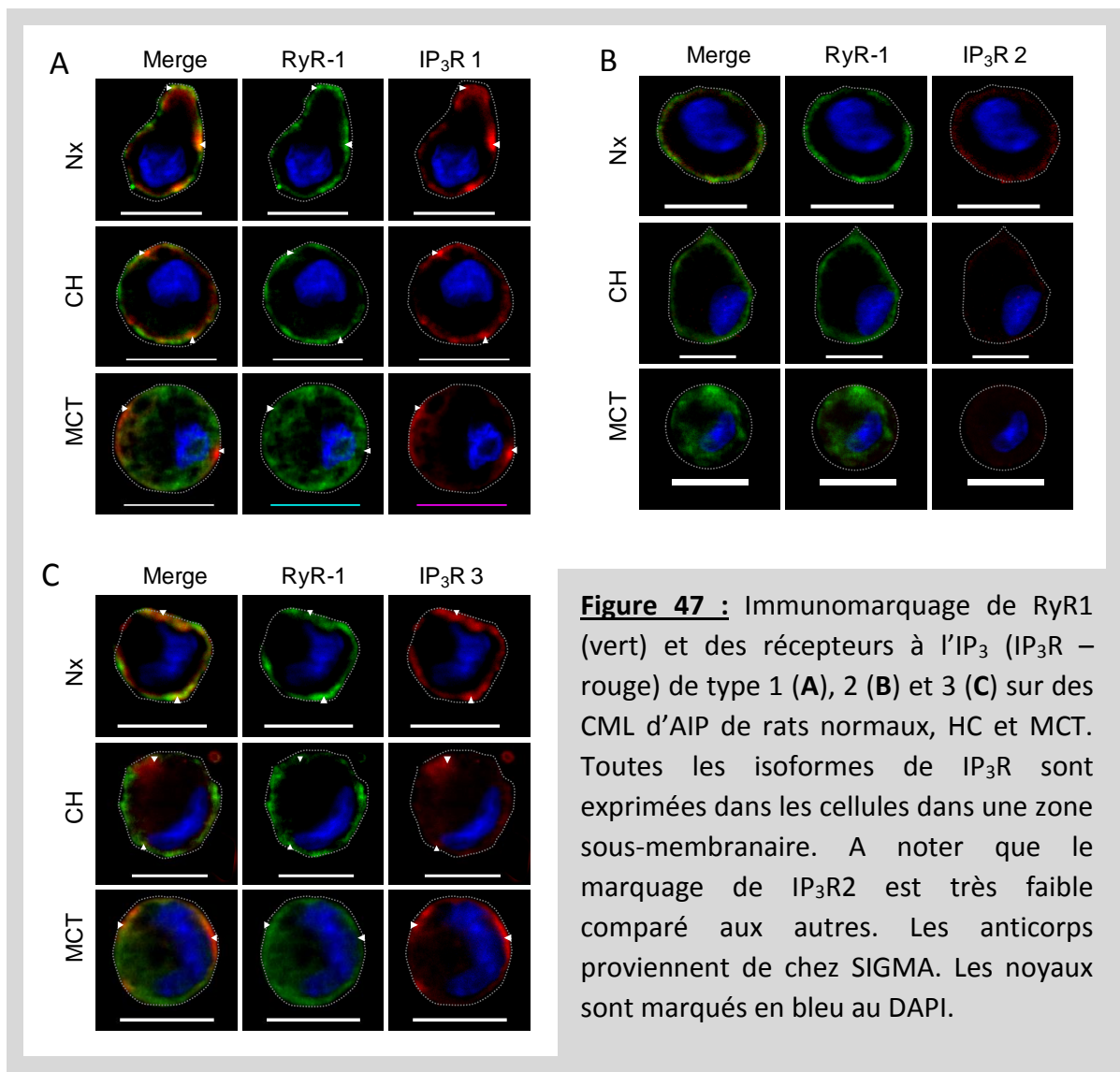


## 2. Immunomarquages

### A. Localisation des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> sur les CML d'AIP

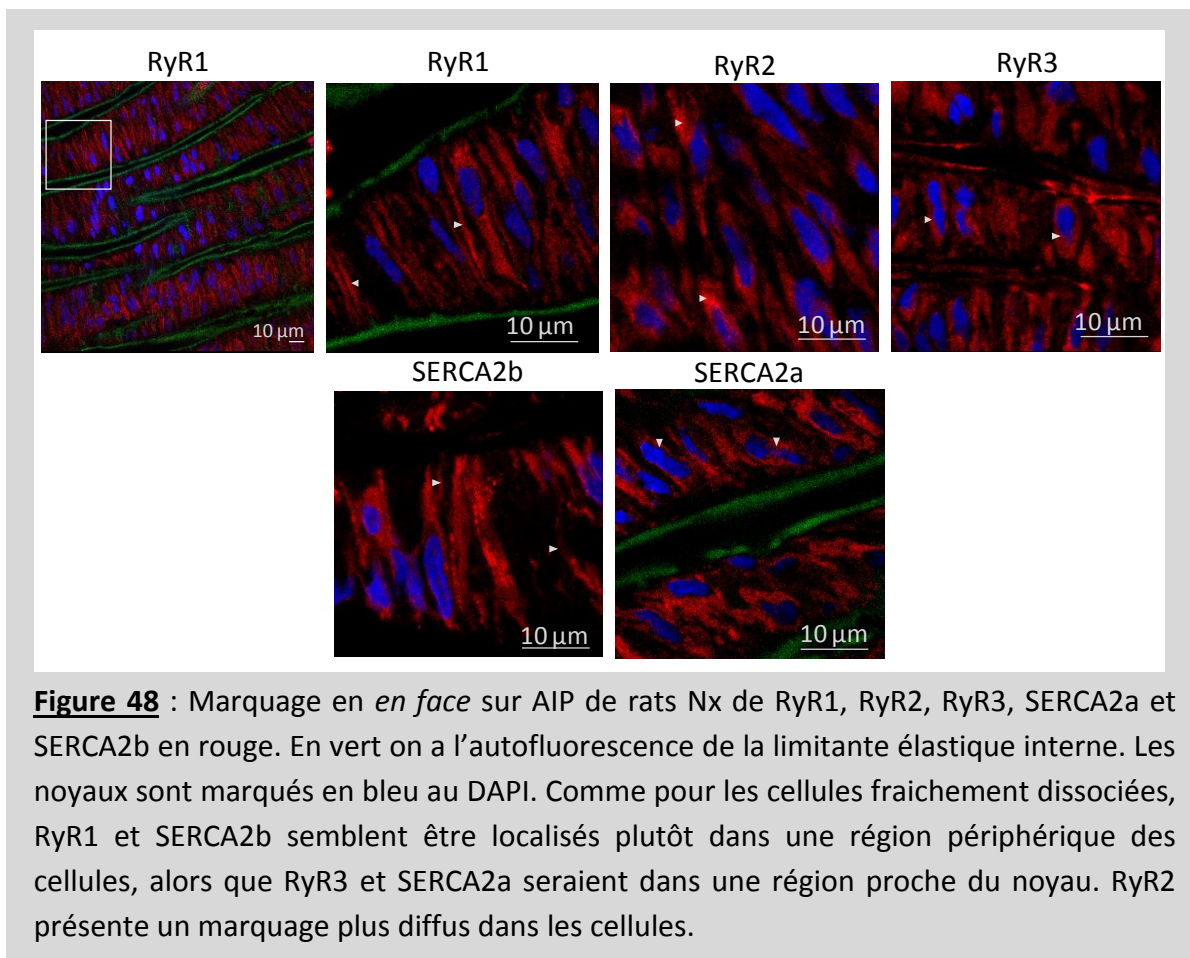
Les trois isoformes des récepteurs à l'IP<sub>3</sub> semblent être exprimés dans les CML d'AIP fraîchement dissociées de rats. Seule l'isoforme IP<sub>3</sub>R2 semble être moins exprimée (marquage beaucoup plus faible que les IP<sub>3</sub>R1 et IP<sub>3</sub>R3). Toutes les isoformes sont exprimés dans une zone sous-membranaire, proche de RyR1 (**Figure 47**).

De plus, la localisation des IP<sub>3</sub>R n'est pas modifiée chez les rats HC ou MCT, contrairement à RyR1 qui présente une sublocalisation cellulaire diffuse chez les rats MCT alors qu'elle est uniquement sous-membranaire chez les rats Nx et HC (**Figure 47**).



### B. Marquage des RyR et SERCA2 sur artères entières

Afin de confirmer la localisation des RyR et des SERCA2 observée sur cellules fraîchement dissociées, des immunomarquages ont été réalisés sur des AIP entières en *en face*. Les protéines (RyR et SERCA2) sont marquées en rouge et les noyaux des CML en bleu au Hoestch. On observe que RyR1 et SERCA2b semblent être exprimés dans une zone périphérique dans les CML alors que RyR3 et SERCA2a ont une localisation plus proche des noyaux. RyR2 quant à lui, a une localisation plus diffuse dans les cellules (**Figure 48**).

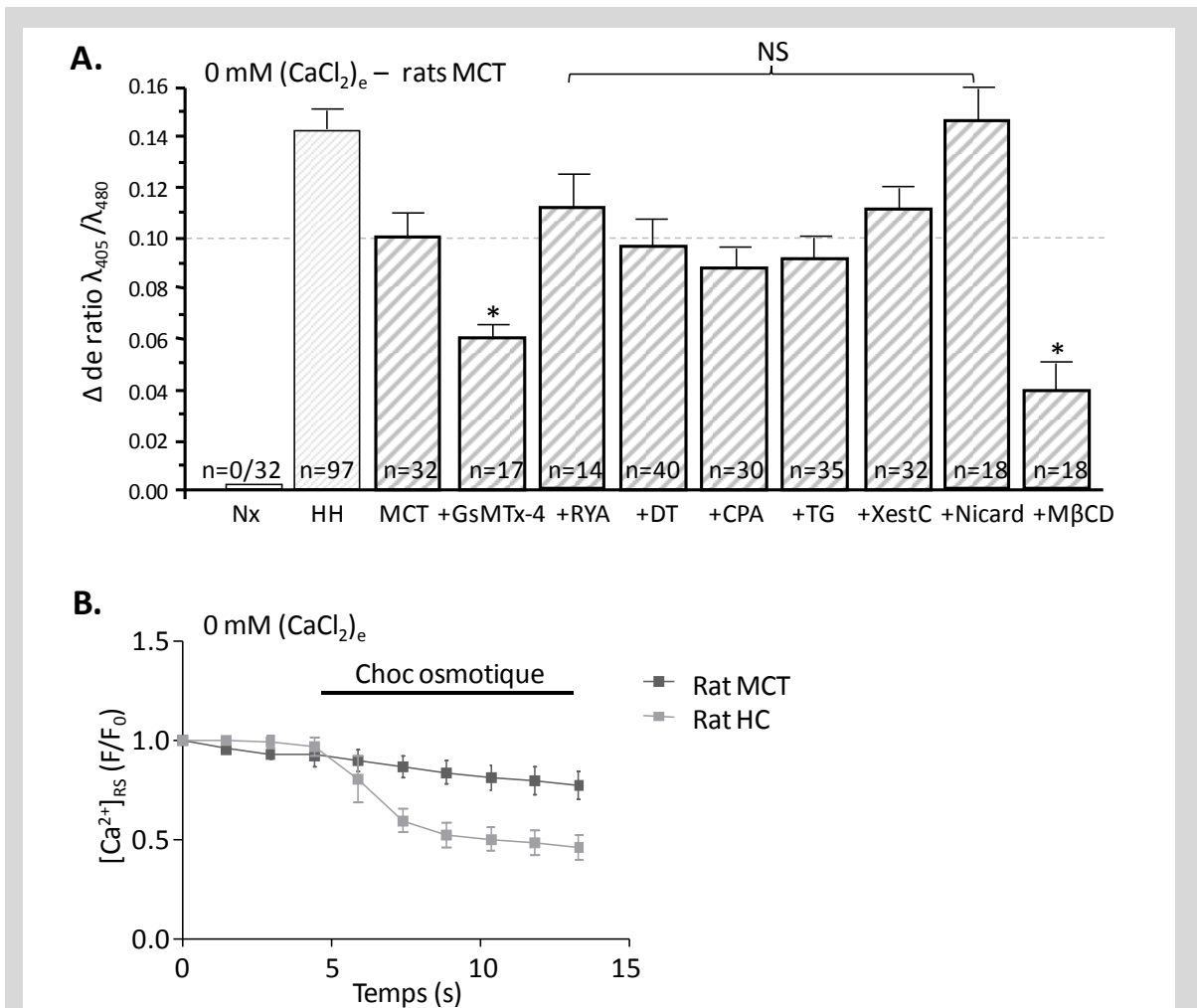


**Figure 48** : Marquage en *en face* sur AIP de rats Nx de RyR1, RyR2, RyR3, SERCA2a et SERCA2b en rouge. En vert on a l'autofluorescence de la limitante élastique interne. Les noyaux sont marqués en bleu au DAPI. Comme pour les cellules fraîchement dissociées, RyR1 et SERCA2b semblent être localisés plutôt dans une région périphérique des cellules, alors que RyR3 et SERCA2a seraient dans une région proche du noyau. RyR2 présente un marquage plus diffus dans les cellules.

### 3. Réponses calciques sans $\text{Ca}^{2+}$ extracellulaires chez les rats MCT

Chez les rats HC, on observe des réponses calciques au choc osmotique alors qu'il n'y a pas de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. Ces réponses font en partie intervenir les réserves du réticulum sarcoplasmique et les cavéoles.

Chez les rats MCT, on observe également le même type de réponse. Elles font également intervenir les cavéoles car elles sont inhibées par la  $\text{M}\beta\text{CD}$  mais, contrairement aux rats HC, elles ne feraient pas intervenir le RS (**Figure 49**). En effet, elles ne sont pas inhibées par la ryanodine, le dantrolène, l'acide cyclopiazonique ou la thapsigargine (**Figure 49A**).



**Figure 49** : **A.** Moyennes de l'amplitude du pic calcique mesuré en indo-1 observé après un choc osmotique de 225 mOsmol dans des CML d'AIP de rats MCT, en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire + 1 mM EGTA. \* indique une différence statistiquement significative avec MCT sans inhibiteurs. NS : non significatif. RYA : ryanodine (100  $\mu\text{M}$ ), DT : dantrolène (10  $\mu\text{M}$ ), CPA : acide cyclopiazonique (10  $\mu\text{M}$ ), TG : thapsigargine (1  $\mu\text{M}$ ), XestC : xestospongine C (1  $\mu\text{M}$ ), Nicard (nicardipine (1  $\mu\text{M}$ ),  $\text{M}\beta\text{CD}$  : methyl- $\beta$ -cyclodextrine (5 mM). **B.** Courbes représentant la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  (ratio  $F/F_0$ ) au cours du temps après un choc osmotique de 225 mOsmol. La  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  est mesurée avec la sonde Fluo-5N au microscope confocal sur des rats HC et MCT (n=6 cellules).

#### **4. Discussion : les SAC font RyR, une histoire de localisation**

Dans cet article, nous avons mis en évidence les voies de signalisations calciques induites par un étirement dans les CML d'AIP de rats normaux et dans deux modèles de rats d'HTP.

Nous avons montré que l'étirement de la membrane plasmique provoque l'ouverture de SAC perméables au  $\text{Ca}^{2+}$ . Plus l'étirement est important, plus l'activité des SAC est forte. Autrement dit, il existe une corrélation entre le degré d'étirement et l'activité des SAC, ce qui témoigne de leur sensibilité à la pression. Cette propriété permet aux CML de répondre précisément aux contraintes mécaniques exercées par la pression au niveau de l'AIP. Suite à l'étirement, la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  va augmenter de façon localisée dans la cellule dans une zone sous-membranaire. À ce niveau, une amplification du signal calcique peut s'effectuer par les RyR1 situés dans un microcompartiment calcique du RS. C'est justement dans cette région sous-membranaire qu'est situé le cytosquelette d'actine, important pour la contraction des CML et donc pour le tonus myogénique. En outre, les mitochondries ont un rôle majeur dans ce processus puisqu'elles régulent l'homéostasie calcique. De par leur localisation en sous-membranaire et proche du RS, elles vont permettre de tamponner le  $\text{Ca}^{2+}$  du cytoplasme. Toute cette voie de signalisation particulière en réponse à une contrainte mécanique de la membrane plasmique peut s'effectuer grâce à l'agencement de microdomaines calciques dans les CML d'AIP.

À l'inverse de l'étirement, un stimulus hormonal tel que l'ET-1 augmente la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  dans une zone périnucléaire. De précédentes études ont montré que la fixation de l'ET-1 sur son récepteur entraîne une production de NAADP qui libère du  $\text{Ca}^{2+}$  des lysosomes. Or, nous l'avons confirmé ici, les lysosomes sont préférentiellement localisés dans une zone périnucléaire où l'on retrouve également des RyR3 au niveau du RS. L'ET-1 induit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  par les lysosomes et par RyR3 du RS périnucléaire puisque les réponses calciques à l'ET-1 sont inhibées par le ned-19, le dantrolène et la thapsigargine. Ainsi, un autre microdomaine calcique, distinct de celui mobilisé par l'étirement, permet aux CML d'AIP de répondre de façon différentielle à l'ET-1.

Nous l'avons constaté, bien que le RS soit considéré comme un compartiment continu, il présente différentes réserves calciques indépendantes grâce à une compartimentalisation des protéines impliquées dans son homéostasie calcique telles que les SERCA et les RyR. Dans une zone sous-membranaire sont exprimés les RyR1 et les pompes SERCA2b alors que dans une zone périnucléaire sont exprimés les RyR3 et les pompes SERCA2a. Les RyR et les SERCA ne sont donc pas distribués de façon aléatoire au niveau du RS. L'activité de l'un est intrinsèquement liée à l'activité de l'autre, de façon synchronisée<sup>391</sup>. Ici, chaque isoforme de SERCA2 semble être impliquée dans le remplissage d'un microcompartiment du RS associé à une isoforme de RyR. Une transfection de RyR1 ou de RyR3 dans des cellules HEK induit des réponses calciques localisées dans des régions du

RE distinctes<sup>392</sup>. Cette différence de distribution spatiale des différentes isoformes de RyR n'est pas spécifique au muscle lisse de l'AIP. En effet, chaque lit vasculaire semble présenter une sublocalisation cellulaire particulière des RyR. Ainsi, dans les artères cérébrales, RyR2 est majoritairement exprimé dans une zone sous-membranaire, RyR1 dans une zone extrapéri nucléaire et RyR3 en péri nucléaire<sup>14</sup>. Les artères basilaires et fémorales expriment majoritairement des RyR3<sup>393</sup> alors que les artères et artérioles du muscle crémaster expriment majoritairement des RyR2<sup>394</sup>. De plus, dans les CML de bronches, RyR1 et RyR2 sont exprimés dans une zone sous-membranaire alors que RyR3 est en péri nucléaire<sup>387</sup>.

A travers ces études, il semble que dans les CML natives, RyR3 soit majoritairement exprimé dans une zone péri nucléaire alors que RyR1 et RyR2 sont plutôt présents dans une zone sous-membranaire. Cette localisation particulière des isoformes de RyR sous-tendrait des fonctions particulières avec notamment des différences d'amplitude et de cinétique des réponses calciques. Si dans l'AIP, la localisation de RyR3 est impliquée dans l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  par l'ET-1, sa présence dans une zone péri nucléaire dans de nombreux types de CML pourrait également être liée à une augmentation de la  $[Ca^{2+}]$  dans le noyau et dans la transcription de gènes par exemple. Par ailleurs, dans les CML d'artères cérébrales et dans les CML bronchiques la sortie de  $Ca^{2+}$  des RyR1/2 est responsable de l'activation de canaux  $BK_{Ca}$ , de l'hyperpolarisation et de la relaxation des CML. A l'inverse, dans les AIP, la sortie de  $Ca^{2+}$  du RS par RyR1 n'activerait pas les  $BK_{Ca}$  dont l'activation est plutôt liée à l'entrée de  $Ca^{2+}$  par les SAC. Ceci suggère que les SAC et les  $BK_{Ca}$  sont intimement liés dans l'AIP afin de conduire à une hyperpolarisation à l'effet contractant. En effet, cette hyperpolarisation augmente le gradient électrochimique du  $Ca^{2+}$  en faveur d'un influx de  $Ca^{2+}$  par les SAC tant que ceux-ci sont activés par un étirement.

Ainsi, l'organisation subcellulaire des différentes réserves calciques (mitochondries, lysosomes ou différents compartiments du RS) permet aux CML de fournir un signal calcique adapté à des stimuli indépendants (mécaniques ou hormonaux par exemple) grâce à une communication spatiotemporelle des organites par l'intermédiaire du  $Ca^{2+}$ . Cette diversité dans la sublocalisation des réserves calciques en fonction des CML indiquerait que le  $Ca^{2+}$  n'est pas anonyme et dispose d'une signature calcique particulière.

De façon remarquable, cet arrangement des réserves calciques dans les CML d'AIP est modifié dans le cas d'une HTP induite chez le rat par une hypoxie chronique (HC) ou par la monocrotaline (MCT). Dans ces deux modèles, les mitochondries et les lysosomes présentent une distribution subcellulaire moins ségréguée que celle que l'on observe chez les rats normaux. De plus, chez les rats HC, un nouveau compartiment sous-membranaire associant RyR3 et SERCA2b se met en place à côté de celui contenant RyR1 et SERCA2a. Chez les rats MCT, la distribution des protéines du RS est plus dramatique puisque la ségrégation des RyR et des SERCA est complètement modifiée, chaque isoforme étant exprimée de façon diffuse dans les CML. Cette réorganisation chez les rats MCT où l'on a non seulement une

augmentation du nombre de mitochondries mais aussi une redistribution des RyR et SERCA rappelle ce que l'on peut observer dans des CML à l'état prolifératif en culture. Ceci pourrait refléter la transition des CML issues de rats MCT vers un phénotype prolifératif plutôt que quiescent. Toutefois, les mécanismes impliqués dans l'adressage des isoformes de RyR et de SERCA à un compartiment spécifique du RS restent inconnus. Ces modifications de l'organisation intracellulaire dans l'HTP conduisent à une modification de la signalisation calcique en réponse à l'étirement. Les CML d'AIP y sont plus sensibles puisque l'on constate une augmentation de l'activité des SAC, de l'influx de  $Ca^{2+}$  mais également de l'amplification par les RyR et par les  $IP_3R$ . De plus, une association fonctionnelle entre le RS et les cavéoles se met en place chez les rats HC et conduirait à augmenter la  $[Ca^{2+}]_i$  à la suite d'un étirement et donc à augmenter le tonus myogénique. Ainsi, la spécificité des voies de signalisations calciques que l'on observait chez les rats normaux est altérée dans l'HTP en raison d'un profond remodelage au niveau subcellulaire des partenaires calciques.

Les résultats qui suivent présentent l'implication d'une autre isoforme de SERCA dans les AIP et dans l'HTP : les SERCA3 (Pages 129 à 133), ainsi qu'une étude du rôle des cavéoles dans les réponses calciques à l'étirement chez les rats souffrant d'HTP (Pages 135 à 149).

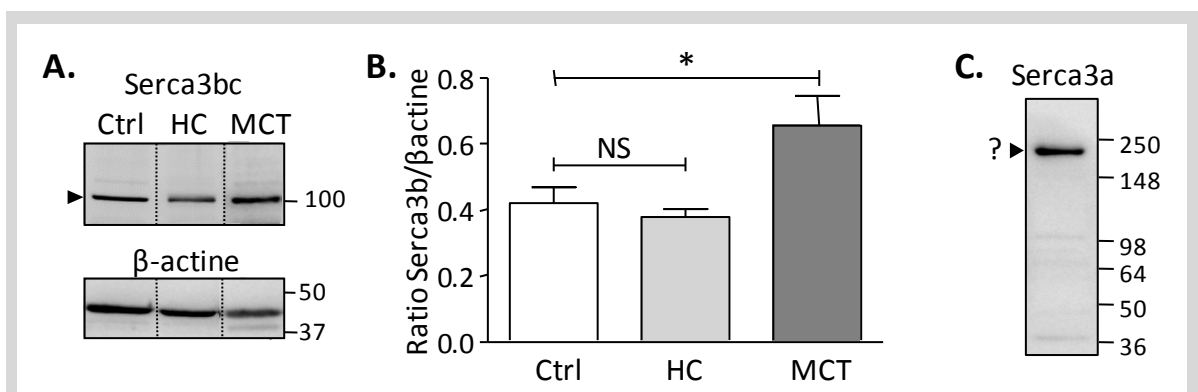


## Les SERCA3 dans les artères intrapulmonaires

Il apparait clairement à présent que les SERCA2a et 2b jouent un rôle très important dans l'homéostasie calcique dans les CML d'AIP, tant chez les rats normaux que chez les rats souffrant d'HTP. Mais qu'en est-il des autres isoformes de SERCA ? A priori, les SERCA1 ne sont pas exprimées dans l'AIP<sup>240</sup>. Par contre, la présence des SERCA3 est incertaine dans ce tissu. En effet, chez l'humain elles sont exprimées dans les cellules endothéliales d'AIP<sup>237</sup> et chez le rat elles sont exprimées dans l'AIP au niveau de l'ARNm mais pas au niveau protéique<sup>240</sup>. Afin d'éclaircir cette ambiguïté sur la présence des SERCA3 dans l'AIP, nous avons cherché à mettre en évidence par différentes techniques grâce à des anticorps spécifiques anti SERCA3a et SERCA3bc, fournis par le Dr Régis BOBE de Paris. La question qui suit est de savoir si elles joueraient un rôle dans la signalisation calcique dans l'HTP.

### 1. Mise en évidence des SERCA3 dans les AIP par Western Blot

Nous avons dans un premier temps déterminé la présence des SERCA3 dans les AIP de rats par western blot grâce à un anticorps dirigé contre les isoformes SERCA3bc (**Figure 50A**) ou SERCA3a (**Figure 50C**). Les AIP expriment SERCA3bc puisque l'anticorps détecte une bande à 100 kDa correspondant au poids moléculaire attendu. Par contre, pour SERCA3a, l'anticorps ne détecte pas de bande vers 100 kDa mais à environ 200 kDa (**Figure 50C**). Cette bande de nature inconnue pourrait correspondre à un dimère de SERCA3a. L'expression de SERCA3bc ne varie pas chez les rats HC en comparaison aux rats Ctrl alors qu'elle augmente significativement chez les rats MCT (**Figure 50B**).



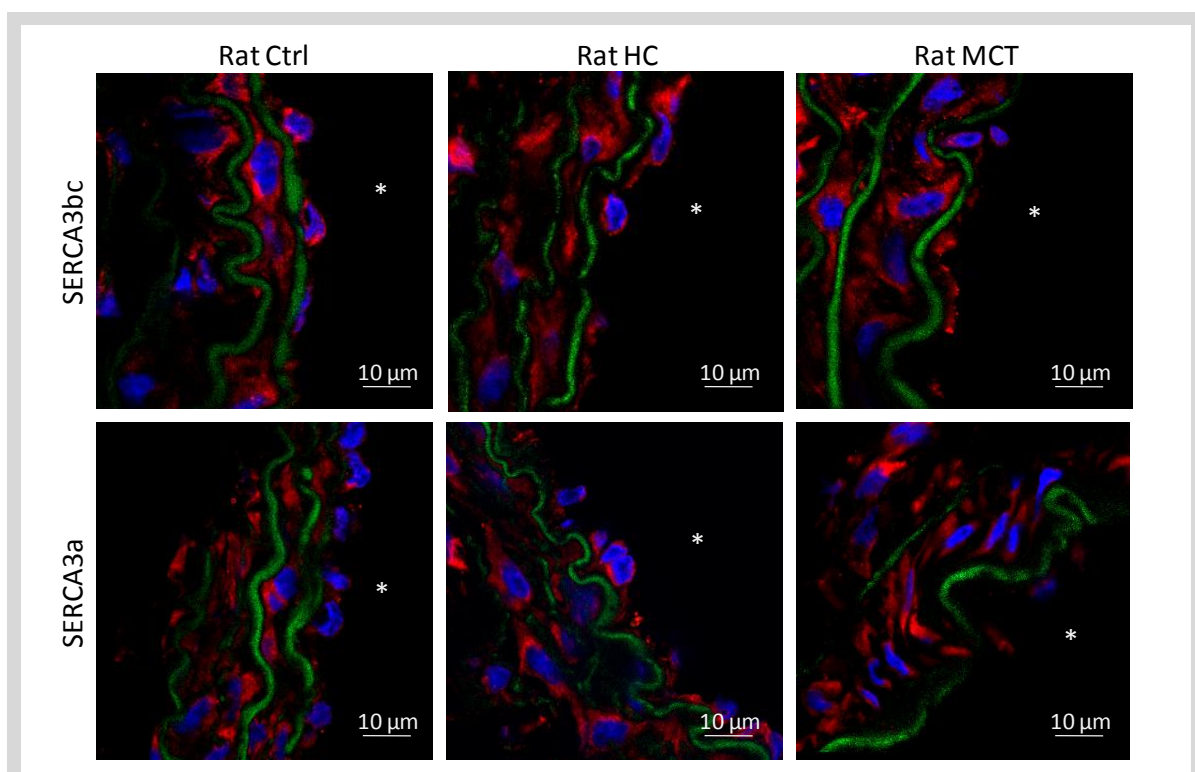
**Figure 50** : Western Blot SERCA3. **A.** Expression de SERCA3bc (~100 kDa) et de la  $\beta$ -actine dans les AIP de rats contrôles (Ctrl), hypoxiques chroniques (HC) et monocrotaline (MCT). **B.** Expression de SERCA3bc normalisée sur la  $\beta$ -actine. L'expression de SERCA3bc augmente significativement chez les rats MCT. N=6 rats pour chaque condition. **C.** Western blot de SERCA3a sur un AIP d'un rat Ctrl. On observe une bande à ~200 kDa.



## 2. Mise en évidence des SERCA3 dans les AIP par immunomarquages

### A. Immunomarquages sur coupes d'AIP

Afin de savoir dans quelles cellules de l'AIP sont exprimées les SERCA3 précédemment caractérisées par western blot, des marquages sur coupes d'artères ont été effectués. Sur les coupes, les cellules endothéliales sont en contact avec la lumière du vaisseau (\*) et sont séparées des CML par la limitante élastique interne qui autofluoresce en vert. Les noyaux des cellules sont marqués en bleu. L'observation des coupes d'AIP au microscope confocal montre la présence de SERCA3a et de SERCA3bc en rouge, à la fois dans les cellules endothéliales et dans les CML d'AIP de rats Ctrl, HC et MCT (**Figure 51**).

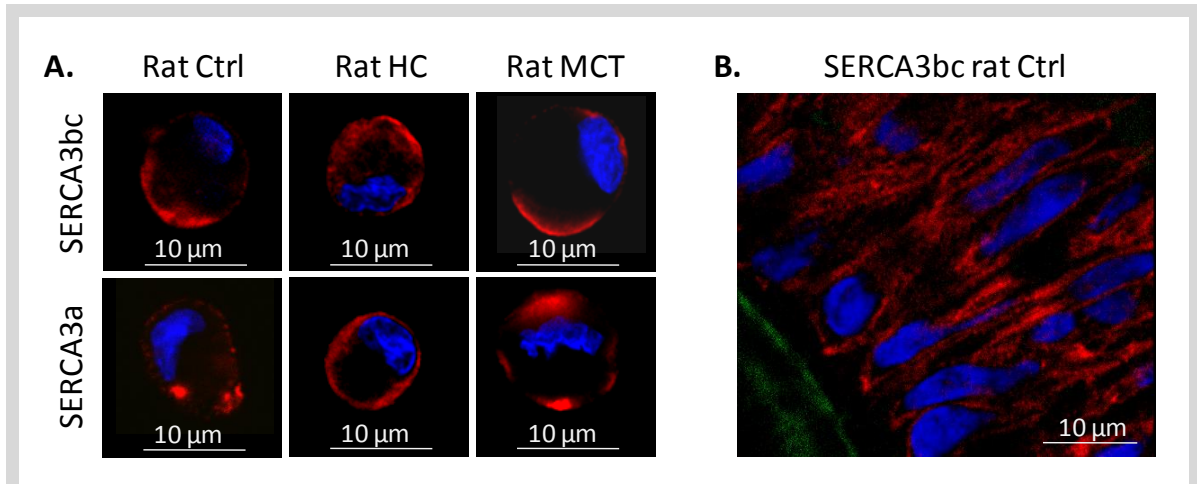


**Figure 51** : Immuno-marquages de SERCA3a et 3bc sur des coupes transversales d'AIP de rats Ctrl, HC et MCT en microscopie confocale. (\*) représente la lumière de l'AIP. Les SERCA3 sont à la fois exprimées dans les CE et les CML. Images représentatives d'expériences réalisées sur 3 rats différents.

### B. Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées et sur AIP en *en face*

Pour préciser la localisation subcellulaire des deux isoformes de SERCA3, des marquages ont été réalisés sur des CML d'AIP fraîchement dissociées de rats Ctrl, HC et MCT. Le marquage des noyaux est en bleu et le marquage des deux isoformes SERCA3 est en rouge. On observe, aussi bien chez les rats Ctrl que HC ou MCT, que les SERCA3 sont plutôt

localisées dans une zone sous-membranaire (**Figure 52A**). Cette présence des SERCA3 dans cette zone est confirmée par un marquage en *en face* sur artère entière (**Figure 52B**).

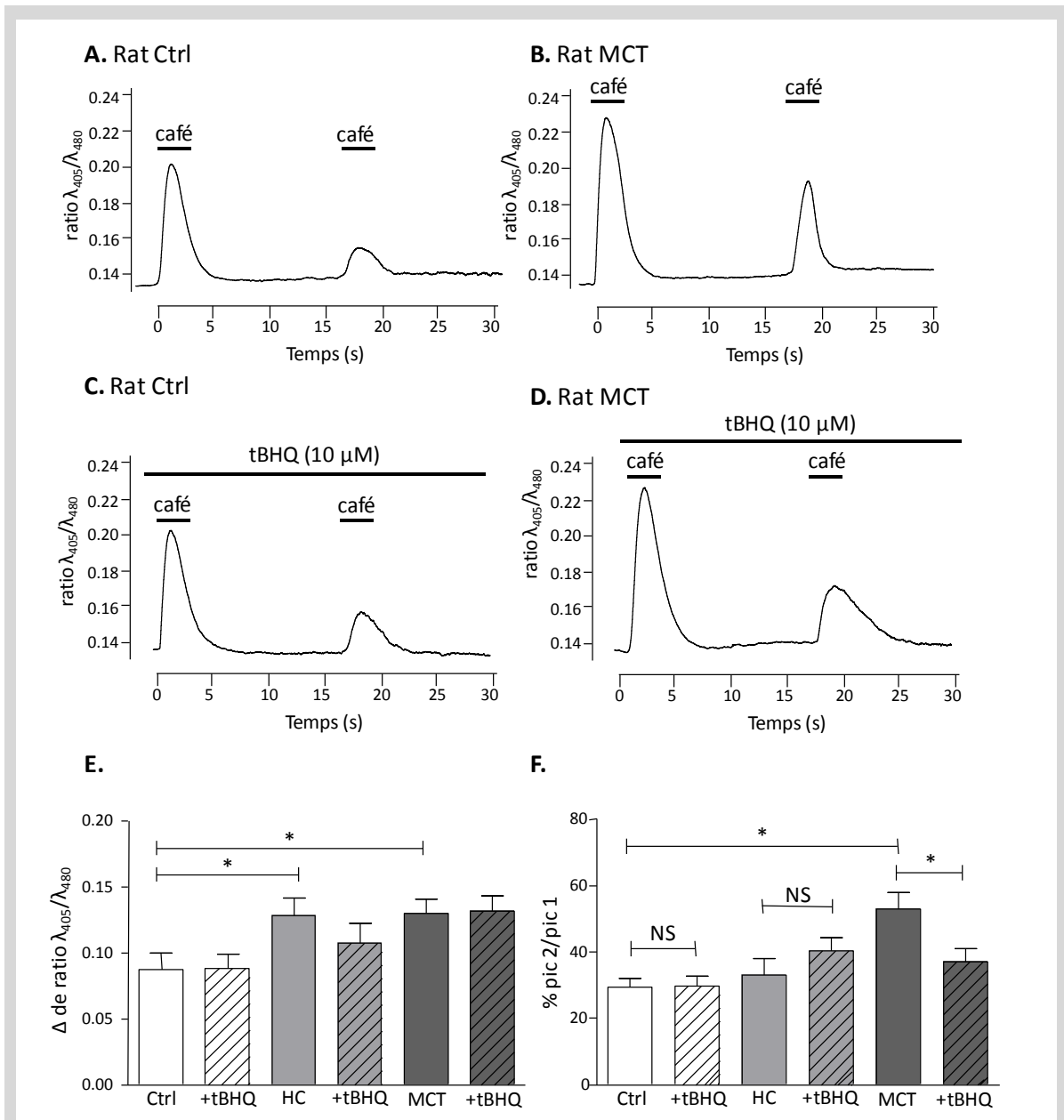


**Figure 52** : Immunomarquages en microscopie confocale sur CML fraîchement dissociées de rats Ctrl, HC et MCT (**A**) et en *en face* sur AIP entière d'un rat Ctrl (**B**). Les images sont représentatives de 6 dissociations différentes pour le A. Les noyaux sont marqués en bleu.

### 3. Les SERCA3 dans l'homéostasie calcique des CML d'AIP

Pour mettre en évidence le rôle des SERCA3 dans la recharge du RS des CML d'AIP, nous avons utilisé un protocole à double application de caféine, un agoniste des RyR. La première éjection de caféine provoque une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  due à la libération de  $Ca^{2+}$  des stocks du RS via les RyR. La deuxième éjection réalisée 20 secondes après la première induit un second pic calcique plus faible (**Figure 53A à D**) car les stocks calciques du RS n'ont pas eu le temps de se recharger totalement par les SERCA. Ainsi, le rapport de l'amplitude 2<sup>ème</sup> pic/1<sup>er</sup> pic permet d'estimer la recharge du RS. Plus ce rapport est grand, plus la recharge du RS par les SERCA est importante. On constate que les réponses à la caféine, pour le premier et le second pic, sont plus importantes chez les rats MCT et HC que chez les rats Ctrl (**Figure 53E**).

Afin de mettre en évidence l'implication des SERCA3 dans cette recharge du RS, nous avons utilisé un inhibiteur sélectif des SERCA3 : le tBHQ (2,5-di-(tbutyl)-1,4-tert-benzohydroquinone). On observe que le tBHQ inhibe significativement la deuxième réponse calcique et donc la recharge du RS uniquement chez les rats MCT (**Figure 53F**).



**Figure 53** : Signalisation calcique en réponse à la caféine mesurée en indo-1. Exemple de traces chez un rat Ctrl (A) et MCT (B) suite à une stimulation aiguë à la caféine (café - 10  $\mu$ M). Exemple de traces chez un rat Ctrl (C) et MCT (D) en présence de l'inhibiteur des SERCA3, le tBHQ (10  $\mu$ M). E. Amplitude moyenne du premier pic calcique (donné en  $\Delta$  de ratio  $\lambda_{405}/\lambda_{480}$ ) en réponse à la caféine, en présence ou en absence de tBHQ, chez des rats Ctrl, HC et MCT. F. Rapport en pourcentage du deuxième pic calcique sur le premier, suite à l'éjection de caféine en absence ou en présence de tBHQ. n = 12-15 cellules pour chaque expérience. NS : non significatif.

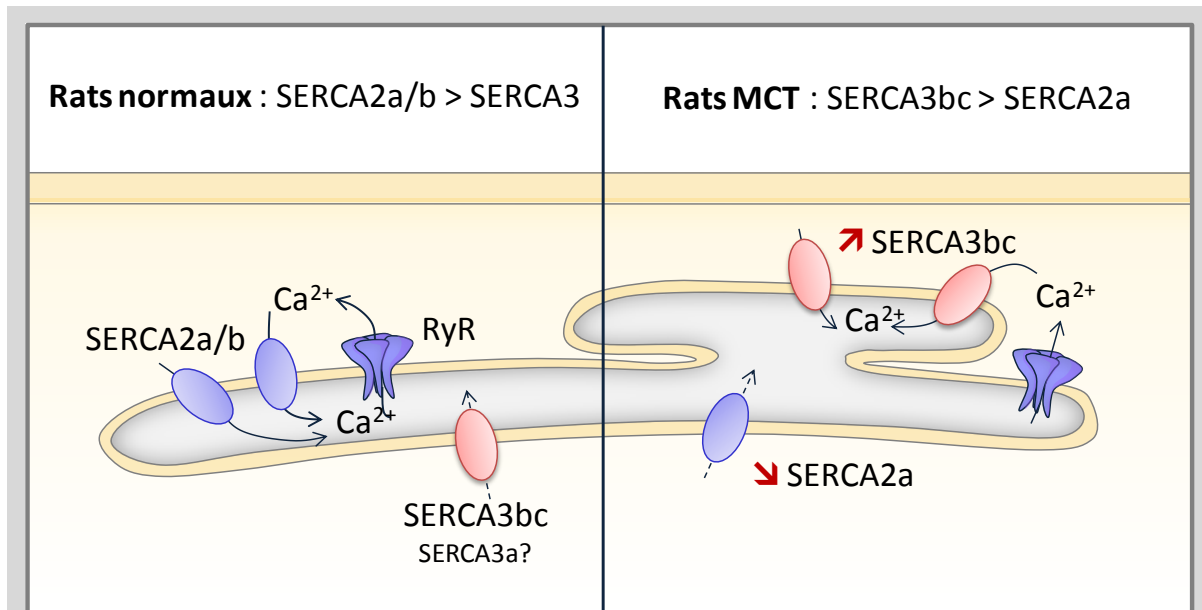
#### 4. Discussion autour des SERCA3

Pour la première fois, nous avons mis en évidence la présence des pompes SERCA3a et SERCA3bc dans les AIP de rats, grâce à des techniques de western blot et d'immunomarquages. L'observation des coupes d'AIP permet de les localiser dans les CE comme cela avait déjà été montré chez l'homme mais également au niveau des CML. A ce niveau, les 2 isoformes de SERCA3 semblent avoir une localisation sous-membranaire. Enfin, le western blot indique une augmentation significative de l'expression des SERCA3bc chez les rats MCT. Quant aux SERCA3a, il se pourrait qu'elles soient exprimées sous forme de dimères comme le suggère le western blot.

L'étude fonctionnelle des SERCA3 est réalisée grâce à des stimulations à la caféine sur des CML d'AIP fraîchement dissociées. La première éjection de caféine a pour effet d'augmenter la  $[Ca^{2+}]_i$  de façon transitoire par une vidange rapide du RS par les RyR. On constate que l'amplitude du pic calcique induit par la caféine est plus importante chez les rats présentant une HTP que chez les rats Ctrl. Deux hypothèses pourraient l'expliquer : (1) soit le RS contient plus de  $Ca^{2+}$ , (2) soit les RyR seraient davantage exprimés ou plus actifs chez les rats ayant une HTP.

Ensuite, l'état de recharge du RS par les SERCA est révélé par une seconde application de caféine après 20 secondes. L'homéostasie calcique du RS est maintenue par un équilibre entre les protéines de libération du  $Ca^{2+}$  (RyR) et de recharge (SERCA2 et 3). La **Figure 53F** montre que le rapport du pic 2/pic 1 (en %) est plus élevé chez les rats MCT que chez les rats Ctrl ou HC. Ceci conforte l'idée que le RS se recharge plus vite via les SERCA, notamment chez les rats MCT.

Pour vérifier l'implication des SERCA3 dans la recharge du RS, nous les avons inhibées avec du tBHQ. La concentration utilisée (10  $\mu$ M) correspond à une concentration permettant d'inhiber sélectivement les SERCA3 et faiblement les SERCA2<sup>232</sup>. Chez les rats Ctrl et HC, l'amplitude des deux réponses à la caféine n'est pas modifiée en présence de tBHQ. À l'inverse, chez les rats MCT uniquement, le rapport du pic 2/pic 1 (en %) est significativement moins important en présence de tBHQ. Ceci permet d'étayer l'hypothèse d'une recharge plus importante du RS par les SERCA3 chez les rats MCT. Cette recharge peut être due à deux mécanismes : (1) à la fois une expression plus importante des SERCA3 chez les rats MCT, comme on l'observe en western blot et (2) par une augmentation de son activité. En effet, les SERCA3 présentent une affinité plus faible pour le  $Ca^{2+}$  que les SERCA2. Autrement dit, les SERCA3 vont fonctionner pour de plus fortes  $[Ca^{2+}]_i$ . Il est possible que chez les rats Ctrl, l'activité des SERCA2 soit prépondérante dans la recharge du RS et masquerait celle des SERCA3. Par contre, dans une condition pathologique, comme chez les rats MCT, où l'homéostasie calcique est modifiée et où de nombreux stimuli entraînent une augmentation plus importante de la  $[Ca^{2+}]_i$ , les SERCA3 vont pouvoir être plus actives, au détriment des SERCA2a et SERCA2b dont l'expression diminue (**Figure 54**).



**Figure 54** : Chez les rats normaux, la recharge du réticulum sarcoplasmique (RS) en Ca<sup>2+</sup> se fait majoritairement par les pompes SERCA2a et SERCA2b. Les SERCA3 sont présentes mais leur activité serait masquée par celle des SERCA2. Par contre, chez les rats MCT, l'expression des SERCA2a diminuant, celle des SERCA3bc va augmenter pour prendre le relais et recharger le RS en Ca<sup>2+</sup>.

La principale limite de cette étude est l'utilisation du tBHQ, qui, même s'il est considéré comme inhibant plus sélectivement les SERCA3 que les SERCA2, reste un inhibiteur pharmacologique. Une approche complémentaire pourrait être l'utilisation d'anticorps bloquants, tel que le PL/IM430<sup>395</sup>. De plus l'application d'un inhibiteur de SERCA2 comme la thapsigargine et/ou l'acide cyclopiazonique permettrait de n'étudier que les variations calciques des SERCA3.

Alors qu'initialement seules les SERCA2a et 2b avaient été décrites dans les AIP, les systèmes permettant de réduire le Ca<sup>2+</sup> cytosolique et de recharger le RS par les Ca<sup>2+</sup>-ATPases dans les AIP semble être plus sophistiqué, impliquant également les SERCA3. De par leur localisation sous-membranaire et leur plus faible affinité au Ca<sup>2+</sup>, elles pourraient avoir un rôle spécifique que nous n'avons pas mis en évidence chez les rats Ctrl. Néanmoins ces SERCA3 semblent avoir un rôle plus important dans la recharge du RS au cours de l'HTP où elles sont surexprimées.

---

## Les cavéoles sont des réserves calciques impliquées dans la mécanotransduction dans l'hypertension pulmonaire

---

L'article dans Cardiovascular Research soulève une question : quel est le rôle des cavéoles dans l'hypertension pulmonaire et plus particulièrement dans les réponses calciques à l'étirement ne nécessitant pas de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire ?

Avant d'apporter des éléments de réponse à cette question, le premier point qui reste à élucider est la présence ou non de cavéoles dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires. La littérature est controversée à ce sujet : certains affirment qu'il n'y a pas de cavéoles dans les CML par des immunomarquages de faible résolution alors que d'autres auteurs en observent par microscopie électronique sur des CML en culture. Afin de répondre à cette première question, plusieurs techniques combinées ont été utilisées : immunomarquages sur coupes d'AIP, sur AIP en *en face*, sur CML fraîchement dissociées, western blot sur AIP entière désendothélialisée et microscopie électronique à transmission.

### 1. La cavéoline-1 est exprimée dans les CML d'AIP et forme des cavéoles

#### A. Immunomarquages de la Cav-1

Dans un premier temps, il était important de mettre en évidence dans les AIP la présence de la protéine nécessaire à la formation des cavéoles : la cavéoline-1 (Cav-1). On constate que, à la fois les CE et les CML, présentent un marquage de la Cav-1 sur des coupes d'AIP (**Figure 55A**) et sur un marquage d'AIP en *en face* (**Figure 55C**). Le marquage est en périphérie des cellules suggérant que la majorité de la Cav-1 est exprimée au niveau de la membrane plasmique dans les deux types cellulaires.

#### B. Expression de la Cav-1 dans l'AIP

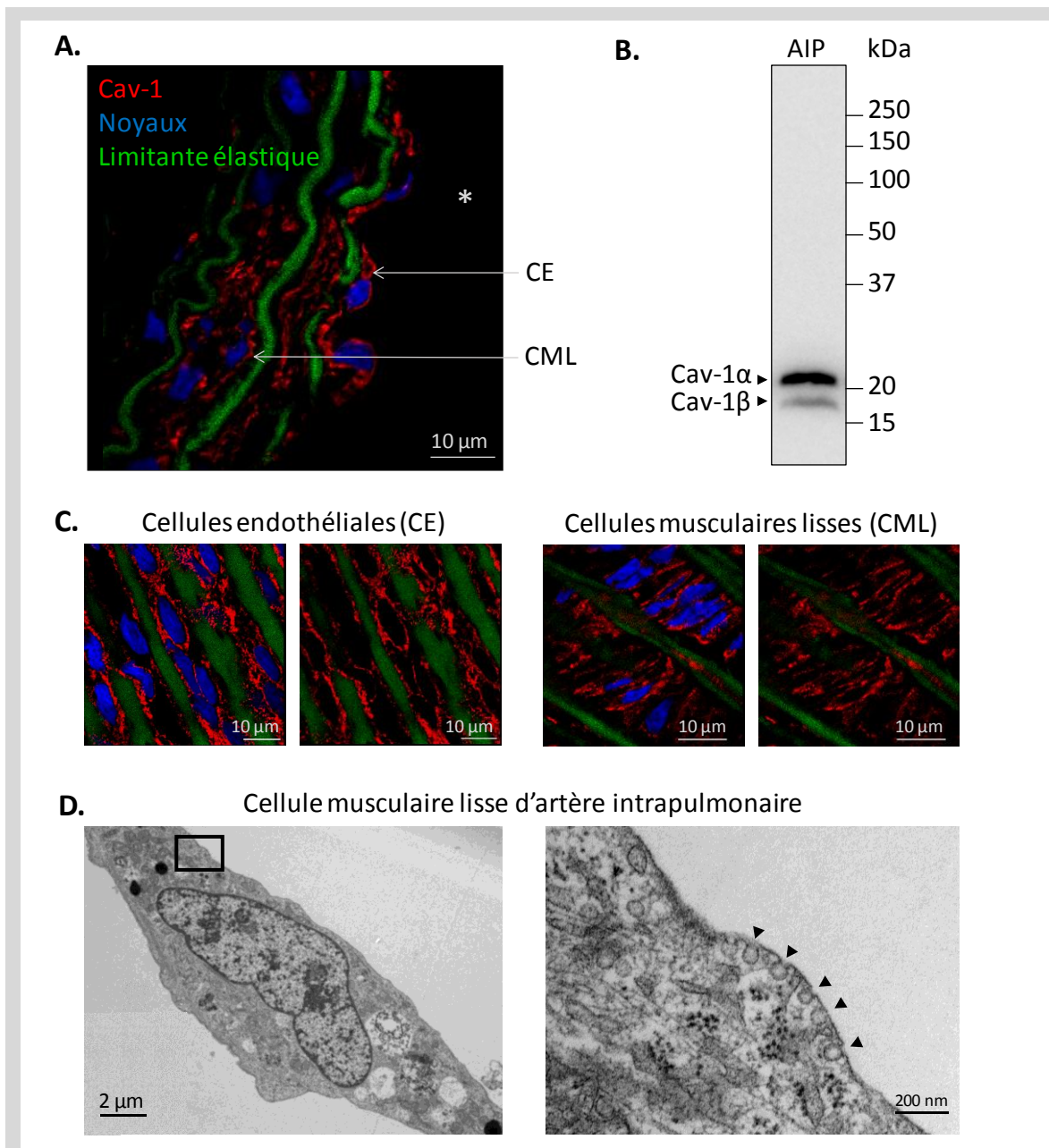
Afin de valider l'anticorps utilisé en immunomarquage et de confirmer l'expression de la Cav-1 dans l'AIP et plus particulièrement dans les CML, un western blot est réalisé en condition dénaturante sur un extrait d'AIP sans endothélium. On observe la présence de deux bandes. Chaque bande correspond à une isoforme de la Cav-1 : la bande à ~22 kDa correspond à la Cav-1 $\alpha$  et la bande à ~19 kDa à la Cav-1 $\beta$  (**Figure 55B**).

#### C. Présence de cavéoles en microscopie électronique

Les cavéoles sont des structures de la membrane plasmique de 100 nm. La limite de résolution du microscope confocal étant de 200 nm, celui-ci ne nous permet donc pas d'observer des cavéoles isolées. Pour pallier cela, des acquisitions de CML fraîchement dissociées ont été réalisées en microscopie électronique à transmission dont la résolution



est de l'ordre de 2 Å. On observe la présence de cavéoles en forme de U au niveau de la membrane plasmique, ce qui confirme leur présence dans les CML d'AIP (**Figure 55D**).

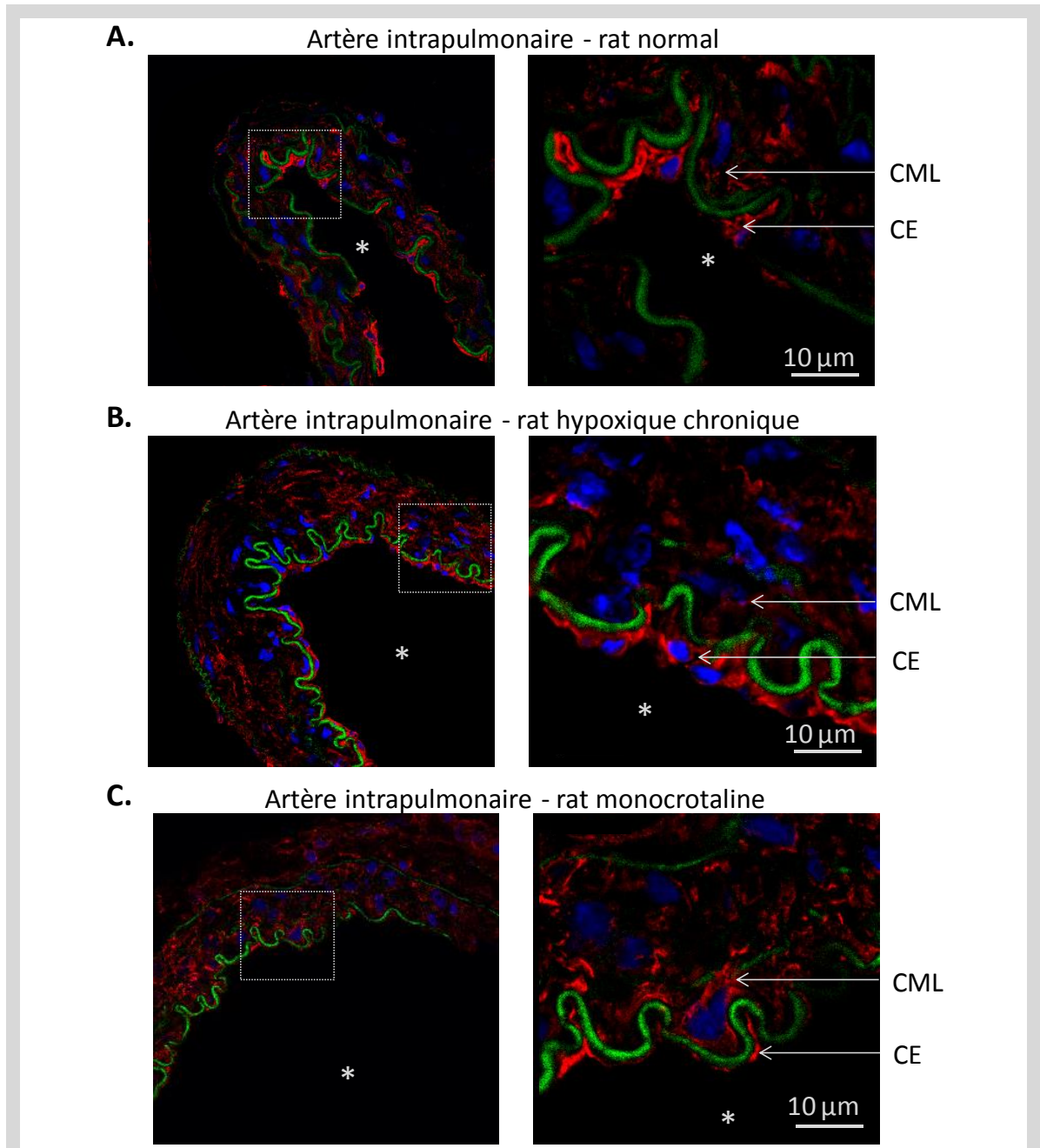


**Figure 55** : Expression de la Cav-1 dans les CML d'AIP. **A.** Immunomarquage de la Cav-1 (en rouge) sur une coupe d'AIP d'un rat Ctrl en microscopie confocale. Les noyaux sont en bleu et la limitante élastique interne autofluoresce en vert et permet de délimiter les CE en contact avec la lumière de l'AIP (\*) des CML. **B.** Western blot de la Cav-1 à partir d'un extrait d'AIP de rat. On observe deux bandes ~20 kDa qui correspondent aux deux isoformes de la Cav-1. **C.** Immunomarquage de la Cav-1 en *en face* sur une AIP. La Cav-1 est présente sur les CE et les CML. Les noyaux sont en bleu et la limitante élastique en vert. **D.** Microscopie électronique à transmission d'une CML fraîchement dissociée de rats Nx. On constate la présence de cavéoles en U au niveau de la membrane plasmique (▼).

## 2. Expression de la Cav-1 dans les AIP de rats HTP

### A. Immunomarquages de la Cav-1

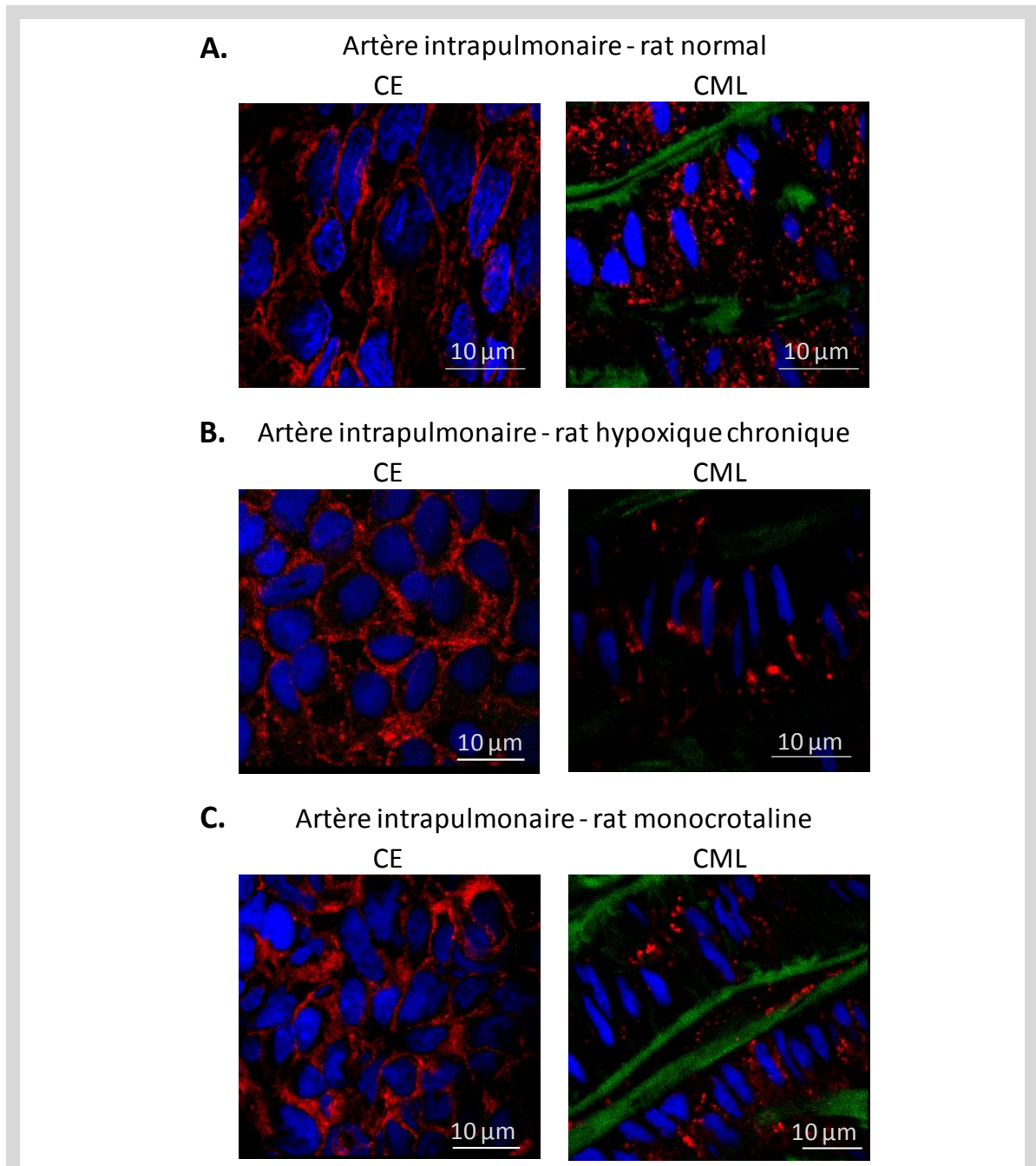
C'est à présent certain, les CML d'AIP de rats normaux expriment la Cav-1 et possèdent des cavéoles. Qu'en est-il de l'expression de la Cav-1 dans l'HTP ? Pour le savoir, des immunomarquages sur coupes (**Figure 56**) et en *en face* (**Figure 57**) ont été réalisés sur des AIP issues de deux modèles de rats souffrant d'HTP : les rats MCT et HC



**Figure 56** : Immunomarquage de la Cav-1 (en rouge) sur une coupe d'AIP d'un rat Ctrl (A), HC (B) et MCT (C) en microscopie confocale. Les noyaux sont en bleu et la limitante élastique interne qui autofluoresce en vert permet de délimiter les CE en contact avec la lumière de l'AIP (\*) des CML.



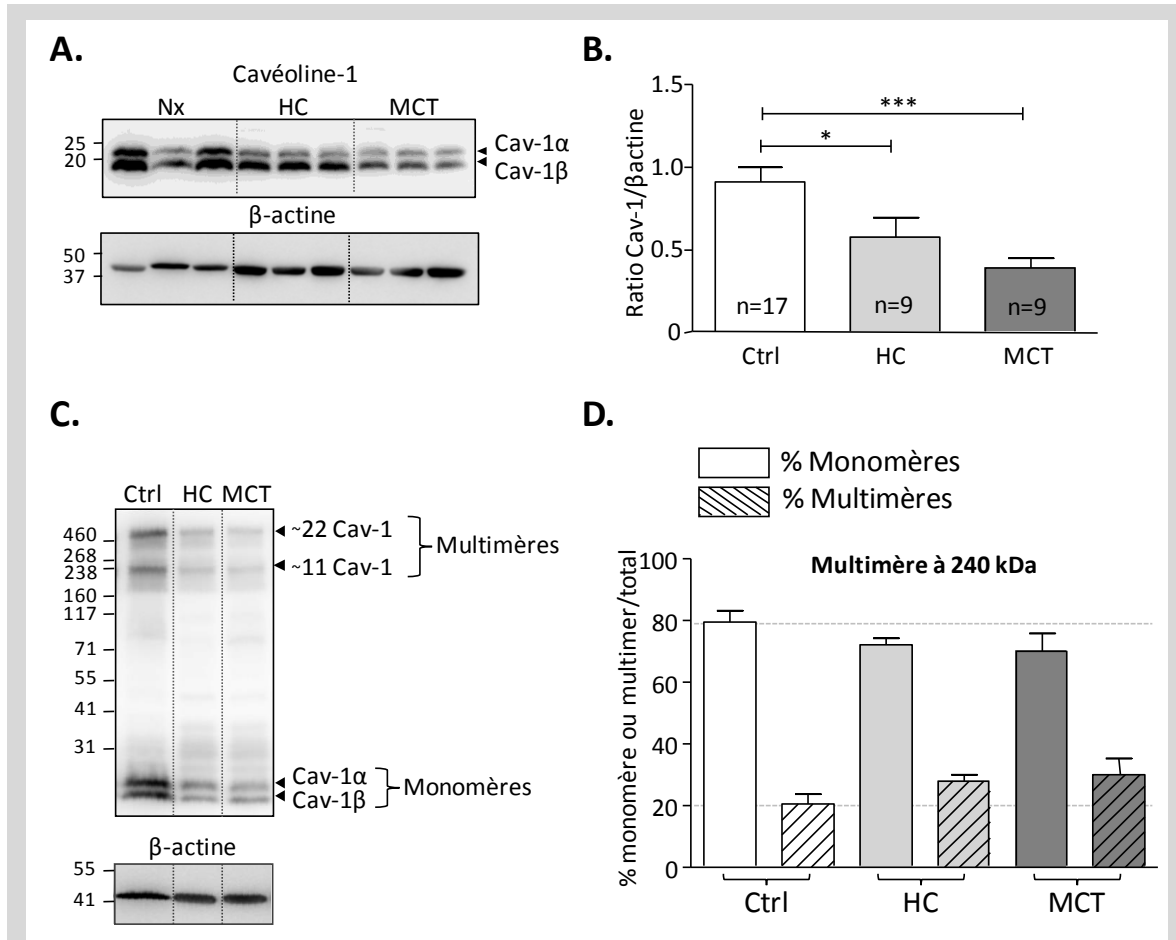
On constate que les CML et les CE des rats HC et MCT expriment également la Cav-1. Il est intéressant de noter que, d'après l'intensité de fluorescence, les CE semblent exprimer beaucoup plus de Cav-1 que les CML. De plus, dans les CML, le marquage de la Cav-1 est punctiforme.



**Figure 57** : Immunomarquage de la Cav-1 (en rouge) sur des AIP en *en face* d'un rat Ctrl (A), HC (B) et MCT (C) en microscopie confocale. Les noyaux sont en bleu, la limitante élastique interne autofluoresce en vert.

B. Expression de la Cav-1 en western blot

En condition dénaturante sur des extraits d'AIP entières, l'expression de la Cav-1 diminue à la fois chez les rats HC et MCT par comparaison avec les rats Ctrl (**Figure 58A etB**).



**Figure 58** : Expression de la Cav-1 chez les rats HTP. **A.** Exemple de western blot de la Cav-1 en condition dénaturante d'extrait d'AIP de 3 rats Ctrl, HC et MCT. **B.** Normalisation de la Cav-1 par rapport à la β-actine. L'expression de la Cav-1 diminue chez les rats HC et MCT. **C.** Exemple de western blot en condition non dénaturante (les échantillons ne sont pas chauffés) d'AIP sans endothélium de rats Ctrl, HC et MCT. On observe des monomères ~20 kDa et des multimères de Cav-1 ~240 kDa et ~260 kDa. **D.** % de monomères ou de multimères à 240 kDa par rapport à la quantité totale (monomères + multimères 240), normalisé par la β-actine (N=3 rats).

Lors de l'adressage de la Cav-1 au niveau de la membrane plasmique, celle-ci s'associe en multimères. Afin de savoir si dans les CML d'AIP la Cav-1 forme ces multimères, des western blots sont réalisés en condition non dénaturante. Le tampon d'extraction utilisé pour le western blot est riche en agents qui solubilisent les lipides des membranes (Triton X100, SDS, NP-40). Il dissocie les protéines des lipides mais ne permet pas de dissocier les multimères de Cav-1 liés par du cholestérol. Pour les séparer, il est nécessaire de chauffer les

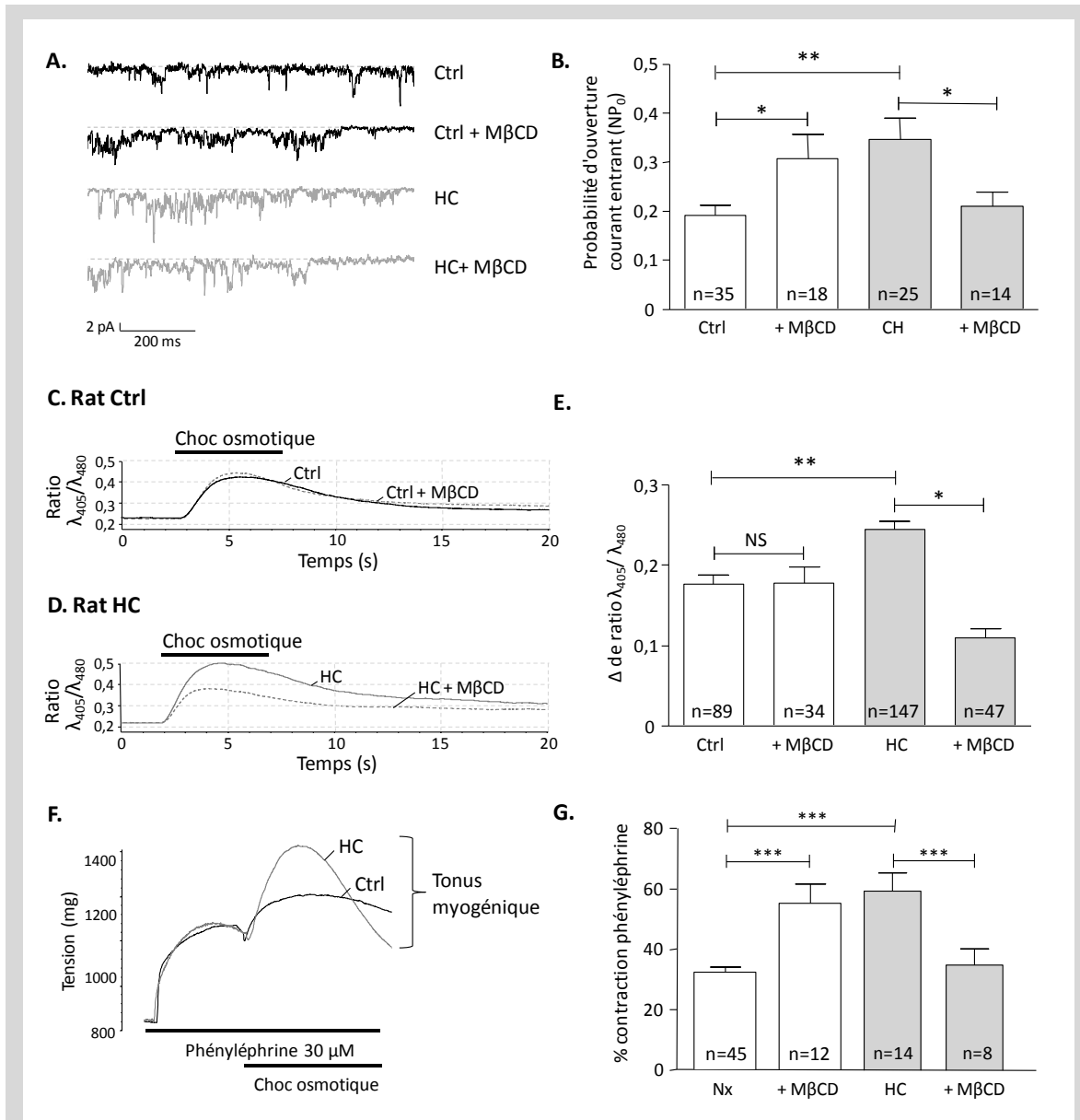
échantillons. En effet, en absence de chauffage des échantillons, on pourra observer les multimères de Cav-1. La **Figure 58C** montre que les CML d'AIP possèdent des multimères de Cav-1 d'environ 240 et 460 kDa, ce qui correspondrait à l'association de 11 et 22 Cav-1 respectivement. On observe chez les rats HC et MCT une diminution significative de l'expression des monomères et des multimères de Cav-1. Cependant, le pourcentage de multimères de 240 kDa par rapport à la quantité totale de Cav-1 augmente chez les rats HC et MCT alors que le pourcentage de monomères diminue (**Figure 58D**). Le pourcentage de multimères de 460 kDa par rapport à la quantité totale de Cav-1 ne varie pas (donnée non présentée). Autrement dit, même si la quantité totale de Cav-1 diminue chez les rats HC et MCT, parmi les Cav-1 qui restent, il y a davantage de multimères de 240 kDa.

### **3. Les cavéoles participent à la sensibilité à l'étirement des CML d'AIP**

Si les cavéoles sont présentes au niveau de la membrane plasmique des CML d'AIP, jouent-elle un rôle dans la sensibilité de la membrane à l'étirement ? Pour le savoir, des étirements de -40 mmHg sont effectués en configuration cellule attachée sur des CML d'AIP fraîchement dissociées, en présence d'un destructeur des cavéoles : la méthyl- $\beta$ -cyclodextrine (M $\beta$ CD – 5 mM). On constate que chez les rats contrôles (Ctrl), la probabilité d'ouverture des SAC augmente en présence de M $\beta$ CD. A l'inverse, chez les rats HC, la probabilité d'ouverture des SAC diminue en présence de M $\beta$ CD (**Figure 59A et B**). Le nombre de n sur le bar graph représente le nombre de cellules testées pour chaque condition.

Un protocole d'étirement par un choc osmotique est ensuite réalisé afin de mesurer les variations de la  $[Ca^{2+}]_i$  avec la sonde calcique indo-1. On constate que les réponses calciques au choc osmotique ne sont pas modifiées en présence de M $\beta$ CD chez les rats contrôles alors qu'elles sont réduites chez les rats HC. De plus, les CML d'AIP de rats HC présentent une plus forte réponse calcique au choc osmotique que les cellules des rats Ctrl (**Figure 59C, D et E**).

Le choc osmotique étant capable d'induire une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  dans les CML, engendre t-il une contraction de l'AIP pour autant ? Pour le savoir, des chocs osmotiques sont réalisés sur des AIP entières et la force de contraction (tension) est mesurée dans des cuves à organe isolé. Afin de s'affranchir d'un effet de l'endothélium, le NO est bloqué par du L-NAME (100  $\mu$ M). Les artères sont précontractées à la phényléphrine (30  $\mu$ M) afin de normaliser les résultats de la contraction au choc osmotique. Cette précontraction est nécessaire pour observer une contraction au choc osmotique. On constate qu'un choc osmotique induit une contraction de l'AIP chez les rats Ctrl. Cette contraction est significativement plus importante chez les rats HC, ce qui conforte les résultats observés pour la mesure de  $Ca^{2+}$  et l'hyper-réactivité déjà décrite dans la littérature chez ces rats pour le tonus myogénique isobarique et isométrique. Comme pour l'activité des SAC et les réponses calciques, la M $\beta$ CD augmente la contraction au choc osmotique chez les rats Ctrl alors qu'elle la diminue chez les rats HC (**Figure 59F et G**).

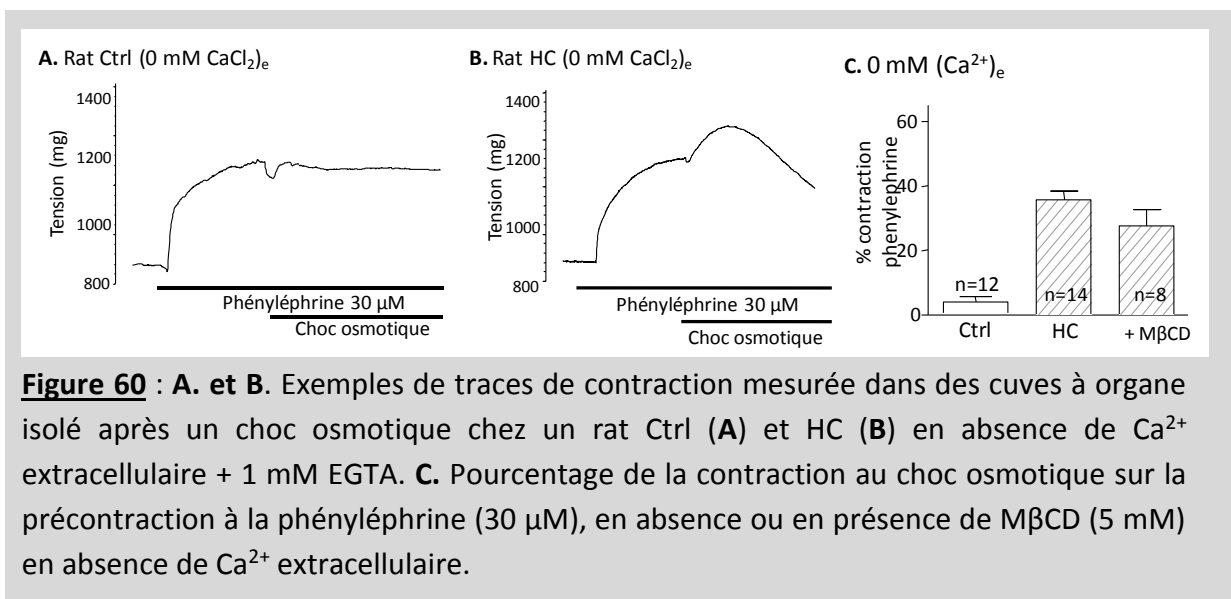


**Figure 59** : **A.** Exemples de courants entrant par les SAC, en configuration cellule attachée, suite à un étirement de -40 mmHg, chez des rats Ctrl et HC, en présence ou en absence de MβCD (5 mM). **B.** Probabilité d'ouverture du courant unitaire entrant après un étirement. **C et D.** Exemple de traces calciques en indo-1 après un choc osmotique chez un rat Ctrl (**C**) et HC (**D**) en présence ou en absence de MβCD (5 mM). **E.** Amplitude du pic calcique après un choc osmotique. **F.** Exemple de trace de contraction mesurée dans des cuves à organe isolé après un choc osmotique chez un rat Ctrl et HC en présence de 2 mM de Ca<sup>2+</sup> extracellulaire. **G.** Pourcentage de la contraction au choc osmotique sur la précontraction à la phényléphrine (30 μM), en absence ou en présence de MβCD (5 mM).

#### 4. Les cavéoles, une source de $\text{Ca}^{2+}$ pour les cellules ?

##### A. Réponses à l'étirement en absence de $\text{Ca}^{2+}$ extracellulaire chez les rats HC

Nous l'avons déjà observé dans l'article paru dans Cardiovascular Research, chez les rats HC, un choc osmotique induit une augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  proviendrait, en partie, du RS et ferait intervenir les cavéoles. Pour confirmer ce mécanisme observé sur CML fraîchement dissociées sur une AIP entière, des mesures de la force de contraction, en réponse à un choc osmotique, sont effectuées dans des cuves à organe isolé, comme précédemment. On observe que chez un rat contrôle, un choc osmotique ne provoque pas de contraction en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire (**Figure 60A**). Par contre, une contraction au choc osmotique est toujours observée chez les rats HC (**Figure 60B**). Cependant, contrairement aux réponses calciques, cette contraction n'est pas inhibée par la M $\beta$ CD (**Figure 60C**). Il faut toutefois être prudent sur ce point car la contraction à la phényléphrine chez les rats HC uniquement est très fortement inhibée en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  extracellulaire + M $\beta$ CD.



##### B. La source de ce $\text{Ca}^{2+}$ : un lien étroit entre cavéoles et réticulum sarcoplasmique

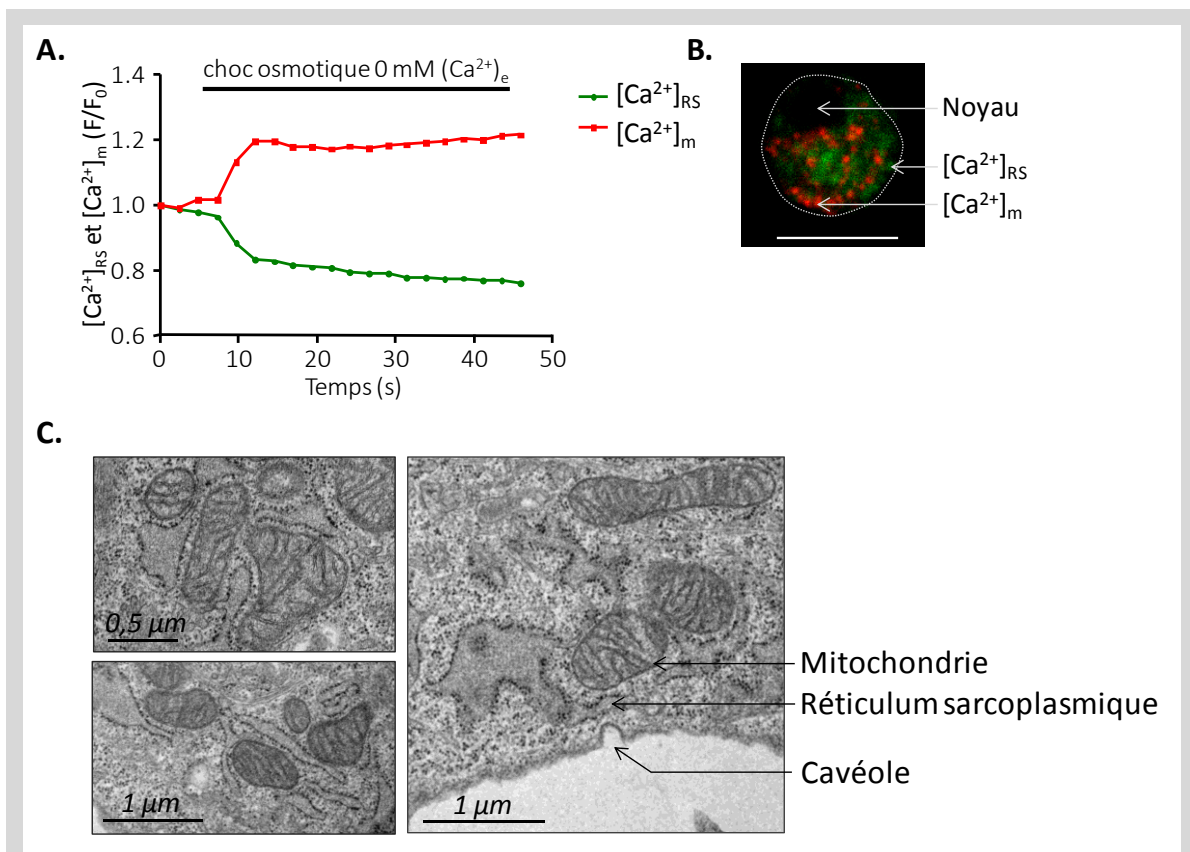
Chez les rats HC, l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire n'empêche pas la contraction ni l'augmentation de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  induite par un choc osmotique. Nous l'avons déjà observé, ce  $\text{Ca}^{2+}$  provient, en partie, du RS. Mais comment un choc osmotique permet-il de recruter le  $\text{Ca}^{2+}$  du RS ? Et quel est le rôle des cavéoles dans ce mécanisme ?

###### a) Cavéoles, réticulum et mitochondries

La **Figure 61A** montre que chez un rat HC, en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire, un choc osmotique sur une CML d'AIP induit une diminution de la  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$  et

simultanément une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_m$ . Ceci souligne le fait que du  $Ca^{2+}$  sort du RS et est par la suite capté par les mitochondries. Pour qu'un tel processus puisse se produire, il est important que les mitochondries soient situées dans des microdomaines proches du RS. La **Figure 61B** montre la distribution des sondes calciques pour le RS et la mitochondrie. On constate qu'elles ne sont pas colocalisées mais sont proches. Les images de microscopie électronique à transmission permettent de confirmer la juxtaposition des mitochondries avec le RS (**Figure 61C**). On observe que le RS et les mitochondries forment des microdomaines très proches, l'un épousant la forme de l'autre. De plus, sur l'image de droite, on peut observer la présence d'une cavéole proche du RS.

On peut envisager qu'en l'absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire, les cavéoles formeraient des réserves calciques rapidement mobilisables par un choc osmotique. Celui-ci entraînerait la vidange du  $Ca^{2+}$  des cavéoles vers le cytoplasme. Par la suite, par un mécanisme de CICR, ce  $Ca^{2+}$  permettrait de vidanger le  $Ca^{2+}$  du RS sous-jacent, avant d'être repompé par les mitochondries afin de maintenir l'homéostasie calcique dans le cytoplasme.

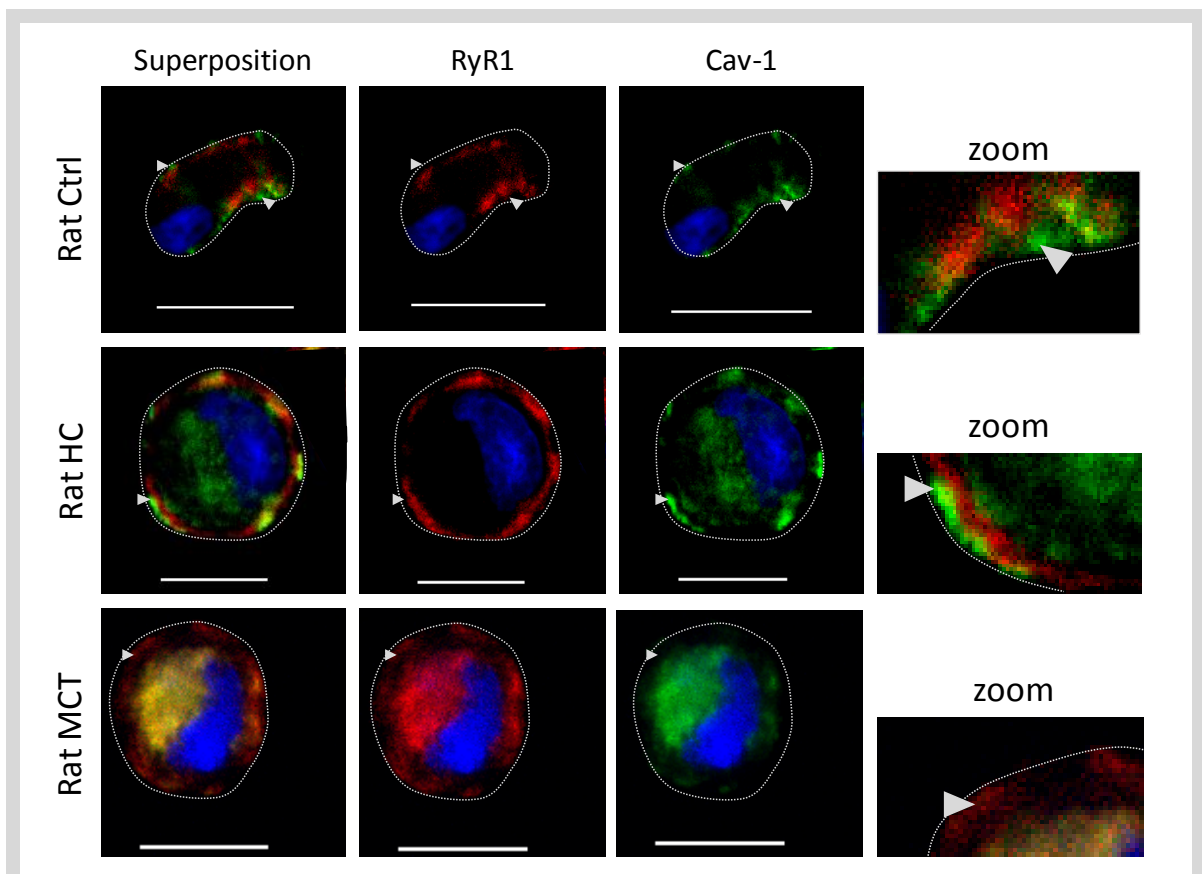


**Figure 61** : Mitochondries, RS et cavéoles. **A.**  $[Ca^{2+}]_{RS}$  (en vert) et  $[Ca^{2+}]_m$  (en rouge) mesurées par les sondes fluo-5N et rhod-2 dans une CML d'AIP de rat HC, en l'absence de  $Ca^{2+}$  extracellulaire, à la suite d'un choc osmotique. **B.** Visualisation des sondes fluo-5N (vert) et rhod-2 (rouge), en microscopie confocale, dans une CML d'AIP de rat HC. **C.** Images en microscopie électronique à transmission d'une CML fraîchement dissociée d'une AIP de rat HC. On observe que les mitochondries et le RS sont situés dans des microdomaines proches.

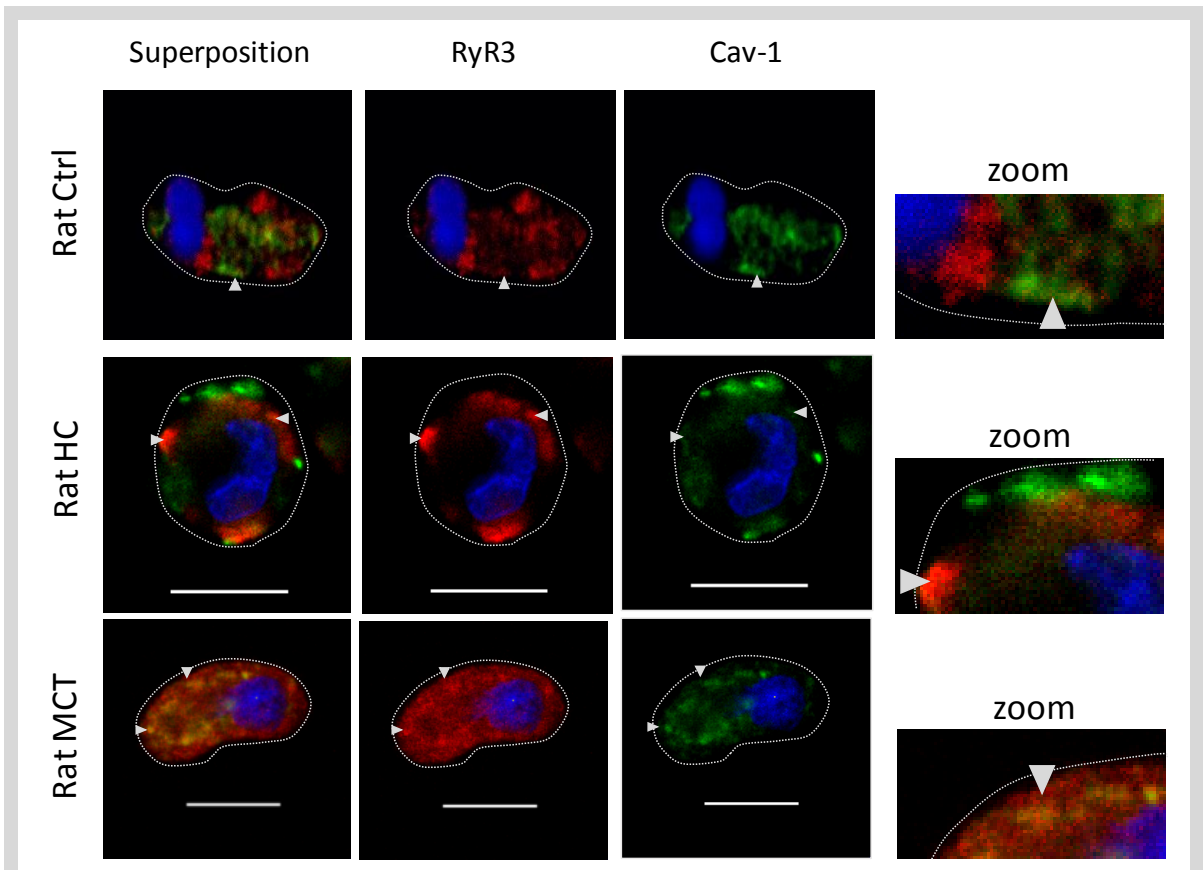


b) Cavéoline et RyR

Si un rapprochement entre cavéoles et RS permet un couplage nécessaire chez les rats HC, quelle isoforme de RyR est impliquée dans ce couplage. L'article dans Cardiovascular Research suggère que ce sont les RyR1, plutôt que les RyR3, qui sont impliqués dans ce couplage chez les rats HC, alors que les deux isoformes sont exprimées en sous-membranaire chez ces rats. Pour le savoir, des immunomarquages sur CML d'AIP sont réalisés entre la Cav-1 et RyR1 ou RyR3. On constate que chez les rats Ctrl et HC, Cav-1 est située au niveau de la membrane plasmique (**Figure 62**). Juste en dessous, sont exprimés les RyR1 dont le marquage est juxtaposé à celui de la Cav-1 (**Figure 62**), ce qui n'est pas le cas pour RyR3 dont le marquage est éloigné de celui de la Cav-1 (**Figure 63**). Chez les rats MCT, en revanche, l'expression de la Cav-1 au niveau de la membrane plasmique est plus faible, la protéine est plutôt dans une zone intracellulaire (**Figure 62** et **Figure 63**).



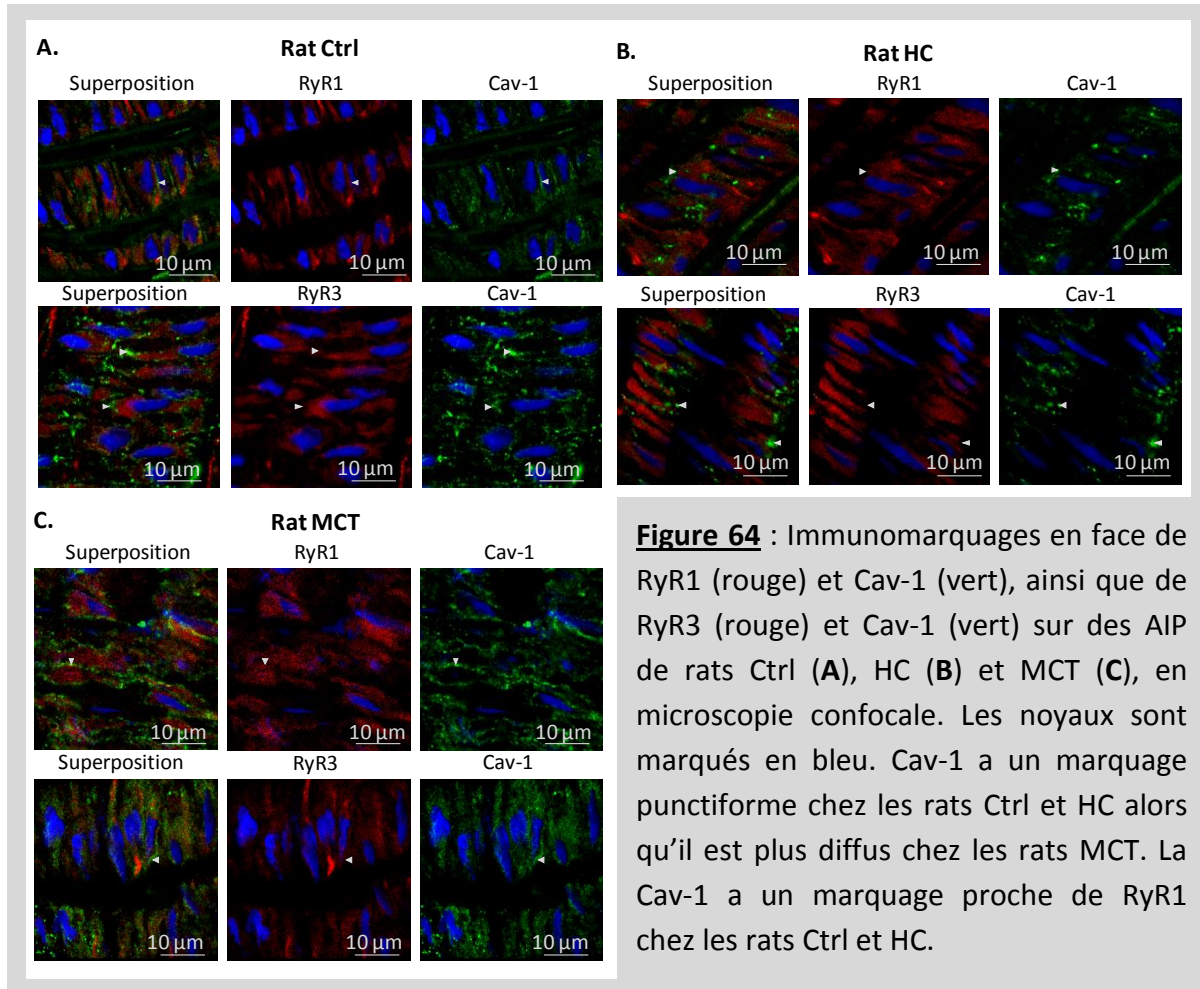
**Figure 62** : Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées de rats Ctrl, HC et MCT de RyR1 (rouge) et Cav-1 (vert). Les noyaux sont marqués en bleu, le contour des cellules est représenté en pointillé et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m. On constate que RyR1 et Cav-1 sont juxtaposés chez les rats Ctrl et HC. Chez les rats MCT, Cav-1 est plutôt situé dans une zone périnucléaire/extrapérinucléaire.



**Figure 63** : Immunomarquages sur CML fraîchement dissociées de rats Ctrl, HC et MCT de RyR3 (rouge) et Cav-1 (vert). Les noyaux sont marqués en bleu, le contour des cellules est représenté en pointillé et la barre d'échelle représente 10  $\mu$ m. On constate que RyR3 et Cav-1 ne sont pas juxtaposés chez les rats Ctrl et HC. Chez les rats MCT, Cav-1 est plutôt situé dans une zone périnucléaire/extrapérinucléaire.

Ainsi, RyR1 semblent être associés dans des microdomaines proches de la Cav-1 et donc des cavéoles, ce qui n'est pas le cas pour RyR3. Les mêmes types de marquages ont également été réalisés sur des vaisseaux entiers en *en face*. De la même façon, on constate que RyR1 et Cav-1 sont juxtaposés (**Figure 64**). Cependant, il est plus difficile de conclure que pour les CML fraîchement dissociées. Il est intéressant de noter que le marquage punctiforme de Cav-1 tel qu'on l'observe chez les rats Ctrl et HC est moins présent chez les rats MCT où le marquage est plus diffus (**Figure 64C**).





## 5. Discussion

### A. Présence de cavéoles et expression de la Cav-1 dans les CML d'AIP

Nous avons mis en évidence, pour la première fois, la présence de cavéoles par microscopie électronique à transmission sur des CML natives, fraîchement dissociées d'AIP de rat (**Figure 55D**). Ceci corrobore la présence de cavéoles qui avait déjà été montrée sur des CML en culture issues de sujets Ctrl et de patients HTAP<sup>5</sup>. La présence en immunofluorescence de la Cav-1 est plus que discutée et discutable dans la littérature. En effet, de nombreux articles affirment que la Cav-1 n'est pas exprimée dans les CML d'AIP par des marquages réalisés sur des coupes de poumon où la résolution n'est pas suffisante pour pouvoir distinguer précisément les CML. Seule une étude a montré l'expression de la Cav-1 au niveau de CML sur des coupes d'AIP de sujets Ctrl et HTAP<sup>306</sup>. Cependant, dans cet article, les auteurs ne précisent pas que le marquage qu'ils observent correspond à des CML. Nous avons montré ici que la Cav-1 est exprimée aussi bien au niveau des CE que des CML sur des coupes d'AIP de rats Ctrl, sur des AIP en *en face* et sur des CML fraîchement dissociées (**Figure 55 et Figure 62**). L'expression observée en western blot de la Cav-1 sur AIP désendothélialisée permet d'appuyer ces résultats (**Figure 58**).

### B. Les cavéoles comme réserves de membrane plasmique

Il a été largement décrit que les cavéoles dans les CE participent à la vasodilatation flux-dépendante. Leur présence dans l'endothélium permet aux CE percevoir le flux sanguin et d'adapter une réponse physiologique de vasodilatation en conséquence. Le flux a notamment un impact sur la fluidité de la membrane plasmique au niveau des cavéoles et intervient dans l'activation des protéines qui lui sont associées (canaux TRP, eNOS)<sup>396</sup>. Si les CML ne sont pas soumises au flux sanguin, elles sont néanmoins soumises aux forces de tension pariétale générées par la pression du sang dans l'artère. Quel est le lien entre SAC, cavéoles et tonus myogénique en conditions physiologiques ? Les cavéoles seraient une réserve de membrane plasmique rapidement mobilisable et participeraient à sa plasticité face à un stress mécanique. En effet, à la suite d'un étirement par un choc osmotique, la cellule peut augmenter son aire de  $15,9 \pm 1,3$  % (n=30 cellules) sans qu'il y ait déchirure de la membrane plasmique. Ce mécanisme se ferait grâce aux cavéoles qui se déploieraient et permettraient d'absorber la déformation de la membrane induite par un stress mécanique<sup>186</sup>.

Au niveau des cavéoles, la membrane plasmique est plus rigide, moins élastique. Si les SAC se trouvent dans ces radeaux lipidiques, la pression aura donc un impact mineur sur leur activité. Un étirement ou un choc osmotique entraîneraient l'ouverture des cavéoles (pouvoir tampon) ce qui exposerait les SAC directement au stress mécanique. En présence de M $\beta$ CD, le cholestérol est retiré des membranes. Ceci a pour conséquence d'augmenter artificiellement la fluidité de la membrane plasmique. Ainsi, pour un même étirement, les SAC ne vont plus être confinés dans des microdomaines rigides et leur activité va être plus importante (**Figure 59B**). Si leur activité est plus importante, l'influx de Ca<sup>2+</sup> et la contraction l'est également (**Figure 59E et G**). En conclusion, en conditions physiologiques dans les AIP, les cavéoles jouent un rôle protecteur et inhibiteur dans la mécanotransduction. Elles servent à la fois de tampon à la membrane plasmique en lui permettant d'accompagner l'étirement, tout en contrôlant la plasticité de la membrane et l'activité des SAC. Le tonus myogénique est donc régulé de façon négative par les cavéoles qui le modèrent.

### C. Les cavéoles dans l'HTP, une histoire de Ca<sup>2+</sup>

#### a) Plus ou moins de cavéoles dans l'HTP ?

Dans l'HTP chez le rat (HC et MCT), en accord avec la littérature, l'expression de la Cav-1 diminue (**Figure 58B**). Cependant, dans des CML en culture issues de patients HTAP, le nombre de cavéoles au niveau de la membrane plasmique augmente. Nous n'avons pas encore pu réaliser de microscopie électronique à transmission sur des CML de rats souffrant d'HTP afin de quantifier les cavéoles. Mais nous avons pu observer que même si l'expression totale de Cav-1 diminue chez les rats HTP, la proportion de multimères par rapport aux

monomères augmente (**Figure 58D**). Toutefois, il s'agit de résultats préliminaires qui ne permettent pas de conclure précisément.

#### b) Cavéoles et mécanotransduction dans l'HTP

Prenons l'hypothèse qu'il y ait moins de Cav-1 et donc moins de cavéoles chez les rats HTP. Le pouvoir tampon de la membrane plasmique va alors être réduit. Or dans l'HTP la pression et le tonus myogénique augmentent. Les CML sont donc soumises à un stress mécanique plus important et n'ont pas la capacité de le « tamponner » en conséquence vu qu'il y aurait moins de cavéoles. Les CML vont alors être plus sensibles à l'étirement. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'activité des SAC, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers ceux-ci et la contraction en réponse à un étirement (**Figure 59**). En présence de  $\text{M}\beta\text{CD}$  chez les rats HC, on s'attend à ce que le phénomène soit encore plus accentué. Étonnamment, ce n'est pas le cas. En effet, l'activité des SAC, les réponses calciques à l'étirement et la contraction au choc osmotique sont significativement réduits (**Figure 59**). Ce rôle des cavéoles dans le tonus myogénique est similaire à celui observé chez les souris KO pour Cav-1 dans les artères mésentériques et cérébrales. Comment l'expliquer ? Une hypothèse serait que chez les rats HC, le rôle des cavéoles ne serait pas uniquement d'absorber les stimuli mécaniques.

#### c) Les cavéoles comme réserve calcique

Dans les CML de rats HC, les cavéoles joueraient un rôle supplémentaire et notamment dans la signalisation calcique. Une étude de 1975 montre que chez les rats HC, les cavéoles ont la capacité d'accumuler beaucoup plus d'ions  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>180</sup>. Les cavéoles formerait des microdomaines calciques où la  $[\text{Ca}^{2+}]$  serait supérieure à celle du milieu extracellulaire<sup>178</sup>. Les cavéoles se chargeraient en  $\text{Ca}^{2+}$  via des PMCA et/ou l'échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  à partir du  $\text{Ca}^{2+}$  provenant du RS sous-membranaire et proche des cavéoles<sup>178, 207</sup>. Une étude a montré que dans le muscle lisse bronchique, les cavéoles contiennent des PCMA, des CCDV de type L, des protéines de liaison du  $\text{Ca}^{2+}$  (calcéquestrine, calréticuline). Par contre, elles ne contiennent pas de pompes SERCA ni de  $\text{IP}_3\text{R}$  ce qui suggère que le compartiment cavéolaire est bien distinct du RS<sup>397</sup>. Nous l'avons mis en évidence par microscopie électronique à transmission, le RS est situé à quelques nm des cavéoles dans les CML, suggérant un lien étroit entre les deux compartiments. Grâce à des immunomarquages et à de la microscopie électronique à transmission sur CML fraîchement dissociées (**Figure 61C** et **Figure 62**) et sur AIP en *en face* (**Figure 64**), on constate que les RyR1 et le RS sont à proximité de Cav-1 au niveau de la membrane plasmique. Il existerait donc, chez les rats HC, un lien entre les cavéoles et le RS qui se fait par l'intermédiaire du  $\text{Ca}^{2+}$ . Ce couplage particulier entre  $\text{Ca}^{2+}$  des cavéoles et RyR est révélé en l'absence de  $\text{Ca}^{2+}$  dans le milieu extracellulaire où l'on observe des réponses calciques et contractiles au choc osmotique qui dépendent à la fois des cavéoles et du RS (Cf. **Figure 6** de l'article dans Cardiovascular Research). De plus, la présence de ces microdomaines riches en  $\text{Ca}^{2+}$  permettrait d'expliquer en partie la plus grande réponse des SAC chez les rats HC. En présence de  $\text{M}\beta\text{CD}$ , les réserves

calciques des cavéoles seraient réduites induisant une diminution de l'influx d'ions, de l'activité des SAC, de la réponse calcique et de la réponse contractile au choc osmotique.

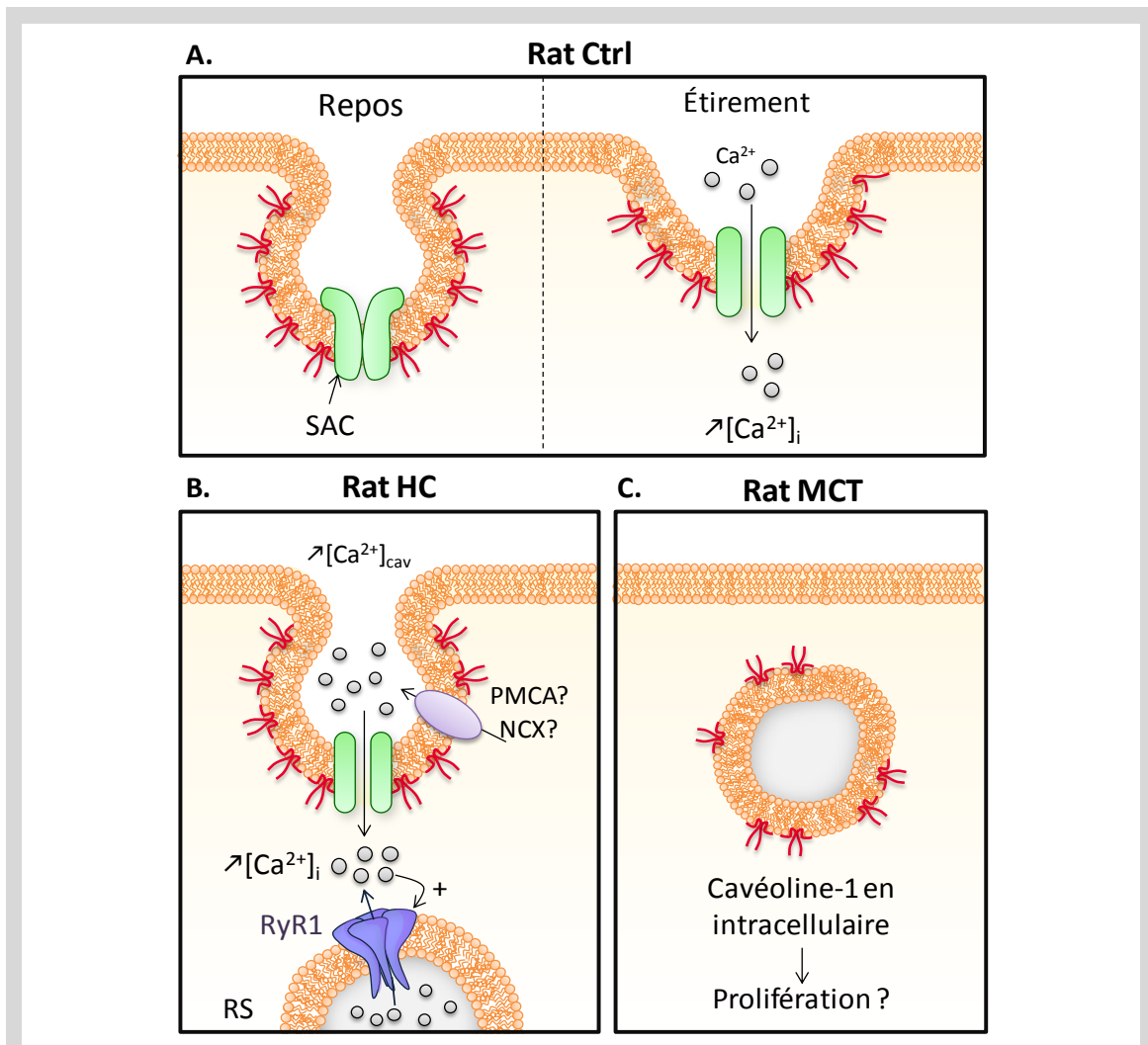
Enfin, chez les rats MCT, l'expression de la Cav-1 est très fortement réduite par rapport aux rats Ctrl. De plus, on constate une translocation de la Cav-1 de la membrane plasmique vers une zone intracellulaire. A ce niveau, la Cav-1 pourrait être impliquée dans la prolifération des CML, comme on peut le constater dans l'HTP<sup>369, 370</sup>.

#### D. Les cavéoles sont-elles protectrices ou délétères dans l'HTP ?

Nous l'avons constaté sur les marquages sur coupes d'AIP et en *en face*, la Cav-1 n'est pas exclusivement exprimée dans les CML puisqu'elle est également présente dans les CE. Au niveau des CE, la Cav-1 et les cavéoles ont un rôle protecteur dans le développement de l'HTP. En effet, les souris KO pour la Cav-1 développent spontanément une HTP due à une dysfonction endothéliale et les patients HTAP ont une forte diminution de l'expression de la Cav-1 au niveau des CE. À l'inverse, au niveau des CML, les cavéoles ont plutôt un rôle néfaste. Des études ont montré qu'elles sont impliquées dans l'influx capacitif et nous avons mis en évidence qu'elles sont impliquées dans le tonus myogénique. Certaines études suggèrent que lors de l'HTAP chez l'homme ou chez le rat MCT par exemple, la Cav-1 est transférée des CE aux CML. Ce transfert induirait non seulement la formation d'une néointima mais aussi contribuerait au remodelage de la média via un effet prolifératif et migratoire sur les CML.

#### E. Conclusion

Cette étude a permis de mettre en évidence un rôle des cavéoles dans la mécanotransduction, à la fois dans la physiologie de l'AIP et dans sa physiopathologie. En conditions physiologiques, les cavéoles confèrent à la membrane plasmique une certaine plasticité afin de modérer la mécanotransduction (**Figure 65A**). Cependant, dans une pathologie où les forces mécaniques sont augmentées (HTP), les cavéoles vont être impliquées dans une modification de la coordination entre le stimulus mécanique et les voies de signalisations calciques intracellulaires (**Figure 65B**).



**Figure 65** : **A.** Chez un rat Ctrl, la membrane plasmique riche en cavéoles permettrait de « tamponner » un étirement. Un choc osmotique entraînerait l'ouverture des cavéoles, l'activation des SAC et un influx de  $\text{Ca}^{2+}$ . **B.** Chez les rats HC, un couplage entre cavéoles et réticulum sarcoplasmique (RS) se met en place. Les cavéoles, plus riches en  $\text{Ca}^{2+}$  via une recharge par des PCMA ou un échangeur  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ , permettraient un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  plus important par les SAC. Ce  $\text{Ca}^{2+}$  est amplifié par une sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  par les RyR1 du RS sous-membranaire. **C.** Chez les rats MCT, l'expression de la Cav-1 diminue fortement au niveau de la membrane plasmique. Les Cav-1 en intracellulaire interviendraient dans la prolifération des CML.

---

## Les canaux mécanosensibles Piezo dans le poumon

---

Nous avons mis en évidence que les canaux mécanosensibles sont importants pour le tonus myogénique dans l'AIP. Mais quelle est la nature moléculaire de ces canaux ? Récemment, une nouvelle famille de canaux mécanosensibles a été découverte : les canaux Piezo. Les premières études réalisées ont montré que le poumon est le tissu qui exprime le plus les canaux Piezo qui sont importants dans la vasculogénèse chez l'embryon. Afin de mieux comprendre le rôle des canaux Piezo dans le poumon, la première étape est de savoir où ce canal est exprimé. Cette étude préliminaire présente la description et la localisation de Piezo1 dans le poumon et plus précisément dans l'artère intrapulmonaire.

### 1. Les canaux Piezo1 sont exprimés dans le parenchyme, l'AIP et la bronche

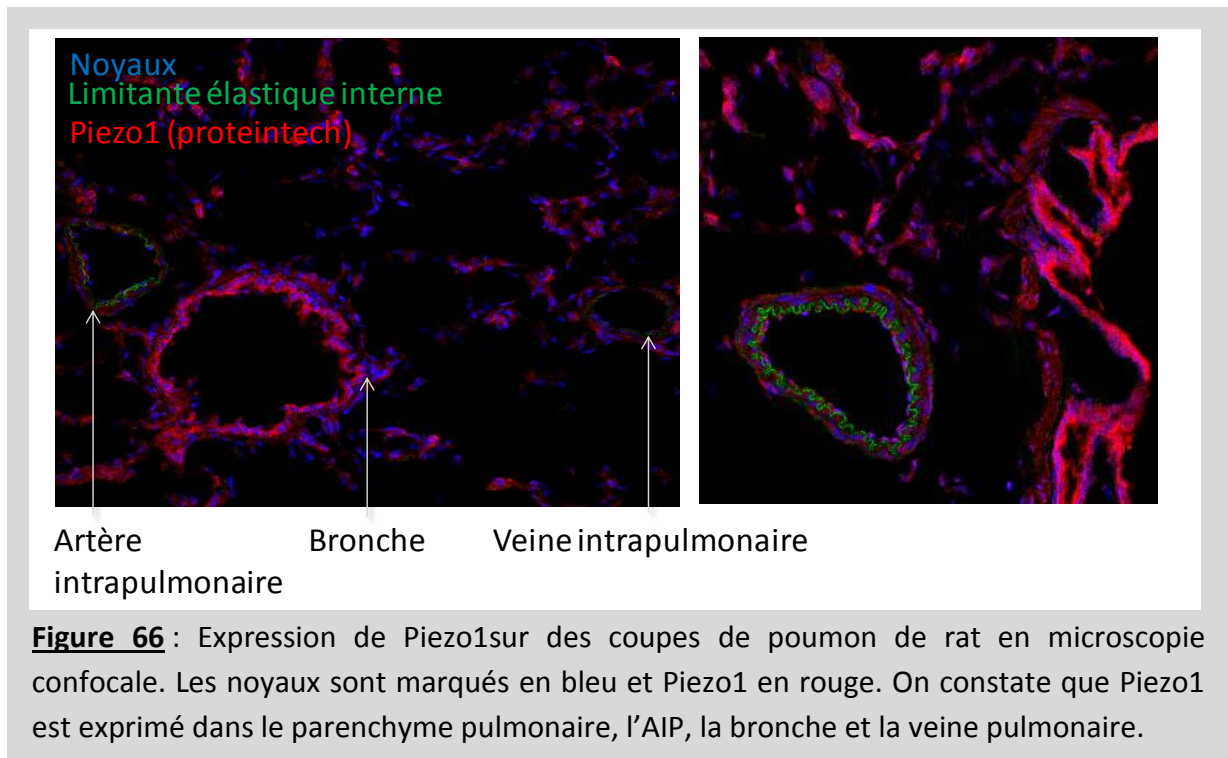
#### A. Quel anticorps utiliser pour détecter Piezo1 ?

Pour déterminer la localisation de Piezo1 dans le poumon, nous avons réalisé des coupes de poumon de rat au cryostat et visualisé l'expression de Piezo1 par immunofluorescence en microscopie confocale. Piezo1 étant un canal découvert récemment (en 2010), la spécificité des anticorps disponibles sur le marché n'est pas toujours évidente. Ainsi, j'ai pu tester plusieurs anticorps qui ont donné des marquages très différents : ab82336 de chez abcam®, NBP1-78446R de chez Novus®, sc-164319 de chez Santa Cruz Biotechnology® et 15939-1-AP de chez Proteintech®. Aujourd'hui, seul l'anticorps de chez Proteintech® (15939-1-AP) a été utilisé puis validé dans plusieurs études parues dans des journaux renommés tels que Nature<sup>88, 91</sup>, Blood<sup>89</sup> ou The Journal of Biological Chemistry<sup>87</sup>. Nous avons également réalisé des marquages sur des cellules NG-10815 transfectées par un plasmide codant pour la protéine humaine de Piezo1. Seul l'anticorps de chez Proteintech® reconnaît les cellules transfectées uniquement (données non présentées). Pour ces raisons, les marquages présentés ci-après sont réalisés avec cet anticorps.

#### B. Piezo1 dans le poumon de rat

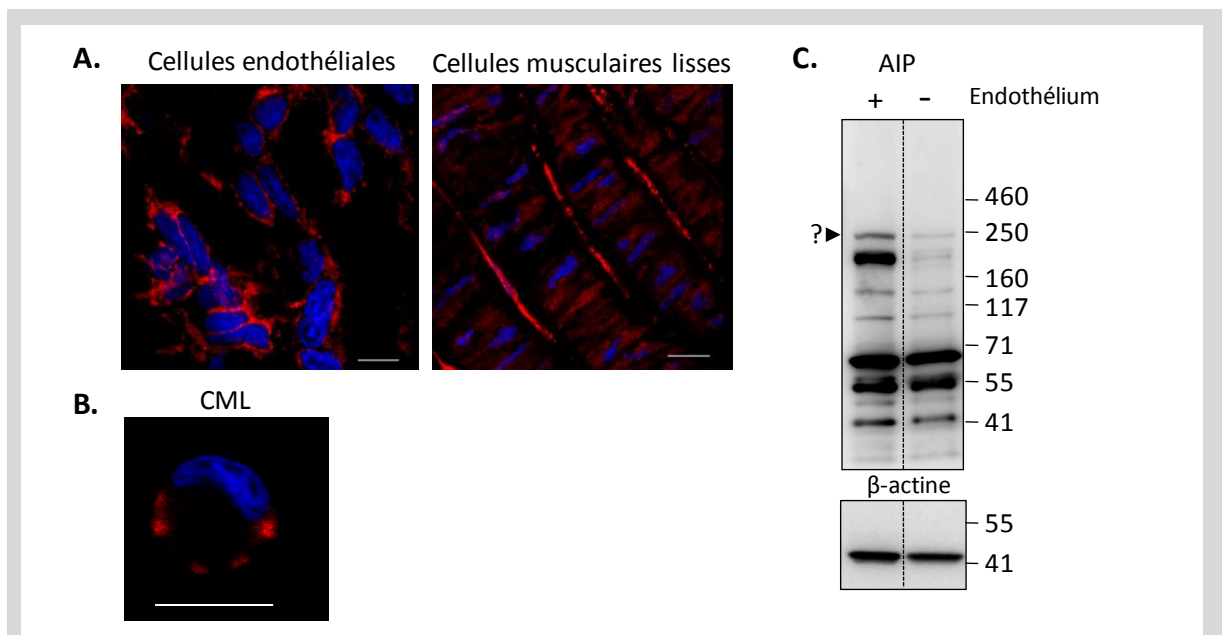
Sur des coupes de poumon de rat, on constate que Piezo1 est exprimé dans de nombreux types cellulaires. En effet, le marquage est présent dans le parenchyme pulmonaire, au niveau de l'artère intrapulmonaire, au niveau de la bronche et peut être au niveau de la veine également. L'intensité du marquage est nettement plus prononcée au niveau de la bronche (**Figure 66**).

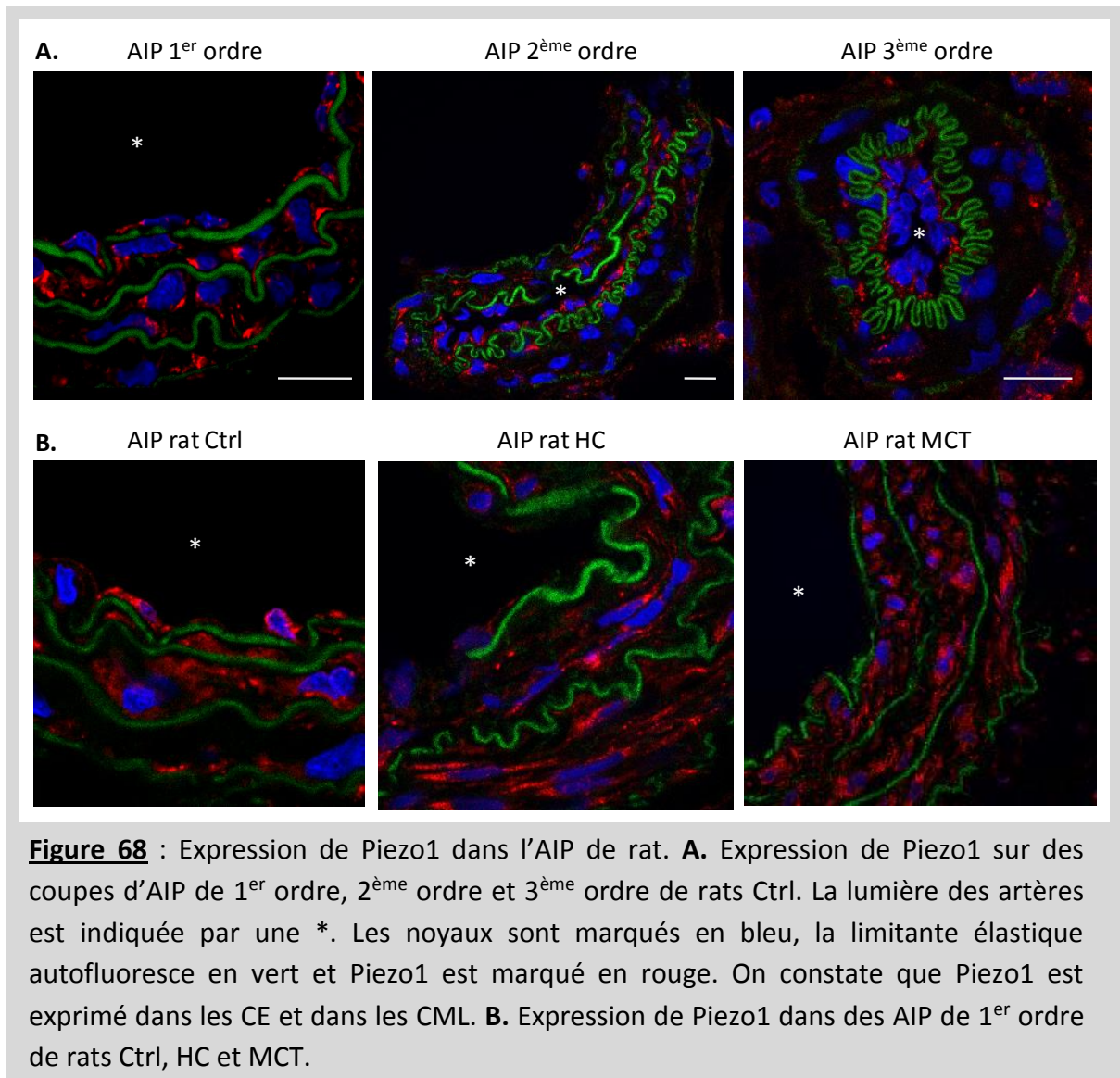




C. Expression de Piezo1 dans l'artère intrapulmonaire

Sur des coupes d'AIP de rats Ctrl, on constate que Piezo1 est exprimé à la fois dans les CE et les CML. Ce profil d'expression est similaire pour différents diamètres de l'AIP (**Figure 68A**). Chez les rats souffrant d'HTP (HC et MCT), Piezo1 est également exprimé dans les CE et les CML (**Figure 68B**). Les marquages ont été réalisés sur au moins 3 rats.





**Figure 68** : Expression de Piezo1 dans l’AIP de rat. **A.** Expression de Piezo1 sur des coupes d’AIP de 1<sup>er</sup> ordre, 2<sup>ème</sup> ordre et 3<sup>ème</sup> ordre de rats Ctrl. La lumière des artères est indiquée par une \*. Les noyaux sont marqués en bleu, la limitante élastique autofluoresce en vert et Piezo1 est marqué en rouge. On constate que Piezo1 est exprimé dans les CE et dans les CML. **B.** Expression de Piezo1 dans des AIP de 1<sup>er</sup> ordre de rats Ctrl, HC et MCT.

Des marquages en *en face* d’AIP confirment la présence de Piezo1 dans les CE et les CML (**Figure 67A**). De plus, on constate que Piezo1 est exprimé dans une zone proche de la membrane plasmique dans des CML fraîchement dissociées (**Figure 67B**).

En western blot, en condition dénaturante, l’anticorps anti Piezo1 détecte de nombreuses bandes à environ 250, 170, 130, 100, 70, 55, 42 kDa (**Figure 67C**). Piezo1 étant une protéine d’environ 290 kDa, l’anticorps ne détecte pas de bande à ce poids moléculaire. Li Jing et ses collaborateurs précisent que l’anticorps détecte bien une bande à 250 kDa qui ne correspond pas à Piezo1 puisque cette bande est toujours présente lorsque les auteurs éteignent l’expression de Piezo1 avec des siARN<sup>91</sup>. La bande que l’on observe juste en dessous de 250 kDa sur le western blot ne correspondrait donc pas à Piezo1.



## 2. Conclusion

D'après les résultats obtenus, Piezo1 est largement exprimé dans le poumon de rat, à la fois dans la bronche, le parenchyme pulmonaire et l'AIP. Au niveau de l'AIP, on retrouve une expression au niveau des CE et des CML, aussi bien chez des rats Ctrl que chez des rats souffrant d'HTP.

### A. Piezo1 dans le parenchyme pulmonaire

La forte expression de Piezo1 dans le poumon n'est pas si surprenante. Le poumon est une structure distensible dont le volume augmente proportionnellement en fonction de la pression transpulmonaire laquelle varie au cours de chaque inspiration. Piezo1 pourrait être impliqué dans le contrôle ou la sensibilité de cette élasticité du poumon.

### B. Piezo1 dans les bronches

Les voies aériennes sont des structures de résistance du fait notamment de leur structure cartilagineuse pour les voies aériennes proximales et du fait du muscle lisse pour les voies aériennes périphériques (bronches de petit diamètre). Les voies aériennes sont également soumises à un stress mécanique lors des cycles inspiration/expiration. En réponse à un étirement la bronche se contracte, mécanisme qui est exacerbé lors de pathologies telles que l'asthme. Ainsi, des SAC ont été identifiés comme impliqués dans ce mécanisme de tonus myogénique dans les voies aériennes<sup>398, 399</sup>. L'épithélium bronchique est lui aussi sensible à l'étirement et exprime des SAC<sup>400</sup>. La mécanotransduction au niveau des cellules épithéliales serait impliquée dans la sécrétion d'ATP via des pannexines 1. L'ATP interviendrait dans la modulation de la fréquence du battement des cils épithéliaux nécessaire à la clairance du mucus<sup>401</sup>. Ainsi, il est possible que les canaux Piezo1 soient impliqués dans la mécanotransduction au niveau des bronches.

### C. Piezo1 au niveau des AIP

Au niveau des CE, Piezo1 pourrait être impliqué dans de nombreux mécanismes : que ce soit la vasodilatation flux-dépendante comme cela a été montré dans les cellules HUVEC, dans la sécrétion de facteurs vasoconstricteurs comme l'ET-1 ou dans l'inflammation (voie de zyxin par exemple). Au niveau des CML, Piezo1 est peut-être le canal qui participe au tonus myogénique des AIP. Pour en savoir plus, il serait intéressant d'étudier plus en détail la fonction de Piezo1 dans le poumon et dans l'AIP grâce à des souris KO pour Piezo1.

### D. Limites de cette étude

Il faut toutefois rester prudent en ce qui concerne l'utilisation des anticorps, y compris celui utilisé ici. On constate qu'il fonctionne très bien en immunofluorescence mais qu'il détecte de nombreuses bandes et protéines de différents poids moléculaires en

western blot, sans détecter une bande au poids moléculaire attendu pour Piezo1. Il serait intéressant de réaliser un western blot sur des cellules n'exprimant pas Piezo1 et sur des cellules surexprimant la protéine afin de valider l'anticorps. Par ailleurs, à ce jour aucun anticorps satisfaisant pour Piezo2 n'est commercialisé. Il serait pourtant également intéressant d'étudier ce canal vu qu'il est fortement exprimé à l'état d'ARNm dans le poumon.

# CONCLUSION ET PERSPECTIVES



**A**u cours de cette thèse, j'ai mis en évidence que les CML d'AIP ont une organisation subcellulaire de leurs réserves calciques très précise leur permettant de répondre spécifiquement à différents stimuli, qu'ils soient mécaniques (étirement) ou hormonaux (ET-1). Chaque partenaire calcique est ségrégué au sein de microdomaines intracellulaires et sous-tend différentes voies de signalisations. Lors de l'HTP, un remodelage au niveau subcellulaire des réserves calciques se met en place et fait pencher la balance de l'homéostasie calcique vers une plus forte augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  et donc vers une plus forte contraction des artères. Si les AIP de rats souffrant d'HTP ont un tonus myogénique exacerbé, celui-ci va conduire à diminuer d'autant plus le diamètre interne des artères et à augmenter les résistances périphériques à l'écoulement. La question reste à présent de savoir si de telles modifications ont lieu dans les différents types d'HTP chez l'homme. Si tel est le cas, y a-t-il un facteur qui pourrait être ciblé à des fins thérapeutiques ?

## Vers de nouvelles cibles thérapeutiques

Au niveau cellulaire, l'augmentation de la  $[Ca^{2+}]_i$  à la suite d'un étirement est corrélée à une augmentation de l'activité des SAC et à une libération de  $Ca^{2+}$  par les réserves calciques du RS. Dans ce contexte, quelles pourraient être les cibles thérapeutiques ? Inhiber directement les SAC semble être un traitement trop radical. En effet, les SAC étant les initiateurs du tonus myogénique, leur inhibition reviendrait à bloquer complètement un mécanisme important dans la physiologie des artères et dans de nombreux tissus. En revanche, il serait intéressant de cibler certaines réserves calciques internes. Ceci permettrait de n'inhiber qu'une partie de la réponse calcique à l'étirement sans totalement supprimer le mécanisme complet du tonus myogénique. A l'heure actuelle, un traitement qui paraît prometteur serait une thérapie génique visant à réintroduire une protéine SERCA2a fonctionnelle au niveau pulmonaire. Déjà testé chez le rat MCT dans un traitement préventif et curatif, le transfert du gène de SERCA2a contenu dans un virus adéno-associé, délivré par aérosolisation en intratrachéale, permet d'empêcher le développement de la pathologie chez le rat<sup>342</sup>. Ce type de traitement par thérapie génique avec SERCA2a a déjà été mis en place chez l'homme, en essai clinique, dans l'insuffisance cardiaque<sup>248</sup>. Ce traitement vise à réduire la  $[Ca^{2+}]_i$  basale en favorisant le repompage du  $Ca^{2+}$  dans le RS.

Une autre cible thérapeutique intéressante serait de bloquer les RyR<sup>402</sup>. Nous l'avons vu, les RyR interviennent dans l'amplification des signaux calciques, que ce soit dans le tonus myogénique ou dans les réponses contractiles aux agonistes vasoconstricteurs. Comme pour les SAC, bloquer toutes les isoformes de RyR pourrait être un traitement trop radical tant ces canaux sont importants pour la physiologie des AIP. Il faudrait donc un traitement ne bloquant que certaines isoformes de RyR<sup>403</sup>. Le dantrolène est un inhibiteur sélectif des RyR1 et des RyR3 qui ne bloque pas les RyR2. Déjà utilisé dans le traitement de l'hyperthermie maligne et dans la spasticité chez l'humain, à la posologie de 25 mg/jour minimum, sans dépasser les 300 mg/jour. À ce jour, le dantrolène est le seul traitement capable d'inhiber les

RyR. Les difficultés d'un traitement visant les RyR sont : l'accessibilité du RyR (la molécule doit être capable de diffuser à travers les membranes plasmiques), la sélectivité pour une isoforme particulière et la toxicité directe ou indirecte du composé<sup>404</sup>.

En conclusion, ce travail permet de mieux comprendre les voies de signalisations calciques dans la physiologie et la physiopathologie de l'hypertension pulmonaire au niveau des cellules musculaires lisses des artères intrapulmonaires et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

# BIBLIOGRAPHIE





1. Tanabe Y, Saito-Tanji M, Morikawa Y, Kamataki A, Sawai T and Nakayama K. Role of secretory phospholipase A(2) in rhythmic contraction of pulmonary arteries of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Journal of pharmacological sciences*. 2012;119:271-81.
2. Chen F, Barman S, Yu Y, Haigh S, Wang Y, Dou H, Bagi Z, Han W, Su Y and Fulton DJ. Caveolin-1 is a negative regulator of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species. *Free radical biology & medicine*. 2014;73:201-13.
3. Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard JF, Marthan R and Savineau JP. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell calcium*. 2010;48:251-9.
4. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP and Guibert C. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respiratory research*. 2011;12:30.
5. Patel HH, Zhang S, Murray F, Suda RY, Head BP, Yokoyama U, Swaney JS, Niesman IR, Schermuly RT, Pullamsetti SS, Thistlethwaite PA, Miyanochara A, Farquhar MG, Yuan JX and Insel PA. Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2007;21:2970-9.
6. Broughton BR, Walker BR and Resta TC. Chronic hypoxia induces Rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294:L797-806.
7. Wang L, Yin J, Nickles HT, Ranke H, Tabuchi A, Hoffmann J, Tabeling C, Barbosa-Sicard E, Chanson M, Kwak BR, Shin HS, Wu S, Isakson BE, Witzenzrath M, de Wit C, Fleming I, Kuppe H and Kuebler WM. Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction. *J Clin Invest*. 2012;122:4218-30.
8. Bowman CL, Gottlieb PA, Suchyna TM, Murphy YK and Sachs F. Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology. *Toxicon : official journal of the International Society on Toxinology*. 2007;49:249-70.
9. Coste B. [Feeling the pressure? Identification of two proteins activated by mechanical forces]. *Medecine sciences : M/S*. 2011;27:17-9.
10. Tang BT, Pickard SS, Chan FP, Tsao PS, Taylor CA and Feinstein JA. Wall shear stress is decreased in the pulmonary arteries of patients with pulmonary arterial hypertension: An image-based, computational fluid dynamics study. *Pulmonary circulation*. 2012;2:470-6.
11. Yamamura A, Guo Q, Yamamura H, Zimnicka AM, Pohl NM, Smith KA, Fernandez RA, Zeifman A, Makino A, Dong H and Yuan JX. Enhanced Ca(2+)-sensing receptor function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation research*. 2012;111:469-81.
12. Parton RG and Simons K. The multiple faces of caveolae. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8:185-94.
13. Van Petegem F. Ryanodine receptors: structure and function. *J Biol Chem*. 2012;287:31624-32.
14. Vaithianathan T, Narayanan D, Asuncion-Chin MT, Jeyakumar LH, Liu J, Fleischer S, Jaggar JH and Dopico AM. Subtype identification and functional characterization of ryanodine receptors in rat cerebral artery myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;299:C264-78.

15. Thyberg J. Differences in caveolae dynamics in vascular smooth muscle cells of different phenotypes. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2000;80:915-29.
16. Gervasio OL, Phillips WD, Cole L and Allen DG. Caveolae respond to cell stretch and contribute to stretch-induced signaling. *Journal of cell science*. 2011;124:3581-90.
17. Samsó M, Feng W, Pessah IN and Allen PD. Coordinated movement of cytoplasmic and transmembrane domains of RyR1 upon gating. *PLoS Biol*. 2009;7:e85.
18. Kinnear NP, Wyatt CN, Clark JH, Calcraft PJ, Fleischer S, Jeyakumar LH, Nixon GF and Evans AM. Lysosomes co-localize with ryanodine receptor subtype 3 to form a trigger zone for calcium signalling by NAADP in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Cell calcium*. 2008;44:190-201.
19. Townsley MI. Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins. *Comprehensive Physiology*. 2012;2:675-709.
20. Stenmark KR, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya E, Anwar A, Li M, Riddle S and Frid M. The adventitia: Essential role in pulmonary vascular remodeling. *Comprehensive Physiology*. 2011;1:141-61.
21. Sheikh AQ, Lighthouse JK and Greif DM. Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension. *Cell reports*. 2014;6:809-17.
22. Webb RC. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in physiology education*. 2003;27:201-6.
23. Lincoln TM. Myosin phosphatase regulatory pathways: different functions or redundant functions? *Circulation research*. 2007;100:10-2.
24. Brozovich FV. Myosin light chain phosphatase: it gets around. *Circulation research*. 2002;90:500-2.
25. Wynne BM, Chiao CW and Webb RC. Vascular Smooth Muscle Cell Signaling Mechanisms for Contraction to Angiotensin II and Endothelin-1. *Journal of the American Society of Hypertension : JASH*. 2009;3:84-95.
26. Bayliss WM. On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure. *The Journal of physiology*. 1902;28:220-31.
27. Belik J. Myogenic response in large pulmonary arteries and its ontogenesis. *Pediatric research*. 1994;36:34-40.
28. Nakayama K, Ueta K, Tanaka Y, Tanabe Y and Ishii K. Stretch-induced contraction of rabbit isolated pulmonary artery and the involvement of endothelium-derived thromboxane A<sub>2</sub>. *British journal of pharmacology*. 1997;122:199-208.
29. Tanabe Y, Saito M, Morikawa Y, Kamataki A, Sawai T, Hirose M and Nakayama K. Inhibition of untransformed prostaglandin H<sub>2</sub> production and stretch-induced contraction of rabbit pulmonary arteries by indoxam, a selective secretory phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor. *Journal of pharmacological sciences*. 2011;115:525-31.
30. Belik J. The myogenic response of arterial vessels is increased in fetal pulmonary hypertension. *Pediatric research*. 1995;37:196-201.
31. Kulik TJ, Evans JN and Gamble WJ. Stretch-induced contraction in pulmonary arteries. *The American journal of physiology*. 1988;255:H1391-8.
32. Yang XR, Lin AH, Hughes JM, Flavahan NA, Cao YN, Liedtke W and Sham JS. Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302:L555-68.

33. Naik JS, Earley S, Resta TC and Walker BR. Pressure-induced smooth muscle cell depolarization in pulmonary arteries from control and chronically hypoxic rats does not cause myogenic vasoconstriction. *Journal of applied physiology*. 2005;98:1119-24.
34. Davis MJ and Hill MA. Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response. *Physiol Rev*. 1999;79:387-423.
35. Umesh A, Thompson MA, Chini EN, Yip KP and Sham JS. Integrin ligands mobilize Ca<sup>2+</sup> from ryanodine receptor-gated stores and lysosome-related acidic organelles in pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2006;281:34312-23.
36. Guharay F and Sachs F. Stretch-activated single ion channel currents in tissue-cultured embryonic chick skeletal muscle. *The Journal of physiology*. 1984;352:685-701.
37. Li C and Xu Q. Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cellular signalling*. 2000;12:435-45.
38. Inoue R, Jian Z and Kawarabayashi Y. Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacology & therapeutics*. 2009;123:371-85.
39. Park KS, Lee HA, Earm KH, Ko JH, Earm YE and Kim SJ. Differential distribution of mechanosensitive nonselective cation channels in systemic and pulmonary arterial myocytes of rabbits. *Journal of vascular research*. 2006;43:347-54.
40. Guibert C, Ducret T and Savineau JP. Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2008;98:10-23.
41. Zou H, Lifshitz LM, Tuft RA, Fogarty KE and Singer JJ. Visualization of Ca<sup>2+</sup> entry through single stretch-activated cation channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:6404-9.
42. Suchyna TM, Johnson JH, Hamer K, Leykam JF, Gage DA, Clemo HF, Baumgarten CM and Sachs F. Identification of a peptide toxin from *Grammostola spatulata* spider venom that blocks cation-selective stretch-activated channels. *The Journal of general physiology*. 2000;115:583-98.
43. Chubinskiy-Nadezhdin VI, Negulyaev YA and Morachevskaya EA. Cholesterol depletion-induced inhibition of stretch-activated channels is mediated via actin rearrangement. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;412:80-5.
44. Sharif-Naeini R, Folgering JH, Bichet D, Duprat F, Lauritzen I, Arhatte M, Jodar M, Dedman A, Chatelain FC, Schulte U, Retailleau K, Loufrani L, Patel A, Sachs F, Delmas P, Peters DJ and Honore E. Polycystin-1 and -2 dosage regulates pressure sensing. *Cell*. 2009;139:587-96.
45. Ito S, Suki B, Kume H, Numaguchi Y, Ishii M, Iwaki M, Kondo M, Naruse K, Hasegawa Y and Sokabe M. Actin cytoskeleton regulates stretch-activated Ca<sup>2+</sup> influx in human pulmonary microvascular endothelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43:26-34.
46. Morachevskaya E, Sudarikova A and Negulyaev Y. Mechanosensitive channel activity and F-actin organization in cholesterol-depleted human leukaemia cells. *Cell biology international*. 2007;31:374-81.
47. Staruschenko A, Negulyaev YA and Morachevskaya EA. Actin cytoskeleton disassembly affects conductive properties of stretch-activated cation channels in leukaemia cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2005;1669:53-60.
48. Guibert C, Ducret T and Savineau JP. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Advances in experimental medicine and biology*. 2011;704:687-706.

49. Christensen AP and Corey DP. TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nature reviews Neuroscience*. 2007;8:510-21.
50. Eijkelkamp N, Quick K and Wood JN. Transient receptor potential channels and mechanosensation. *Annual review of neuroscience*. 2013;36:519-46.
51. Sharif-Naeini R, Dedman A, Folgering JH, Duprat F, Patel A, Nilius B and Honore E. TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response. *Pflugers Arch*. 2008;456:529-40.
52. Remillard CV and Yuan JX. TRP channels, CCE, and the pulmonary vascular smooth muscle. *Microcirculation*. 2006;13:671-92.
53. Kunichika N, Yu Y, Remillard CV, Platoshyn O, Zhang S and Yuan JX. Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca<sup>2+</sup> entry. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;287:L962-9.
54. Liu XR, Zhang MF, Yang N, Liu Q, Wang RX, Cao YN, Yang XR, Sham JS and Lin MJ. Enhanced store-operated Ca<sup>2+</sup> entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302:C77-87.
55. Wang J, Chen Y, Lin C, Jia J, Tian L, Yang K, Zhao L, Lai N, Jiang Q, Sun Y, Zhong N, Ran P and Lu W. Effects of chronic exposure to cigarette smoke on canonical transient receptor potential expression in rat pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014;306:C364-73.
56. Malczyk M, Veith C, Fuchs B, Hofmann K, Storch U, Schermuly RT, Witzentrath M, Ahlbrecht K, Fecher-Trost C, Flockerzi V, Ghofrani HA, Grimminger F, Seeger W, Gudermann T, Dietrich A and Weissmann N. Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2013;188:1451-9.
57. Lu W, Wang J, Shimoda LA and Sylvester JT. Differences in STIM1 and TRPC expression in proximal and distal pulmonary arterial smooth muscle are associated with differences in Ca<sup>2+</sup> responses to hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295:L104-13.
58. Li X, Lu W, Fu X, Zhang Y, Yang K, Zhong N, Ran P and Wang J. BMP4 increases canonical transient receptor potential protein expression by activating p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2013;49:212-20.
59. Yu Y, Fantozzi I, Remillard CV, Landsberg JW, Kunichika N, Platoshyn O, Tigno DD, Thistlethwaite PA, Rubin LJ and Yuan JX. Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101:13861-6.
60. Lin MJ, Leung GP, Zhang WM, Yang XR, Yip KP, Tse CM and Sham JS. Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension. *Circulation research*. 2004;95:496-505.
61. Weissmann N, Dietrich A, Fuchs B, Kalwa H, Ay M, Dumitrascu R, Olschewski A, Storch U, Mederos y Schnitzler M, Ghofrani HA, Schermuly RT, Pinkenburg O, Seeger W, Grimminger F and Gudermann T. Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103:19093-8.

62. Xia Y, Yang XR, Fu Z, Paudel O, Abramowitz J, Birnbaumer L and Sham JS. Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions. *Hypertension*. 2014;63:173-80.
63. Wang YX, Wang J, Wang C, Liu J, Shi LP, Xu M and Wang C. Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *The Journal of membrane biology*. 2008;223:151-9.
64. Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS and Sham JS. Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2006;290:L1267-76.
65. Song S, Yamamura A, Yamamura H, Ayon RJ, Smith KA, Tang H, Makino A and Yuan JX. Flow Shear Stress Enhances Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014.
66. Dahan D, Ducret T, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP and Esteve E. Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;303:L824-33.
67. Miller FJ, Jr., Dellsperger KC and Gutterman DD. Myogenic constriction of human coronary arterioles. *The American journal of physiology*. 1997;273:H257-64.
68. Liu XR, Liu Q, Chen GY, Hu Y, Sham JS and Lin MJ. Down-regulation of TRPM8 in pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2013;31:892-904.
69. McDaniel SS, Platoshyn O, Wang J, Yu Y, Sweeney M, Krick S, Rubin LJ and Yuan JX. Capacitative Ca<sup>2+</sup> entry in agonist-induced pulmonary vasoconstriction. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;280:L870-80.
70. LaDouceur DM, Flynn MA, Keiser JA, Reynolds E and Haleen SJ. ETA and ETB receptors coexist on rabbit pulmonary artery vascular smooth muscle mediating contraction. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;196:209-15.
71. Kuipers AJ, Middelbeek J and van Leeuwen FN. Mechanoregulation of cytoskeletal dynamics by TRP channels. *European journal of cell biology*. 2012;91:834-46.
72. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M and Imaizumi Y. TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circulation research*. 2003;93:829-38.
73. Du J, Ma X, Shen B, Huang Y, Birnbaumer L and Yao X. TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014.
74. Volkers L, Mechioukhi Y and Coste B. Piezo channels: from structure to function. *Pflugers Arch*. 2014.
75. Coste B, Mathur J, Schmidt M, Earley TJ, Ranade S, Petrus MJ, Dubin AE and Patapoutian A. Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science*. 2010;330:55-60.
76. Coste B, Xiao B, Santos JS, Syeda R, Grandl J, Spencer KS, Kim SE, Schmidt M, Mathur J, Dubin AE, Montal M and Patapoutian A. Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. *Nature*. 2012;483:176-81.
77. Peyronnet R, Martins JR, Duprat F, Demolombe S, Arhatte M, Jodar M, Tauc M, Durantou C, Paulais M, Teulon J, Honore E and Patel A. Piezo1-dependent stretch-activated



- channels are inhibited by Polycystin-2 in renal tubular epithelial cells. *EMBO reports*. 2013;14:1143-8.
78. Bae C, Sachs F and Gottlieb PA. The mechanosensitive ion channel Piezo1 is inhibited by the peptide GsMTx4. *Biochemistry*. 2011;50:6295-300.
79. Gottlieb PA and Sachs F. Piezo1: properties of a cation selective mechanical channel. *Channels*. 2012;6:214-9.
80. Bae C, Gottlieb PA and Sachs F. Human PIEZO1: removing inactivation. *Biophysical journal*. 2013;105:880-6.
81. Kim SE, Coste B, Chadha A, Cook B and Patapoutian A. The role of Drosophila Piezo in mechanical nociception. *Nature*. 2012;483:209-12.
82. Eijkelkamp N, Linley JE, Torres JM, Bee L, Dickenson AH, Gringhuis M, Minett MS, Hong GS, Lee E, Oh U, Ishikawa Y, Zwartkuis FJ, Cox JJ and Wood JN. A role for Piezo2 in EPAC1-dependent mechanical allodynia. *Nature communications*. 2013;4:1682.
83. Lolignier S, Eijkelkamp N and Wood JN. Mechanical allodynia. *Pflugers Arch*. 2014.
84. Nakatani M, Maksimovic S, Baba Y and Lumpkin EA. Mechanotransduction in epidermal Merkel cells. *Pflugers Arch*. 2014.
85. Woo SH, Ranade S, Weyer AD, Dubin AE, Baba Y, Qiu Z, Petrus M, Miyamoto T, Reddy K, Lumpkin EA, Stucky CL and Patapoutian A. Piezo2 is required for Merkel-cell mechanotransduction. *Nature*. 2014;509:622-6.
86. Ikeda R, Cha M, Ling J, Jia Z, Coyle D and Gu JG. Merkel cells transduce and encode tactile stimuli to drive Abeta-afferent impulses. *Cell*. 2014;157:664-75.
87. Miyamoto T, Mochizuki T, Nakagomi H, Kira S, Watanabe M, Takayama Y, Suzuki Y, Koizumi S, Takeda M and Tominaga M. Functional Role for Piezo1 in Stretch-evoked Ca<sup>2+</sup> Influx and ATP Release in Urothelial Cell Cultures. *J Biol Chem*. 2014;289:16565-16575.
88. Eisenhoffer GT, Loftus PD, Yoshigi M, Otsuna H, Chien CB, Morcos PA and Rosenblatt J. Crowding induces live cell extrusion to maintain homeostatic cell numbers in epithelia. *Nature*. 2012;484:546-9.
89. Andolfo I, Alper SL, De Franceschi L, Auriemma C, Russo R, De Falco L, Vallefucio F, Esposito MR, Vandorpe DH, Shmukler BE, Narayan R, Montanaro D, D'Armiento M, Vetro A, Limongelli I, Zuffardi O, Glader BE, Schrier SL, Brugnara C, Stewart GW, Delaunay J and Iolascon A. Multiple clinical forms of dehydrated hereditary stomatocytosis arise from mutations in PIEZO1. *Blood*. 2013;121:3925-35, S1-12.
90. Ranade SS, Qiu Z, Woo SH, Hur SS, Murthy SE, Cahalan SM, Xu J, Mathur J, Bandell M, Coste B, Li YS, Chien S and Patapoutian A. Piezo1, a mechanically activated ion channel, is required for vascular development in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111:10347-52.
91. Li J, Hou B, Tumova S, Muraki K, Bruns A, Ludlow MJ, Sedo A, Hyman AJ, McKeown L, Young RS, Yuldasheva NY, Majeed Y, Wilson LA, Rode B, Bailey MA, Kim HR, Fu Z, Carter DA, Bilton J, Imrie H, Ajuh P, Dear TN, Cubbon RM, Kearney MT, Prasad RK, Evans PC, Ainscough JF and Beech DJ. Piezo1 integration of vascular architecture with physiological force. *Nature*. 2014.
92. Bae C, Gnanasambandam R, Nicolai C, Sachs F and Gottlieb PA. Xerocytosis is caused by mutations that alter the kinetics of the mechanosensitive channel PIEZO1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110:E1162-8.
93. Beneteau C, Thierry G, Blesson S, Le Vaillant C, Picard V, Bene MC, Eveillard M and Le Caignec C. Recurrent mutation in the PIEZO1 gene in two families of hereditary xerocytosis with fetal hydrops. *Clinical genetics*. 2014;85:293-5.

94. Shmukler BE, Vandorpe DH, Rivera A, Auerbach M, Brugnara C and Alper SL. Dehydrated stomatocytic anemia due to the heterozygous mutation R2456H in the mechanosensitive cation channel PIEZO1: a case report. *Blood cells, molecules & diseases*. 2014;52:53-4.
95. Demolombe S, Duprat F, Honore E and Patel A. Slower Piezo1 inactivation in dehydrated hereditary stomatocytosis (xerocytosis). *Biophysical journal*. 2013;105:833-4.
96. Faucherre A, Kissa K, Nargeot J, Mangoni ME and Jopling C. Piezo1 plays a role in erythrocyte volume homeostasis. *Haematologica*. 2014;99:70-5.
97. McMillin MJ, Beck AE, Chong JX, Shively KM, Buckingham KJ, Gildersleeve HI, Aracena MI, Aylsworth AS, Bitoun P, Carey JC, Clericuzio CL, Crow YJ, Curry CJ, Devriendt K, Everman DB, Fryer A, Gibson K, Giovannucci Uzielli ML, Graham JM, Jr., Hall JG, Hecht JT, Heidenreich RA, Hurst JA, Irani S, Krapels IP, Leroy JG, Mowat D, Plant GT, Robertson SP, Schorry EK, Scott RH, Seaver LH, Sherr E, Splitt M, Stewart H, Stumpel C, Temel SG, Weaver DD, Whiteford M, Williams MS, Tabor HK, Smith JD, Shendure J, Nickerson DA, University of Washington Center for Mendelian G and Bamshad MJ. Mutations in PIEZO2 cause Gordon syndrome, Marden-Walker syndrome, and distal arthrogyriposis type 5. *American journal of human genetics*. 2014;94:734-44.
98. Resta TC, Broughton BR and Jernigan NL. Reactive oxygen species and RhoA signaling in vascular smooth muscle: role in chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*. 2010;661:355-73.
99. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *General physiology and biophysics*. 2005;24 Suppl 1:1-78.
100. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology*. 2000;16:521-55.
101. Ko EA, Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Yamamura H, Yoo HY, Tang H, Smith KA, Sundivakkam PC, Zeifman A, Ayon RJ, Makino A and Yuan JX. Functional characterization of voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channels in mouse pulmonary arterial smooth muscle cells: divergent effect of ROS. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:C1042-52.
102. Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MS, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A and Yuan JX. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013;305:L154-64.
103. Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Li KX, Cool C, Fagan K and Cribbs L. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circulation research*. 2005;96:864-72.
104. Firth AL, Remillard CV, Platoshyn O, Fantozzi I, Ko EA and Yuan JX. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulmonary circulation*. 2011;1:48-71.
105. Li J, Stevens L and Wray D. Molecular regions underlying the activation of low- and high-voltage activating calcium channels. *European biophysics journal : EBJ*. 2005;34:1017-29.
106. Kurejova M, Lacinova L, Pavlovicova M, Eschbach M and Klugbauer N. The effect of the outermost basic residues in the S4 segments of the Ca<sub>v</sub>(V)3.1 T-type calcium channel on channel gating. *Pflugers Arch*. 2007;455:527-39.

107. Kirber MT, Ordway RW, Clapp LH, Walsh JV, Jr. and Singer JJ. Both membrane stretch and fatty acids directly activate large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in vascular smooth muscle cells. *FEBS letters*. 1992;297:24-8.
108. Gueguinou M, Chantome A, Fromont G, Bougnoux P, Vandier C and Potier-Cartereau M. KCa and Ca channels: The complex thought. *Biochimica et biophysica acta*. 2014.
109. Ma Z, Lou XJ and Horrigan FT. Role of charged residues in the S1-S4 voltage sensor of BK channels. *The Journal of general physiology*. 2006;127:309-28.
110. Lee US and Cui J. BK channel activation: structural and functional insights. *Trends in neurosciences*. 2010;33:415-23.
111. Hill MA, Yang Y, Ella SR, Davis MJ and Braun AP. Large conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels (BKCa) and arteriolar myogenic signaling. *FEBS letters*. 2010;584:2033-42.
112. Suzuki Y, Yamamura H, Ohya S and Imaizumi Y. Caveolin-1 facilitates the direct coupling between large conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> (BKCa) and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> channels and their clustering to regulate membrane excitability in vascular myocytes. *J Biol Chem*. 2013;288:36750-61.
113. Zheng YM, Park SW, Stokes L, Tang Q, Xiao JH and Wang YX. Distinct activity of BK channel beta1-subunit in cerebral and pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;304:C780-9.
114. Roth M, Rupp M, Hofmann S, Mittal M, Fuchs B, Sommer N, Parajuli N, Quanz K, Schubert D, Dony E, Schermuly RT, Ghofrani HA, Sausbier U, Rutschmann K, Wilhelm S, Seeger W, Ruth P, Grimminger F, Sausbier M and Weissmann N. Heme oxygenase-2 and large-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: lung vascular effects of hypoxia. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2009;180:353-64.
115. Kauffenstein G, Laher I, Matrougui K, Guerineau NC and Henrion D. Emerging role of G protein-coupled receptors in microvascular myogenic tone. *Cardiovasc Res*. 2012;95:223-32.
116. Cipolla MJ, Sweet J, Chan SL, Tavares MJ, Gokina N and Brayden JE. Increased pressure-induced tone in rat parenchymal arterioles vs. middle cerebral arteries: role of ion channels and calcium sensitivity. *Journal of applied physiology*. 2014;117:53-9.
117. Abd El-Rahman RR, Harraz OF, Brett SE, Anfinogenova Y, Mufti RE, Goldman D and Welsh DG. Identification of L- and T-type Ca<sup>2+</sup> channels in rat cerebral arteries: role in myogenic tone development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304:H58-71.
118. Gebremedhin D, Terashvili M, Wickramasekera N, Zhang DX, Rau N, Miura H and Harder DR. Redox signaling via oxidative inactivation of PTEN modulates pressure-dependent myogenic tone in rat middle cerebral arteries. *PLoS one*. 2013;8:e68498.
119. Morita H, Honda A, Inoue R, Ito Y, Abe K, Nelson MT and Brayden JE. Membrane stretch-induced activation of a TRPM4-like nonselective cation channel in cerebral artery myocytes. *Journal of pharmacological sciences*. 2007;103:417-26.
120. Earley S, Straub SV and Brayden JE. Protein kinase C regulates vascular myogenic tone through activation of TRPM4. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H2613-22.
121. Earley S, Waldron BJ and Brayden JE. Critical role for transient receptor potential channel TRPM4 in myogenic constriction of cerebral arteries. *Circulation research*. 2004;95:922-9.
122. Welsh DG, Morielli AD, Nelson MT and Brayden JE. Transient receptor potential channels regulate myogenic tone of resistance arteries. *Circulation research*. 2002;90:248-50.



123. Suchyna TM, Markin VS and Sachs F. Biophysics and structure of the patch and the gigaseal. *Biophysical journal*. 2009;97:738-47.
124. Mederos y Schnitzler M, Storch U, Meibers S, Nurwakagari P, Breit A, Essin K, Gollasch M and Gudermann T. Gq-coupled receptors as mechanosensors mediating myogenic vasoconstriction. *The EMBO journal*. 2008;27:3092-103.
125. Gonzales AL, Yang Y, Sullivan MN, Sanders L, Dabertrand F, Hill-Eubanks DC, Nelson MT and Earley S. A PLCgamma1-dependent, force-sensitive signaling network in the myogenic constriction of cerebral arteries. *Sci Signal*. 2014;7:ra49.
126. Narayanan D, Bulley S, Leo MD, Burris SK, Gabrick KS, Boop FA and Jaggar JH. Smooth muscle cell transient receptor potential polycystin-2 (TRPP2) channels contribute to the myogenic response in cerebral arteries. *The Journal of physiology*. 2013;591:5031-46.
127. Nilius B. Polycystins under pressure. *Cell*. 2009;139:466-7.
128. Adebisi A, Zhao G, Cheranov SY, Ahmed A and Jaggar JH. Caveolin-1 abolishment attenuates the myogenic response in murine cerebral arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H1584-92.
129. Wesselman JP, VanBavel E, Pfaffendorf M and Spaan JA. Voltage-operated calcium channels are essential for the myogenic responsiveness of cannulated rat mesenteric small arteries. *Journal of vascular research*. 1996;33:32-41.
130. VanBavel E, Wesselman JP and Spaan JA. Myogenic activation and calcium sensitivity of cannulated rat mesenteric small arteries. *Circulation research*. 1998;82:210-20.
131. Miriel VA, Mauban JR, Blaustein MP and Wier WG. Local and cellular Ca<sup>2+</sup> transients in smooth muscle of pressurized rat resistance arteries during myogenic and agonist stimulation. *The Journal of physiology*. 1999;518 ( Pt 3):815-24.
132. Schleifenbaum J, Kassmann M, Szijarto IA, Hercule HC, Tano JY, Weinert S, Heidenreich M, Pathan AR, Anistan YM, Alenina N, Rusch NJ, Bader M, Jentsch TJ and Gollasch M. Stretch-Activation of Angiotensin II Type 1a Receptors Contributes to the Myogenic Response of Mouse Mesenteric and Renal Arteries. *Circulation research*. 2014;115:263-72.
133. Bhattachariya A, Dahan D, Turczynska KM, Sward K, Hellstrand P and Albinsson S. Expression of microRNAs is essential for arterial myogenic tone and pressure-induced activation of the PI3-kinase/Akt pathway. *Cardiovasc Res*. 2014;101:288-96.
134. Bjorling K, Morita H, Olsen MF, Prodan A, Hansen PB, Lory P, Holstein-Rathlou NH and Jensen LJ. Myogenic tone is impaired at low arterial pressure in mice deficient in the low-voltage-activated Ca<sub>v</sub> 3.1 T-type Ca(2+) channel. *Acta physiologica*. 2013;207:709-20.
135. Zhang J, Berra-Romani R, Sinnegger-Brauns MJ, Striessnig J, Blaustein MP and Matteson DR. Role of Cav1.2 L-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular tone: effects of nifedipine and Mg<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;292:H415-25.
136. Dubroca C, Loyer X, Retailleau K, Loirand G, Pacaud P, Feron O, Balligand JL, Levy BI, Heymes C and Henrion D. RhoA activation and interaction with Caveolin-1 are critical for pressure-induced myogenic tone in rat mesenteric resistance arteries. *Cardiovasc Res*. 2007;73:190-7.
137. Amin AH, Abd Elmageed ZY, Partyka M and Matrougui K. Mechanisms of myogenic tone of coronary arteriole: Role of down stream signaling of the EGFR tyrosine kinase. *Microvascular research*. 2011;81:135-42.
138. Potocnik SJ, Murphy TV, Kotecha N and Hill MA. Effects of mibefradil and nifedipine on arteriolar myogenic responsiveness and intracellular Ca(2+). *British journal of pharmacology*. 2000;131:1065-72.

139. Belin de Chantemele EJ, Retailleau K, Pinaud F, Vessieres E, Bocquet A, Guihot AL, Lemaire B, Domenga V, Baufreton C, Loufrani L, Joutel A and Henrion D. Notch3 is a major regulator of vascular tone in cerebral and tail resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2216-24.
140. Retailleau K, Toutain B, Galmiche G, Fassot C, Sharif-Naeini R, Kauffenstein G, Mericskay M, Duprat F, Grimaud L, Merot J, Lardeux A, Pizard A, Baudrie V, Jeunemaitre X, Feil R, Gothert JR, Lacolley P, Henrion D, Li Z and Loufrani L. Selective involvement of serum response factor in pressure-induced myogenic tone in resistance arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:339-46.
141. Wu GB, Zhou EX, Qing DX and Li J. Role of potassium channels in regulation of rat coronary arteriole tone. *European journal of pharmacology.* 2009;620:57-62.
142. Baxter KA, Laher I, Church J and Hsiang YN. Acidosis augments myogenic constriction in rat coronary arteries. *Annals of vascular surgery.* 2006;20:630-7.
143. Park KS, Kim Y, Lee YH, Earm YE and Ho WK. Mechanosensitive cation channels in arterial smooth muscle cells are activated by diacylglycerol and inhibited by phospholipase C inhibitor. *Circulation research.* 2003;93:557-64.
144. Saito M, Tanabe Y, Kudo I and Nakayama K. Endothelium-derived prostaglandin H2 evokes the stretch-induced contraction of rabbit pulmonary artery. *European journal of pharmacology.* 2003;467:151-61.
145. Yamamoto K and Ando J. Endothelial cell and model membranes respond to shear stress by rapidly decreasing the order of their lipid phases. *J Cell Sci.* 2012;126:1227-34.
146. Rizzo V, McIntosh DP, Oh P and Schnitzer JE. In situ flow activates endothelial nitric oxide synthase in luminal caveolae of endothelium with rapid caveolin dissociation and calmodulin association. *J Biol Chem.* 1998;273:34724-9.
147. Rizzo V, Sung A, Oh P and Schnitzer JE. Rapid mechanotransduction in situ at the luminal cell surface of vascular endothelium and its caveolae. *The Journal of biological chemistry.* 1998;273:26323-9.
148. Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Kumagaya S, Taketani Y, Kamiya A and Ando J. Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293:H1646-53.
149. Yamamoto K, Furuya K, Nakamura M, Kobatake E, Sokabe M and Ando J. Visualization of flow-induced ATP release and triggering of Ca<sup>2+</sup> waves at caveolae in vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 2011;124:3477-83.
150. Yamamoto K, Sokabe T, Ohura N, Nakatsuka H, Kamiya A and Ando J. Endogenously released ATP mediates shear stress-induced Ca<sup>2+</sup> influx into pulmonary artery endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285:H793-803.
151. Sukumaran SV, Singh TU, Parida S, Narasimha Reddy Ch E, Thangamalai R, Kandasamy K, Singh V and Mishra SK. TRPV4 channel activation leads to endothelium-dependent relaxation mediated by nitric oxide and endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat pulmonary artery. *Pharmacol Res.* 2013;78:18-27.
152. Ma X, Du J, Zhang P, Deng J, Liu J, Lam FF, Li RA, Huang Y, Jin J and Yao X. Functional role of TRPV4-KCa<sub>v</sub>2.3 signaling in vascular endothelial cells in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Hypertension.* 2012;62:134-9.
153. Suresh Babu S, Wojtowicz A, Freichel M, Birnbaumer L, Hecker M and Cattaruzza M. Mechanism of stretch-induced activation of the mechanotransducer zyxin in vascular cells. *Sci Signal.* 2012;5:ra91.

154. Weibel ER and Palade GE. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *The Journal of cell biology*. 1964;23:101-12.
155. Rusu L, Andreeva A, Visintine DJ, Kim K, Vogel SM, Stojanovic-Terpo A, Chernaya O, Liu G, Bakhshi FR, Haberichter SL, Iwanari H, Kusano-Arai O, Suzuki N, Hamakubo T, Kozasa T, Cho J, Du X and Minshall RD. G protein-dependent basal and evoked endothelial cell vWF secretion. *Blood*. 2014;123:442-50.
156. Ariyaratnam P, Loubani M and Morice AH. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in humans. *BioMed research international*. 2013;2013:623684.
157. Connolly MJ, Prieto-Lloret J, Becker S, Ward JP and Aaronson PI. Hypoxic pulmonary vasoconstriction in the absence of pretone: essential role for intracellular Ca<sup>2+</sup> release. *The Journal of physiology*. 2013;591:4473-98.
158. Palade G. Fine structure of blood capillaries. *J Appl Phys*. 1953;24 (1953), p. 1424.
159. Head BP, Patel HH and Insel PA. Interaction of membrane/lipid rafts with the cytoskeleton: impact on signaling and function: membrane/lipid rafts, mediators of cytoskeletal arrangement and cell signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1838:532-45.
160. Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M and van Deurs B. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell*. 2002;13:238-50.
161. Epand RM, Sayer BG and Epand RF. Caveolin scaffolding region and cholesterol-rich domains in membranes. *Journal of molecular biology*. 2005;345:339-50.
162. Pol A, Martin S, Fernandez MA, Ingelmo-Torres M, Ferguson C, Enrich C and Parton RG. Cholesterol and fatty acids regulate dynamic caveolin trafficking through the Golgi complex and between the cell surface and lipid bodies. *Mol Biol Cell*. 2005;16:2091-105.
163. Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV and Simons K. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92:10339-43.
164. Pelkmans L and Zerial M. Kinase-regulated quantal assemblies and kiss-and-run recycling of caveolae. *Nature*. 2005;436:128-33.
165. Ortegren U, Karlsson M, Blazic N, Blomqvist M, Nystrom FH, Gustavsson J, Fredman P and Stralfors P. Lipids and glycosphingolipids in caveolae and surrounding plasma membrane of primary rat adipocytes. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2004;271:2028-36.
166. Ostrom RS and Liu X. Detergent and detergent-free methods to define lipid rafts and caveolae. *Methods in molecular biology*. 2007;400:459-68.
167. Christian AE, Haynes MP, Phillips MC and Rothblat GH. Use of cyclodextrins for manipulating cellular cholesterol content. *Journal of lipid research*. 1997;38:2264-72.
168. Hailstones D, Sler LS, Parton RG and Stanley KK. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *Journal of lipid research*. 1998;39:369-79.
169. Fridolfsson HN, Roth DM, Insel PA and Patel HH. Regulation of intracellular signaling and function by caveolin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2014.
170. Cohen AW, Hnasko R, Schubert W and Lisanti MP. Role of caveolae and caveolins in health and disease. *Physiol Rev*. 2004;84:1341-79.
171. Fujimoto T, Kogo H, Nomura R and Une T. Isoforms of caveolin-1 and caveolar structure. *J Cell Sci*. 2000;113 Pt 19:3509-17.
172. Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H, Jr., Christ GJ, Edelmann W and Lisanti MP. Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe

- pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Molecular and cellular biology*. 2002;22:2329-44.
173. Park DS, Cohen AW, Frank PG, Razani B, Lee H, Williams TM, Chandra M, Shirani J, De Souza AP, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Weiss LM, Tanowitz HB and Lisanti MP. Caveolin-1 null (-/-) mice show dramatic reductions in life span. *Biochemistry*. 2003;42:15124-31.
174. Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J, Jr. and Chien KR. Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:11375-80.
175. Williams TM and Lisanti MP. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Annals of medicine*. 2004;36:584-95.
176. Fridolfsson HN, Kawaraguchi Y, Ali SS, Panneerselvam M, Niesman IR, Finley JC, Kellerhals SE, Migita MY, Okada H, Moreno AL, Jennings M, Kidd MW, Bonds JA, Balijepalli RC, Ross RS, Patel PM, Miyanohara A, Chen Q, Lesnefsky EJ, Head BP, Roth DM, Insel PA and Patel HH. Mitochondria-localized caveolin in adaptation to cellular stress and injury. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2012;26:4637-49.
177. Bazan-Perkins B, Carbajal V, Sommer B, Macias-Silva M, Gonzalez-Martinez M, Valenzuela F, Daniel EE and Montano LM. Involvement of different Ca<sup>2+</sup> pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca<sup>2+</sup>-free medium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*. 1998;358:567-73.
178. Daniel EE, El-Yazbi A and Cho WJ. Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2006;10:529-44.
179. Popescu LM, Diculescu I, Zelck U and Ionescu N. Ultrastructural distribution of calcium in smooth muscle cells of guinea-pig taenia coli. A correlated electron microscopic and quantitative study. *Cell and tissue research*. 1974;154:357-78.
180. Haack DW, Abel JH, Jr. and Jaenke RS. Effects of hypoxia on the distribution of calcium in arterial smooth muscle cells of rats and swine. *Cell and tissue research*. 1975;157:125-40.
181. Rizzo V, Morton C, DePaola N, Schnitzer JE and Davies PF. Recruitment of endothelial caveolae into mechanotransduction pathways by flow conditioning in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1720-9.
182. Boyd NL, Park H, Yi H, Boo YC, Sorescu GP, Sykes M and Jo H. Chronic shear induces caveolae formation and alters ERK and Akt responses in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285:H1113-22.
183. Yu J, Bergaya S, Murata T, Alp IF, Bauer MP, Lin MI, Drab M, Kurzchalia TV, Stan RV and Sessa WC. Direct evidence for the role of caveolin-1 and caveolae in mechanotransduction and remodeling of blood vessels. *J Clin Invest*. 2006;116:1284-91.
184. Kozera L, White E and Calaghan S. Caveolae act as membrane reserves which limit mechanosensitive I(Cl,swell) channel activation during swelling in the rat ventricular myocyte. *PloS one*. 2009;4:e8312.
185. Sinha B, Koster D, Ruez R, Gonnord P, Bastiani M, Abankwa D, Stan RV, Butler-Browne G, Védie B, Johannes L, Morone N, Parton RG, Raposo G, Sens P, Lamaze C and Nassoy P. Cells respond to mechanical stress by rapid disassembly of caveolae. *Cell*. 2011;144:402-13.
186. Parton RG and del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2013;14:98-112.

187. Fisher JL, Levitan I and Margulies SS. Plasma membrane surface increases with tonic stretch of alveolar epithelial cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2004;31:200-8.
188. Dulhunty AF and Franzini-Armstrong C. The relative contributions of the folds and caveolae to the surface membrane of frog skeletal muscle fibres at different sarcomere lengths. *The Journal of physiology*. 1975;250:513-39.
189. Lee J and Schmid-Schonbein GW. Biomechanics of skeletal muscle capillaries: hemodynamic resistance, endothelial distensibility, and pseudopod formation. *Annals of biomedical engineering*. 1995;23:226-46.
190. Potocnik SJ, Jenkins N, Murphy TV and Hill MA. Membrane cholesterol depletion with beta-cyclodextrin impairs pressure-induced contraction and calcium signalling in isolated skeletal muscle arterioles. *Journal of vascular research*. 2007;44:292-302.
191. Albinsson S, Shakirova Y, Rippe A, Baumgarten M, Rosengren BI, Rippe C, Hallmann R, Hellstrand P, Rippe B and Sward K. Arterial remodeling and plasma volume expansion in caveolin-1-deficient mice. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology*. 2007;293:R1222-31.
192. Sedding DG, Hermsen J, Seay U, Eickelberg O, Kummer W, Schwencke C, Strasser RH, Tillmanns H and Braun-Dullaeus RC. Caveolin-1 facilitates mechanosensitive protein kinase B (Akt) signaling in vitro and in vivo. *Circulation research*. 2005;96:635-42.
193. Lei L, Lu S, Wang Y, Kim T, Mehta D and Wang Y. The role of mechanical tension on lipid raft dependent PDGF-induced TRPC6 activation. *Biomaterials*. 2014;35:2868-77.
194. Huang H, Bae C, Sachs F and Suchyna TM. Caveolae regulation of mechanosensitive channel function in myotubes. *PloS one*. 2013;8:e72894.
195. Insel PA and Patel HH. Membrane rafts and caveolae in cardiovascular signaling. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2009;18:50-6.
196. Bakhshi FR, Mao M, Shajahan AN, Piegeler T, Chen Z, Chernaya O, Sharma T, Elliott WM, Szulcek R, Bogaard HJ, Comhair S, Erzurum S, van Nieuw Amerongen GP, Bonini MG and Minshall RD. Nitrosation-dependent caveolin 1 phosphorylation, ubiquitination, and degradation and its association with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2013;3:816-30.
197. Dereddy N, Huang J, Erb M, Guzel S, Wolk JH, Sett SS, Gewitz MH and Mathew R. Associated inflammation or increased flow-mediated shear stress, but not pressure alone, disrupts endothelial caveolin-1 in infants with pulmonary hypertension. *Pulmonary circulation*. 2012;2:492-500.
198. Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, Richard V, Muller B and Leblais V. Role of G(i/o)-Src kinase-PI3K/Akt pathway and caveolin-1 in beta(2)-adrenoceptor coupling to endothelial NO synthase in mouse pulmonary artery. *Cellular signalling*. 2011;23:1136-43.
199. Jasmin JF, Mercier I, Dupuis J, Tanowitz HB and Lisanti MP. Short-term administration of a cell-permeable caveolin-1 peptide prevents the development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy. *Circulation*. 2006;114:912-20.
200. Ramos M, Lame MW, Segall HJ and Wilson DW. The BMP type II receptor is located in lipid rafts, including caveolae, of pulmonary endothelium in vivo and in vitro. *Vascular pharmacology*. 2006;44:50-9.
201. Kogo H, Aiba T and Fujimoto T. Cell type-specific occurrence of caveolin-1alpha and -1beta in the lung caused by expression of distinct mRNAs. *J Biol Chem*. 2004;279:25574-81.



202. Mathew R, Huang J, Shah M, Patel K, Gewitz M and Sehgal PB. Disruption of endothelial-cell caveolin-1 $\alpha$ /raft scaffolding during development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation*. 2004;110:1499-506.
203. Hofmann A, Gosemann JH, Takahashi T, Friedmacher F, Duesse JW and Puri P. Imbalance of Caveolin-1 and eNOS Expression in the Pulmonary Vasculature of Experimental Diaphragmatic Hernia. *Birth defects research Part B, Developmental and reproductive toxicology*. 2014.
204. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I and Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca<sup>2+</sup>(+) signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302:H1546-62.
205. Frazziano G, Moreno L, Moral-Sanz J, Menendez C, Escolano L, Gonzalez C, Villamor E, Alvarez-Sala JL, Cogolludo AL and Perez-Vizcaino F. Neutral sphingomyelinase, NADPH oxidase and reactive oxygen species. Role in acute hypoxic pulmonary vasoconstriction. *J Cell Physiol*. 2011;226:2633-40.
206. Huber LC, Soltermann A, Fischler M, Gay S, Weder W, Russi EW, Speich R and Ulrich S. Caveolin-1 Expression and Hemodynamics in COPD Patients. *The open respiratory medicine journal*. 2009;3:73-8.
207. Ghosh B, Kar P, Mandal A, Dey K, Chakraborti T and Chakraborti S. Ca<sup>2+</sup> influx mechanisms in caveolae vesicles of pulmonary smooth muscle plasma membrane under inhibition of  $\alpha$ 2 $\beta$ 1 isozyme of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase by ouabain. *Life sciences*. 2009;84:139-48.
208. Zheng YM, Wang QS, Liu QH, Rathore R, Yadav V and Wang YX. Heterogeneous gene expression and functional activity of ryanodine receptors in resistance and conduit pulmonary as well as mesenteric artery smooth muscle cells. *Journal of vascular research*. 2008;45:469-79.
209. Billaud M, Lohman AW, Johnstone SR, Biber LA, Mutchler S and Isakson BE. Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall. *Pharmacological reviews*. 2014;66:513-69.
210. van Breemen C, Fameli N and Evans AM. Pan-junctional sarcoplasmic reticulum in vascular smooth muscle: nanospace Ca<sup>2+</sup> transport for site- and function-specific Ca<sup>2+</sup> signalling. *The Journal of physiology*. 2013;591:2043-54.
211. Lam AK and Galione A. The endoplasmic reticulum and junctional membrane communication during calcium signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1833:2542-59.
212. Amador FJ, Stathopoulos PB, Enomoto M and Ikura M. Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies. *Febs J*. 2013;280:5456-70.
213. Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD and Hamilton SL. Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:a003996.
214. Stathopoulos PB, Seo MD, Enomoto M, Amador FJ, Ishiyama N and Ikura M. Themes and variations in ER/SR calcium release channels: structure and function. *Physiology (Bethesda)*. 2012;27:331-42.
215. Gyorke S and Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2008;77:245-55.
216. Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ and Chen SR. Caffeine induces Ca<sup>2+</sup> release by reducing the threshold for luminal Ca<sup>2+</sup> activation of the ryanodine receptor. *Biochem J*. 2008;414:441-52.

217. Fill M and Copello JA. Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol Rev.* 2002;82:893-922.
218. Wagner LE, 2nd, Groom LA, Dirksen RT and Yule DI. Characterization of ryanodine receptor type 1 single channel activity using "on-nucleus" patch clamp. *Cell calcium.* 2014;56:96-107.
219. Zhao F, Li P, Chen SR, Louis CF and Fruen BR. Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity. *J Biol Chem.* 2001;276:13810-6.
220. Kouzu Y, Moriya T, Takeshima H, Yoshioka T and Shibata S. Mutant mice lacking ryanodine receptor type 3 exhibit deficits of contextual fear conditioning and activation of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in the hippocampus. *Brain research Molecular brain research.* 2000;76:142-50.
221. Matsuo N, Tanda K, Nakanishi K, Yamasaki N, Toyama K, Takao K, Takeshima H and Miyakawa T. Comprehensive behavioral phenotyping of ryanodine receptor type 3 (RyR3) knockout mice: decreased social contact duration in two social interaction tests. *Frontiers in behavioral neuroscience.* 2009;3:3.
222. Takeshima H, Iino M, Takekura H, Nishi M, Kuno J, Minowa O, Takano H and Noda T. Excitation-contraction uncoupling and muscular degeneration in mice lacking functional skeletal muscle ryanodine-receptor gene. *Nature.* 1994;369:556-9.
223. Takeshima H, Komazaki S, Hirose K, Nishi M, Noda T and Iino M. Embryonic lethality and abnormal cardiac myocytes in mice lacking ryanodine receptor type 2. *The EMBO journal.* 1998;17:3309-16.
224. Narayanan D, Adebisi A and Jaggar JH. Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2012;302:H2190-210.
225. Rebecchi MJ and Pentylala SN. Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 2000;80:1291-335.
226. Adebisi A, Zhao G, Narayanan D, Thomas-Gatewood CM, Bannister JP and Jaggar JH. Isoform-selective physical coupling of TRPC3 channels to IP3 receptors in smooth muscle cells regulates arterial contractility. *Circulation research.* 2010;106:1603-12.
227. Zhao G, Neeb ZP, Leo MD, Pachuau J, Adebisi A, Ouyang K, Chen J and Jaggar JH. Type 1 IP3 receptors activate BKCa channels via local molecular coupling in arterial smooth muscle cells. *The Journal of general physiology.* 2010;136:283-91.
228. Brini M and Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. *Physiol Rev.* 2009;89:1341-78.
229. Dally S, Corvazier E, Bredoux R, Bobe R and Enouf J. Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:633-44.
230. Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE and MacLennan DH. Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem.* 1992;267:14483-9.
231. Lambole CR, Murphy RM, McKenna MJ and Lamb GD. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> uptake and leak properties, and SERCA isoform expression, in type I and type II fibres of human skeletal muscle. *The Journal of physiology.* 2014;592:1381-95.
232. Redondo PC, Salido GM, Pariente JA, Sage SO and Rosado JA. SERCA2b and 3 play a regulatory role in store-operated calcium entry in human platelets. *Cellular signalling.* 2008;20:337-46.

233. Ravier MA, Daro D, Roma LP, Jonas JC, Cheng-Xue R, Schuit FC and Gilon P. Mechanisms of control of the free  $\text{Ca}^{2+}$  concentration in the endoplasmic reticulum of mouse pancreatic beta-cells: interplay with cell metabolism and  $[\text{Ca}^{2+}]_c$  and role of SERCA2b and SERCA3. *Diabetes*. 2011;60:2533-45.
234. Kao J, Fortner CN, Liu LH, Shull GE and Paul RJ. Ablation of the SERCA3 gene alters epithelium-dependent relaxation in mouse tracheal smooth muscle. *The American journal of physiology*. 1999;277:L264-70.
235. Liu LH, Paul RJ, Sutliff RL, Miller ML, Lorenz JN, Pun RY, Duffy JJ, Doetschman T, Kimura Y, MacLennan DH, Hoying JB and Shull GE. Defective endothelium-dependent relaxation of vascular smooth muscle and endothelial cell  $\text{Ca}^{2+}$  signaling in mice lacking sarco(endo)plasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase isoform 3. *J Biol Chem*. 1997;272:30538-45.
236. Lipskaia L, Keuylian Z, Blirando K, Mougnot N, Jacquet A, Rouxel C, Sghairi H, Elaib Z, Blaise R, Adnot S, Hajjar RJ, Chemaly ER, Limon I and Bobe R. Expression of sarco (endo) plasmic reticulum calcium ATPase (SERCA) system in normal mouse cardiovascular tissues, heart failure and atherosclerosis. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843:2705-2718.
237. Balint Z, Zabini D, Konya V, Nagaraj C, Vegh AG, Varo G, Wilhelm I, Fazakas C, Krizbai IA, Heinemann A, Olschewski H and Olschewski A. Double-stranded RNA attenuates the barrier function of human pulmonary artery endothelial cells. *PloS one*. 2013;8:e63776.
238. Van Hove CE, Van der Donckt C, Herman AG, Bult H and Fransen P. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*. 2009;158:920-30.
239. Papp B, Enyedi A, Paszty K, Kovacs T, Sarkadi B, Gardos G, Magnier C, Wuytack F and Enouf J. Simultaneous presence of two distinct endoplasmic-reticulum-type calcium-pump isoforms in human cells. Characterization by radio-immunoblotting and inhibition by 2,5-di-(t-butyl)-1,4-benzohydroquinone. *Biochem J*. 1992;288 ( Pt 1):297-302.
240. Clark JH, Kinneer NP, Kalujnaia S, Cramb G, Fleischer S, Jeyakumar LH, Wuytack F and Evans AM. Identification of functionally segregated sarcoplasmic reticulum calcium stores in pulmonary arterial smooth muscle. *J Biol Chem*. 2010;285:13542-9.
241. Verboomen H, Wuytack F, De Smedt H, Himpens B and Casteels R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b  $\text{Ca}^{2+}$  pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J*. 1992;286 ( Pt 2):591-5.
242. Inesi G, Lewis D, Toyoshima C, Hirata A and de Meis L. Conformational fluctuations of the  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in the native membrane environment. Effects of pH, temperature, catalytic substrates, and thapsigargin. *J Biol Chem*. 2008;283:1189-96.
243. Hauser K and Barth A. Side-chain protonation and mobility in the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase: implications for proton countertransport and  $\text{Ca}^{2+}$  release. *Biophysical journal*. 2007;93:3259-70.
244. Jensen AM, Sorensen TL, Olesen C, Moller JV and Nissen P. Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump. *The EMBO journal*. 2006;25:2305-14.
245. Moncoq K, Trieber CA and Young HS. The molecular basis for cyclopiazonic acid inhibition of the sarcoplasmic reticulum calcium pump. *J Biol Chem*. 2007;282:9748-57.
246. Greenberg B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Butler J, Felker GM, Voors AA, Rudy JJ, Wagner K and Hajjar RJ. Design of a phase 2b trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with advanced heart failure: the CUPID 2 trial (calcium up-regulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease phase 2b). *JACC Heart failure*. 2014;2:84-92.



247. Gwathmey JK, Yerevanian A and Hajjar RJ. Targeting sarcoplasmic reticulum calcium ATPase by gene therapy. *Human gene therapy*. 2013;24:937-47.
248. Zsebo K, Yaroshinsky A, Rudy JJ, Wagner K, Greenberg B, Jessup M and Hajjar RJ. Long-term effects of AAV1/SERCA2a gene transfer in patients with severe heart failure: analysis of recurrent cardiovascular events and mortality. *Circulation research*. 2014;114:101-8.
249. McCarron JG, Olson ML and Chalmers S. Mitochondrial regulation of cytosolic Ca<sup>2+</sup>(+) signals in smooth muscle. *Pflugers Arch*. 2012;464:51-62.
250. Drummond RM and Tuft RA. Release of Ca<sup>2+</sup> from the sarcoplasmic reticulum increases mitochondrial [Ca<sup>2+</sup>] in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of physiology*. 1999;516 ( Pt 1):139-47.
251. Morgan AJ, Platt FM, Lloyd-Evans E and Galione A. Molecular mechanisms of endolysosomal Ca<sup>2+</sup> signalling in health and disease. *Biochem J*. 2011;439:349-74.
252. Clapper DL, Walseth TF, Dargie PJ and Lee HC. Pyridine nucleotide metabolites stimulate calcium release from sea urchin egg microsomes desensitized to inositol trisphosphate. *J Biol Chem*. 1987;262:9561-8.
253. Li PL, Zhang Y, Abais JM, Ritter JK and Zhang F. Cyclic ADP-Ribose and NAADP in Vascular Regulation and Diseases. *Messenger (Los Angel)*. 2013;2:63-85.
254. Xu M, Xia M, Li XX, Han WQ, Boini KM, Zhang F, Zhang Y, Ritter JK and Li PL. Requirement of translocated lysosomal V1 H(+)-ATPase for activation of membrane acid sphingomyelinase and raft clustering in coronary endothelial cells. *Mol Biol Cell*. 2012;23:1546-57.
255. Zhang F, Zhang G, Zhang AY, Koeberl MJ, Wallander E and Li PL. Production of NAADP and its role in Ca<sup>2+</sup> mobilization associated with lysosomes in coronary arterial myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2006;291:H274-82.
256. Kinnear NP, Boittin FX, Thomas JM, Galione A and Evans AM. Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1. *J Biol Chem*. 2004;279:54319-26.
257. Jiang YL, Lin AH, Xia Y, Lee S, Paudel O, Sun H, Yang XR, Ran P and Sham JS. Nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) Activates Global and Heterogeneous Local Ca<sup>2+</sup> Signals from NAADP- and Ryanodine Receptor-gated Ca<sup>2+</sup> Stores in Pulmonary Arterial myocytes. *J Biol Chem*. 2013.
258. Gambara G, Billington RA, Debidda M, D'Alessio A, Palombi F, Ziparo E, Genazzani AA and Filippini A. NAADP-induced Ca<sup>2+</sup> signaling in response to endothelin is via the receptor subtype B and requires the integrity of lipid rafts/caveolae. *J Cell Physiol*. 2008;216:396-404.
259. Calcraft PJ, Ruas M, Pan Z, Cheng X, Arredouani A, Hao X, Tang J, Rietdorf K, Teboul L, Chuang KT, Lin P, Xiao R, Wang C, Zhu Y, Lin Y, Wyatt CN, Parrington J, Ma J, Evans AM, Galione A and Zhu MX. NAADP mobilizes calcium from acidic organelles through two-pore channels. *Nature*. 2009;459:596-600.
260. Cai X and Patel S. Degeneration of an intracellular ion channel in the primate lineage by relaxation of selective constraints. *Mol Biol Evol*. 2010;27:2352-9.
261. Pitt SJ, Lam AK, Rietdorf K, Galione A and Sitsapesan R. Reconstituted human TPC1 is a proton-permeable ion channel and is activated by NAADP or Ca<sup>2+</sup>. *Sci Signal*. 2014;7:ra46.
262. Wang X, Zhang X, Dong XP, Samie M, Li X, Cheng X, Goschka A, Shen D, Zhou Y, Harlow J, Zhu MX, Clapham DE, Ren D and Xu H. TPC proteins are phosphoinositide-activated sodium-selective ion channels in endosomes and lysosomes. *Cell*. 2012;151:372-83.

263. Morgan AJ and Galione A. Two-pore channels (TPCs): current controversies. *Bioessays*. 2013;36:173-83.
264. Kilpatrick BS, Eden ER, Schapira AH, Futter CE and Patel S. Direct mobilisation of lysosomal Ca<sup>2+</sup> triggers complex Ca<sup>2+</sup> signals. *J Cell Sci*. 2013;126:60-6.
265. Fameli N, Ogunbayo OA, van Breemen C and Evans AM. Cytoplasmic nanojunctions between lysosomes and sarcoplasmic reticulum are required for specific calcium signaling. *F1000Research*. 2014;3:93.
266. Lopez JJ, Jardin I, Bobe R, Pariente JA, Enouf J, Salido GM and Rosado JA. STIM1 regulates acidic Ca<sup>2+</sup> store refilling by interaction with SERCA3 in human platelets. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:2157-64.
267. Jha A, Brailoiu E and Muallem S. How does NAADP release lysosomal Ca<sup>2+</sup>? *Channels*. 2014;8.
268. Naylor E, Arredouani A, Vasudevan SR, Lewis AM, Parkesh R, Mizote A, Rosen D, Thomas JM, Izumi M, Ganesan A, Galione A and Churchill GC. Identification of a chemical probe for NAADP by virtual screening. *Nat Chem Biol*. 2009;5:220-6.
269. Rosen D, Lewis AM, Mizote A, Thomas JM, Aley PK, Vasudevan SR, Parkesh R, Galione A, Izumi M, Ganesan A and Churchill GC. Analogues of the nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP) antagonist Ned-19 indicate two binding sites on the NAADP receptor. *J Biol Chem*. 2009;284:34930-4.
270. Churchill GC, Okada Y, Thomas JM, Genazzani AA, Patel S and Galione A. NAADP mobilizes Ca<sup>2+</sup> from reserve granules, lysosome-related organelles, in sea urchin eggs. *Cell*. 2002;111:703-8.
271. Yang XR, Lin MJ, Yip KP, Jeyakumar LH, Fleischer S, Leung GP and Sham JS. Multiple ryanodine receptor subtypes and heterogeneous ryanodine receptor-gated Ca<sup>2+</sup> stores in pulmonary arterial smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2005;289:L338-48.
272. Zheng YM, Wang QS, Rathore R, Zhang WH, Mazurkiewicz JE, Sorrentino V, Singer HA, Kotlikoff MI and Wang YX. Type-3 ryanodine receptors mediate hypoxia-, but not neurotransmitter-induced calcium release and contraction in pulmonary artery smooth muscle cells. *The Journal of general physiology*. 2005;125:427-40.
273. Firth AL, Gordienko DV, Yuill KH and Smirnov SV. Cellular localization of mitochondria contributes to Kv channel-mediated regulation of cellular excitability in pulmonary but not mesenteric circulation. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;296:L347-60.
274. Zhang WM, Yip KP, Lin MJ, Shimoda LA, Li WH and Sham JS. ET-1 activates Ca<sup>2+</sup> sparks in PASMC: local Ca<sup>2+</sup> signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2003;285:L680-90.
275. Olschewski A, Papp R, Nagaraj C and Olschewski H. Ion channels and transporters as therapeutic targets in the pulmonary circulation. *Pharmacology & therapeutics*. 2014.
276. Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau JP, Rousseau E and Guibert C. Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery. *The European respiratory journal*. 2009;34:1338-47.
277. Ducret T, Guibert C, Marthan R and Savineau JP. Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell calcium*. 2008;43:315-23.

278. Earley S and Leblanc N. Serotonin receptors take the TRiPV4 highway in chronic hypoxic pulmonary hypertension. Focus on "TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension". *Am J Physiol Cell Physiol*. 2013;305:C690-2.
279. Mazzuca MQ and Khalil RA. Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease. *Biochem Pharmacol*. 2012;84:147-62.
280. Toda M, Yamamoto K, Shimizu N, Obi S, Kumagaya S, Igarashi T, Kamiya A and Ando J. Differential gene responses in endothelial cells exposed to a combination of shear stress and cyclic stretch. *Journal of biotechnology*. 2008;133:239-44.
281. Hasdai D, Holmes DR, Jr., Garratt KN, Edwards WD and Lerman A. Mechanical pressure and stretch release endothelin-1 from human atherosclerotic coronary arteries in vivo. *Circulation*. 1997;95:357-62.
282. Macarthur H, Warner TD, Wood EG, Corder R and Vane JR. Endothelin-1 release from endothelial cells in culture is elevated both acutely and chronically by short periods of mechanical stretch. *Biochemical and biophysical research communications*. 1994;200:395-400.
283. Li M, Stenmark KR, Shandas R and Tan W. Effects of pathological flow on pulmonary artery endothelial production of vasoactive mediators and growth factors. *Journal of vascular research*. 2009;46:561-71.
284. Helset E, Kjaeve J, Bjertnaes L and Lundberg JM. Acute alveolar hypoxia increases endothelin-1 release but decreases release of calcitonin gene-related peptide in isolated perfused rat lungs. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1995;55:369-76.
285. Davie N, Haleen SJ, Upton PD, Polak JM, Yacoub MH, Morrell NW and Wharton J. ET(A) and ET(B) receptors modulate the proliferation of human pulmonary artery smooth muscle cells. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2002;165:398-405.
286. Takahashi H, Soma S, Muramatsu M, Oka M, Ienaga H and Fukuchi Y. Discrepant distribution of big endothelin (ET)-1 and ET receptors in the pulmonary artery. *The European respiratory journal*. 2001;18:5-14.
287. Hall SM, Davie N, Klein N and Haworth SG. Endothelin receptor expression in idiopathic pulmonary arterial hypertension: effect of bosentan and epoprostenol treatment. *The European respiratory journal*. 2011;38:851-60.
288. Sauvageau S, Thorin E, Caron A and Dupuis J. Endothelin-1-induced pulmonary vasoreactivity is regulated by ET(A) and ET(B) receptor interactions. *Journal of vascular research*. 2007;44:375-81.
289. Hyvelin JM, Guibert C, Marthan R and Savineau JP. Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol*. 1998;275:L269-82.
290. MacLean MR, McCulloch KM and Baird M. Endothelin ETA- and ETB-receptor-mediated vasoconstriction in rat pulmonary arteries and arterioles. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 1994;23:838-45.
291. Dreja K, Voldstedlund M, Vinten J, Tranum-Jensen J, Hellstrand P and Sward K. Cholesterol depletion disrupts caveolae and differentially impairs agonist-induced arterial contraction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1267-72.
292. Yamaguchi T, Murata Y, Fujiyoshi Y and Doi T. Regulated interaction of endothelin B receptor with caveolin-1. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2003;270:1816-27.

293. Cui S, Ho WK, Kim ST and Cho H. Agonist-induced localization of Gq-coupled receptors and G protein-gated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels to caveolae determines receptor specificity of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate signaling. *J Biol Chem*. 2010;285:41732-9.
294. Thai TL, Churchill GC and Arendshorst WJ. NAADP receptors mediate calcium signaling stimulated by endothelin-1 and norepinephrine in renal afferent arterioles. *American journal of physiology Renal physiology*. 2009;297:F510-6.
295. Shimoda LA, Sylvester JT and Sham JS. Mobilization of intracellular Ca<sup>2+</sup> by endothelin-1 in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;278:L157-64.
296. Kato K, Okamura K, Hatta M, Morita H, Kajioka S, Naito S and Yamazaki J. Involvement of IP<sub>3</sub>-receptor activation in endothelin-1-induced Ca<sup>2+</sup> influx in rat pulmonary small artery. *European journal of pharmacology*. 2013;720:255-63.
297. Shimoda LA, Sham JS, Shimoda TH and Sylvester JT. L-type Ca<sup>2+</sup> channels, resting [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279:L884-94.
298. Macrez-Lepretre N, Morel JL and Mironneau J. Effects of phospholipase C inhibitors on Ca<sup>2+</sup> channel stimulation and Ca<sup>2+</sup> release from intracellular stores evoked by alpha 1A- and alpha 2A-adrenoceptors in rat portal vein myocytes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;218:30-4.
299. Macmillan D and McCarron JG. The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca<sup>2+</sup> release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> store by inhibiting Ca<sup>2+</sup> pumps in smooth muscle. *British journal of pharmacology*. 2010;160:1295-301.
300. Klein RR, Bourdon DM, Costales CL, Wagner CD, White WL, Williams JD, Hicks SN, Sondak J and Thakker DR. Direct activation of human phospholipase C by its well known inhibitor u73122. *J Biol Chem*. 2011;286:12407-16.
301. Evans AM, Cobban HJ and Nixon GF. ET(A) receptors are the primary mediators of myofilament calcium sensitization induced by ET-1 in rat pulmonary artery smooth muscle: a tyrosine kinase independent pathway. *British journal of pharmacology*. 1999;127:153-60.
302. Zellers TM, McCormick J and Wu Y. Interaction among ET-1, endothelium-derived nitric oxide, and prostacyclin in pulmonary arteries and veins. *The American journal of physiology*. 1994;267:H139-47.
303. D'Orleans-Juste P, Labonte J, Bkaily G, Choufani S, Plante M and Honore JC. Function of the endothelin(B) receptor in cardiovascular physiology and pathophysiology. *Pharmacology & therapeutics*. 2002;95:221-38.
304. Hynynen MM and Khalil RA. The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*. 2006;1:95-108.
305. Ivy DD, McMurtry IF, Colvin K, Imamura M, Oka M, Lee DS, Gebb S and Jones PL. Development of occlusive neointimal lesions in distal pulmonary arteries of endothelin B receptor-deficient rats: a new model of severe pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2005;111:2988-96.
306. Austin ED, Ma L, LeDuc C, Berman Rosenzweig E, Borczuk A, Phillips JA, 3rd, Palomero T, Sumazin P, Kim HR, Talati MH, West J, Loyd JE and Chung WK. Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension. *Circulation Cardiovascular genetics*. 2012;5:336-43.
307. Ma L, Roman-Campos D, Austin ED, Eyries M, Sampson KS, Soubrier F, Germain M, Tregouet DA, Borczuk A, Rosenzweig EB, Girerd B, Montani D, Humbert M, Loyd JE, Kass RS

- and Chung WK. A novel channelopathy in pulmonary arterial hypertension. *The New England journal of medicine*. 2013;369:351-61.
308. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E and Simonneau G. Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2006;173:1023-30.
309. Humbert M. [Pulmonary hypertension in internal medicine.]. *Presse medicale*. 2014.
310. Simonneau G, Gatzoulis MA, Adatia I, Celermajer D, Denton C, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Krishna Kumar R, Landzberg M, Machado RF, Olschewski H, Robbins IM and Souza R. Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D34-41.
311. Austin ED and Loyd JE. Heritable forms of pulmonary arterial hypertension. *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2013;34:568-80.
312. Soubrier F, Chung WK, Machado R, Grunig E, Aldred M, Geraci M, Loyd JE, Elliott CG, Trembath RC, Newman JH and Humbert M. Genetics and genomics of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62:D13-21.
313. Cottin V. [Pulmonary hypertension in chronic respiratory diseases.]. *Presse medicale*. 2014.
314. Seferian A and Simonneau G. [Pulmonary hypertension: Definition, diagnostic and new classification.]. *Presse medicale*. 2014.
315. Ryan JJ and Archer SL. The right ventricle in pulmonary arterial hypertension: disorders of metabolism, angiogenesis and adrenergic signaling in right ventricular failure. *Circulation research*. 2014;115:176-88.
316. Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, Zervopoulos S, Haromy A, Nagendran J and Michelakis ED. A metabolic remodeling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *Journal of molecular medicine*. 2013;91:1315-27.
317. Altin SE and Schulze PC. Metabolism of the right ventricle and the response to hypertrophy and failure. *Progress in cardiovascular diseases*. 2012;55:229-33.
318. Schultze AE and Roth RA. Chronic pulmonary hypertension--the monocrotaline model and involvement of the hemostatic system. *Journal of toxicology and environmental health Part B, Critical reviews*. 1998;1:271-346.
319. Valdivia E, Lalich JJ, Hayashi Y and Sonnad J. Alterations in pulmonary alveoli after a single injection of monocrotaline. *Archives of pathology*. 1967;84:64-76.
320. Morimatsu Y, Sakashita N, Komohara Y, Ohnishi K, Masuda H, Dahan D, Takeya M, Guibert C and Marthan R. Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension. *Journal of vascular research*. 2012;49:33-42.
321. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ and McMurtry IF. Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2009;297:L1013-32.
322. Benoist D, Stones R, Benson AP, Fowler ED, Drinkhill MJ, Hardy ME, Saint DA, Cazorla O, Bernus O and White E. Systems approach to the study of stretch and arrhythmias in right ventricular failure induced in rats by monocrotaline. *Progress in biophysics and molecular biology*. 2014.



323. Maarman G, Lecour S, Butrous G, Thienemann F and Sliwa K. A comprehensive review: the evolution of animal models in pulmonary hypertension research; are we there yet? *Pulmonary circulation*. 2013;3:739-56.
324. Humbert M, Sitbon O, Chaouat A, Bertocchi M, Habib G, Gressin V, Yaici A, Weitzenblum E, Cordier JF, Chabot F, Dromer C, Pison C, Reynaud-Gaubert M, Haloun A, Laurent M, Hachulla E, Cottin V, Degano B, Jais X, Montani D, Souza R and Simonneau G. Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era. *Circulation*. 2010;122:156-63.
325. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP and Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100:9488-93.
326. Lahm T, Tuder RM and Petrache I. Progress in solving the sex hormone paradox in pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2014;307:L7-26.
327. Martin YN and Pabelick CM. Sex differences in the pulmonary circulation: implications for pulmonary hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306:H1253-64.
328. Cohen-Kaminsky S, Hautefort A, Price L, Humbert M and Perros F. Inflammation in pulmonary hypertension: what we know and what we could logically and safely target first. *Drug discovery today*. 2014.
329. Sakao S, Tatsumi K and Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43:629-34.
330. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, Christman BW, Weir EK, Eickelberg O, Voelkel NF and Rabinovitch M. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004;43:13S-24S.
331. Humbert M, Montani D, Perros F, Dorfmüller P, Adnot S and Eddahibi S. Endothelial cell dysfunction and cross talk between endothelium and smooth muscle cells in pulmonary arterial hypertension. *Vascular pharmacology*. 2008;49:113-8.
332. Zhao YY, Zhao YD, Mirza MK, Huang JH, Potula HH, Vogel SM, Brovkovich V, Yuan JX, Wharton J and Malik AB. Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119:2009-18.
333. Wunderlich C, Schmeisser A, Heerwagen C, Ebner B, Schober K, Braun-Dullaeus RC, Schwencke C, Kasper M, Morawietz H and Strasser RH. Chronic NOS inhibition prevents adverse lung remodeling and pulmonary arterial hypertension in caveolin-1 knockout mice. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2008;21:507-15.
334. Perros F, Montani D, Dorfmüller P, Durand-Gasselin I, Tcherakian C, Le Pavec J, Mazmanian M, Fadel E, Mussot S, Mercier O, Herve P, Emilie D, Eddahibi S, Simonneau G, Souza R and Humbert M. Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 2008;178:81-8.
335. Malenfant S, Neyron AS, Paulin R, Potus F, Meloche J, Provencher S and Bonnet S. Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension. *Pulmonary circulation*. 2013;3:278-93.
336. Sellak H, Zhou C, Liu B, Chen H, Lincoln TM and Wu S. Transcriptional regulation of  $\alpha_1H$  T-type calcium channel under hypoxia. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2014.

337. Pluteanu F and Cribbs LL. Regulation and function of Cav3.1 T-type calcium channels in IGF-I-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011;300:C517-25.
338. Rodman DM, Harral J, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Reese KA and Fagan K. The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest*. 2005;128:581S-582S.
339. Zhang S, Dong H, Rubin LJ and Yuan JX. Upregulation of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger contributes to the enhanced Ca<sup>2+</sup> entry in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292:C2297-305.
340. Ogawa A, Firth AL, Smith KA, Maliakal MV and Yuan JX. PDGF enhances store-operated Ca<sup>2+</sup> entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012;302:C405-11.
341. Song MY, Makino A and Yuan JX. STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. *Pulmonary circulation*. 2011;1:84-94.
342. Hadri L, Kratljan RG, Benard L, Maron BA, Dorfmueller P, Ladage D, Guignabert C, Ishikawa K, Aguero J, Ibanez B, Turnbull IC, Kohlbrenner E, Liang L, Zsebo K, Humbert M, Hulot JS, Kawase Y, Hajjar RJ and Leopold JA. Therapeutic efficacy of AAV1.SERCA2a in monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension. *Circulation*. 2013;128:512-23.
343. Li GW, Wang QS, Hao JH, Xing WJ, Guo J, Li HZ, Bai SZ, Li HX, Zhang WH, Yang BF, Yang GD, Wu LY, Wang R and Xu CQ. The functional expression of extracellular calcium-sensing receptor in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *Journal of biomedical science*. 2011;18:16.
344. Hofer AM and Brown EM. Extracellular calcium sensing and signalling. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2003;4:530-8.
345. Shimoda LA, Sham JS, Liu Q and Sylvester JT. Acute and chronic hypoxic pulmonary vasoconstriction: a central role for endothelin-1? *Respiratory physiology & neurobiology*. 2002;132:93-106.
346. Bonnet S, Belus A, Hyvelin JM, Roux E, Marthan R and Savineau JP. Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2001;281:L193-201.
347. Liu CP, Dai ZK, Huang CH, Yeh JL, Wu BN, Wu JR and Chen IJ. Endothelial nitric oxide synthase-enhancing G-protein coupled receptor antagonist inhibits pulmonary artery hypertension by endothelin-1-dependent and endothelin-1-independent pathways in a monocrotaline model. *The Kaohsiung journal of medical sciences*. 2014;30:267-78.
348. Miyauchi T, Yorikane R, Sakai S, Sakurai T, Okada M, Nishikibe M, Yano M, Yamaguchi I, Sugishita Y and Goto K. Contribution of endogenous endothelin-1 to the progression of cardiopulmonary alterations in rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Circulation research*. 1993;73:887-97.
349. Jernigan NL, Walker BR and Resta TC. Endothelium-derived reactive oxygen species and endothelin-1 attenuate NO-dependent pulmonary vasodilation following chronic hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;287:L801-8.
350. Hill NS, Warburton RR, Pietras L and Klinger JR. Nonspecific endothelin-receptor antagonist blunts monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats. *Journal of applied physiology*. 1997;83:1209-15.

351. Sauvageau S, Thorin E, Villeneuve L and Dupuis J. Change in pharmacological effect of endothelin receptor antagonists in rats with pulmonary hypertension: role of ETB-receptor expression levels. *Pulmonary pharmacology & therapeutics*. 2009;22:311-7.
352. Jernigan NL, Walker BR and Resta TC. Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca<sup>2+</sup> sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;295:L515-29.
353. Luke T, Maylor J, Udem C, Sylvester JT and Shimoda LA. Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2012;302:L1128-39.
354. Li KX, Fouty B, McMurtry IF and Rodman DM. Enhanced ET(A)-receptor-mediated inhibition of K(v) channels in hypoxic hypertensive rat pulmonary artery myocytes. *The American journal of physiology*. 1999;277:H363-70.
355. Biasin V, Chwalek K, Wilhelm J, Best J, Marsh LM, Ghanim B, Klepetko W, Fink L, Schermuly RT, Weissmann N, Olschewski A and Kwapiszewska G. Endothelin-1 driven proliferation of pulmonary arterial smooth muscle cells is c-fos dependent. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2014;54C:137-148.
356. Yuan P, Wu WH, Gao L, Zheng ZQ, Liu D, Mei HY, Zhang ZL and Jing ZC. Oestradiol ameliorates monocrotaline pulmonary hypertension via NO, prostacyclin and endothelin-1 pathways. *The European respiratory journal*. 2013;41:1116-25.
357. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL and Shimoda LA. Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca<sup>2+</sup> in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circulation research*. 2006;98:1528-37.
358. Murata T, Lin MI, Huang Y, Yu J, Bauer PM, Giordano FJ and Sessa WC. Reexpression of caveolin-1 in endothelium rescues the vascular, cardiac, and pulmonary defects in global caveolin-1 knockout mice. *The Journal of experimental medicine*. 2007;204:2373-82.
359. Achcar RO, Demura Y, Rai PR, Taraseviciene-Stewart L, Kasper M, Voelkel NF and Cool CD. Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension. *Chest*. 2006;129:696-705.
360. Jasmin JF, Mercier I, Hnasko R, Cheung MW, Tanowitz HB, Dupuis J and Lisanti MP. Lung remodeling and pulmonary hypertension after myocardial infarction: pathogenic role of reduced caveolin expression. *Cardiovasc Res*. 2004;63:747-55.
361. Bauer PM, Bauer EM, Rogers NM, Yao M, Feijoo-Cuaresma M, Pilewski JM, Champion HC, Zuckerbraun BS, Calzada MJ and Isenberg JS. Activated CD47 promotes pulmonary arterial hypertension through targeting caveolin-1. *Cardiovasc Res*. 2012;93:682-93.
362. Huang J, Wolk JH, Gewitz MH and Mathew R. Caveolin-1 expression during the progression of pulmonary hypertension. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237:956-65.
363. Huang J, Kaminski PM, Edwards JG, Yeh A, Wolin MS, Frishman WH, Gewitz MH and Mathew R. Pyrrolidine dithiocarbamate restores endothelial cell membrane integrity and attenuates monocrotaline-induced pulmonary artery hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2008;294:L1250-9.
364. Murata T, Sato K, Hori M, Ozaki H and Karaki H. Decreased endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) activity resulting from abnormal interaction between eNOS and its regulatory proteins in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *J Biol Chem*. 2002;277:44085-92.



365. Fike CD, Aschner JL, Zhang Y and Kaplowitz MR. Impaired NO signaling in small pulmonary arteries of chronically hypoxic newborn piglets. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2004;286:L1244-54.
366. Schach C, Firth AL, Xu M, Remillard CV, Patel HH, Insel PA and Yuan JX. Regulation of pulmonary vasoconstriction by agonists and caveolae. *Experimental lung research*. 2008;34:195-208.
367. Mathew R, Huang J, Katta US, Krishnan U, Sandoval C and Gewitz MH. Immunosuppressant-induced endothelial damage and pulmonary arterial hypertension. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 2011;33:55-8.
368. Kawut SM, Horn EM, Berekashvili KK, Widlitz AC, Rosenzweig EB and Barst RJ. von Willebrand factor independently predicts long-term survival in patients with pulmonary arterial hypertension. *Chest*. 2005;128:2355-62.
369. Mathew R. Cell-specific dual role of caveolin-1 in pulmonary hypertension. *Pulmonary medicine*. 2011;2011:573432.
370. Mathew R. Pathogenesis of pulmonary hypertension: a case for caveolin-1 and cell membrane integrity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014;306:H15-25.
371. D'Alonzo GE, Barst RJ, Ayres SM, Bergofsky EH, Brundage BH, Detre KM, Fishman AP, Goldring RM, Groves BM, Kernis JT and et al. Survival in patients with primary pulmonary hypertension. Results from a national prospective registry. *Annals of internal medicine*. 1991;115:343-9.
372. Savale L, Jais X, Montani D, Sitbon O, Simonneau G and Humbert M. [Treatment of pulmonary arterial hypertension in 2011: what's new since the 2009 ERS/ESC guidelines?]. *Presse medicale*. 2011;40 Suppl 1:1S54-60.
373. O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G and Humbert M. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nature reviews Cardiology*. 2011;8:526-38.
374. Sitbon O, Savale L, Jais X, Montani D, Humbert M and Simonneau G. [Treatment of pulmonary arterial hypertension.]. *Presse medicale*. 2014.
375. Montani D, Chaumais MC, Guignabert C, Gunther S, Girerd B, Jais X, Algalarrondo V, Price LC, Savale L, Sitbon O, Simonneau G and Humbert M. Targeted therapies in pulmonary arterial hypertension. *Pharmacology & therapeutics*. 2014;141:172-91.
376. Hong IS, Coe HV and Catanzaro LM. Macitentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension. *The Annals of pharmacotherapy*. 2014;48:538-47.
377. Kim EJ, Kim DK, Kim SH, Lee KM, Park HS and Kim SH. Alteration of Ryanodine-receptors in Cultured Rat Aortic Smooth Muscle Cells. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2011;15:431-6.
378. Vallot O, Combettes L, Jourdon P, Inamo J, Marty I, Claret M and Lompre AM. Intracellular Ca(2+) handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1225-35.
379. Berra-Romani R, Mazzocco-Spezia A, Pulina MV and Golovina VA. Ca<sup>2+</sup> handling is altered when arterial myocytes progress from a contractile to a proliferative phenotype in culture. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;295:C779-90.
380. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol*. 2008;586:5047-61.
381. Wray S and Burdyga T. Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle. *Physiol Rev*. 2010  
90:113-78.

382. Folgering JH, Sharif-Naeini R, Dedman A, Patel A, Delmas P and Honore E. Molecular basis of the mammalian pressure-sensitive ion channels: focus on vascular mechanotransduction. *Prog Biophys Mol Biol*. 2008;97:180-95.
383. Hill MA, Zou H, Potocnik SJ, Meininger GA and Davis MJ. Invited review: arteriolar smooth muscle mechanotransduction: Ca(2+) signaling pathways underlying myogenic reactivity. *J Appl Physiol*. 2001;91:973-83.
384. Sachs F. Stretch-activated ion channels: what are they? *Physiology (Bethesda)*. 2012;25:50-6.
385. Evans AM. The role of intracellular ion channels in regulating cytoplasmic calcium in pulmonary arterial smooth muscle: which store and where? *Adv Exp Med Biol*. 2010;661:57-76.
386. Ryan J, Bloch K and Archer SL. Rodent models of pulmonary hypertension: harmonisation with the world health organisation's categorisation of human PH. *Int J Clin Pract Suppl*. 2011:15-34.
387. Lifshitz LM, Carmichael JD, Lai FA, Sorrentino V, Bellve K, Fogarty KE and ZhuGe R. Spatial organization of RYRs and BK channels underlying the activation of STOCs by Ca(2+) sparks in airway myocytes. *J Gen Physiol*. 2011;138:195-209.
388. !!! INVALID CITATION !!! 18, 240, 271, 272.
389. Ng LC, Kyle BD, Lennox AR, Shen XM, Hatton WJ and Hume JR. Cell culture alters Ca2+ entry pathways activated by store-depletion or hypoxia in canine pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008;294:C313-23.
390. Bezprozvanny I, Watras J and Ehrlich BE. Bell-shaped calcium-response curves of Ins(1,4,5)P3- and calcium-gated channels from endoplasmic reticulum of cerebellum. *Nature*. 1991;351:751-4.
391. Gomez-Viquez NL, Guerrero-Serna G, Arvizu F, Garcia U and Guerrero-Hernandez A. Inhibition of SERCA pumps induces desynchronized RyR activation in overloaded internal Ca2+ stores in smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010;298:C1038-46.
392. Rossi D, Simeoni I, Micheli M, Bootman M, Lipp P, Allen PD and Sorrentino V. RyR1 and RyR3 isoforms provide distinct intracellular Ca2+ signals in HEK 293 cells. *J Cell Sci*. 2002;115:2497-504.
393. Salomone S, Soydan G, Moskowitz MA and Sims JR. Inhibition of cerebral vasoconstriction by dantrolene and nimodipine. *Neurocritical care*. 2009;10:93-102.
394. Westcott EB, Goodwin EL, Segal SS and Jackson WF. Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles. *The Journal of physiology*. 2012;590:1849-69.
395. Corvazier E, Bredoux R, Kovacs T and Enouf J. Expression of sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+) ATPase (SERCA) 3 proteins in two major conformational states in native human cell membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788:587-99.
396. Ando J and Yamamoto K. Flow detection and calcium signalling in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2013;99:260-8.
397. Darby PJ, Kwan CY and Daniel EE. Caveolae from canine airway smooth muscle contain the necessary components for a role in Ca(2+) handling. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2000;279:L1226-35.
398. Ito S, Kume H, Naruse K, Kondo M, Takeda N, Iwata S, Hasegawa Y and Sokabe M. A novel Ca2+ influx pathway activated by mechanical stretch in human airway smooth muscle cells. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2008;38:407-13.

399. Hernandez JM and Janssen LJ. L-type Ca(2+) channels, Ca(2+)-induced Ca(2+) release, and BK(Ca) channels in airway stretch-induced contraction. *European journal of pharmacology*. 2012;696:161-5.
400. Kim YK, Dirksen ER and Sanderson MJ. Stretch-activated channels in airway epithelial cells. *The American journal of physiology*. 1993;265:C1306-18.
401. Ohbuchi T, Takenaga F, Hohchi N, Wakasugi T, Ueta Y and Suzuki H. Possible contribution of pannexin-1 to ATP release in human upper airway epithelia. *Physiological reports*. 2014;2:e00227.
402. Dulhunty AF, Casarotto MG and Beard NA. The ryanodine receptor: a pivotal Ca<sup>2+</sup> regulatory protein and potential therapeutic drug target. *Current drug targets*. 2011;12:709-23.
403. Inan S and Wei H. The cytoprotective effects of dantrolene: a ryanodine receptor antagonist. *Anesthesia and analgesia*. 2010;111:1400-10.
404. Mackrill JJ. Ryanodine receptor calcium channels and their partners as drug targets. *Biochem Pharmacol*. 2010;79:1535-43.

# ANNEXES



Title: **Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels.**

M. Chevalier<sup>1</sup>, G. Gilbert<sup>1,2</sup>, P. Lory<sup>4</sup>, R. Marthan<sup>1,2,3</sup>, JF Quignard<sup>1,2,\*</sup> J.P. Savineau<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, F-33076 Bordeaux France

<sup>2</sup> INSERM, U 1045, F-33076 Bordeaux France

<sup>3</sup> CHU Bordeaux, F-33000 Bordeaux France

<sup>4</sup> CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle; INSERM, U661; Universités de Montpellier 1 & 2, UMR-5203, F-34000 Montpellier, France

- Author for correspondence: Jean-François Quignard, Université Bordeaux Segalen, INSERM U 1045, 146 rue Leo Saignat, 33076, Bordeaux. France
- Tel +33 5 57 57 95 71
- Email [jean-francois.quignard@u-bordeaux2.fr](mailto:jean-francois.quignard@u-bordeaux2.fr)

Short title: DHEA inhibits T-type Ca<sup>2+</sup> channels

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Number of text pages: 22

Number of figures: 9

Number of references: 44

Number of words in the *Abstract*: 235

Number of words in the *Introduction*: 494

Number of words in the *Discussion*: 1334

Non standard abbreviations:

DHEA: Dehydroepiandrosterone

DHEAS: sulfate of Dehydroepiandrosterone

HP: Holding potential

PASMC, pulmonary artery smooth muscle cell

T-channels : T-type voltage-activated calcium channels (T-channels)



## ABSTRACT

**Background and purpose:** Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form, DHEAS, are the most abundant steroid hormones in the mammalian blood flow. DHEA may have beneficial effects in various pathophysiological conditions such as cardiovascular diseases or deterioration of the sense of well-being. However to date, the cellular mechanism underlying DHEA action remains elusive and may involve ion channel modulation. In this study, we have characterized the effect of DHEA on T-type voltage-activated calcium channels (T-channels), which are involved in several cardiovascular and neuronal diseases.

**Key results:** Using the whole-cell patch-clamp technique, we demonstrate that DHEA inhibits the three recombinant T-channels ( $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  and  $Ca_v3.3$ ) expressed in NG108-15 cell line, as well as native T-channels in pulmonary artery smooth muscle cells. This effect of DHEA is both concentration ( $IC_{50}$  between 2 and 7  $\mu M$ ) and voltage-dependent and results in a significant shift of the steady-state inactivation curves towards hyperpolarized potentials. Consequently, DHEA reduces window T-current and inhibits membrane potential oscillations induced by  $Ca_v3$  channels. DHEA inhibition is not dependent on the activation of nuclear androgen or oestrogen receptors and implicates a PTX-sensitive  $G_i$  protein pathway. Functionally, DHEA and the T-type inhibitor NNC 55-0396 inhibited KCl-induced contraction of pulmonary artery rings and their effect were not cumulative. **Conclusions:** Altogether, the present data demonstrate that DHEA inhibits T-channels by a  $G_i$  protein dependent pathway. DHEA-induced alteration in T-channel activity could thus account for its therapeutic action and/or physiological effects.

**Keywords:** Dehydroepiandrosterone, T-type calcium channels,  $G_i$  protein, Pulmonary artery smooth muscle cell.

## 1) Introduction

Dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated form (DHEAS) are the most abundant steroid hormones in the blood flow [1]. Age-related decline in serum DHEA may be causally related to the development of aging-associated pathophysiological conditions, including cardiovascular diseases, insulin resistance, cancer, depression or deterioration of the sense of well-being [2]. Administration of DHEA(S) in humans shows a beneficial effect on vascular risk markers [3] and significantly improves vascular diseases like pulmonary hypertension in animal models [4]. Furthermore, DHEA exhibits vasorelaxant effect on isolated arteries [5, 6] and modulates neuronal activity, death and survival [7]. Surprisingly, the mechanism of action of DHEA remains elusive despite the extensive literature linking DHEA to the cytosolic/nuclear steroid receptors. By contrast, in neurons, DHEA modulates the release of several neurotransmitters without involvement of nuclear receptor [7]. In endothelial cells, DHEA activates NO synthase via a putative cell surface-initiated, G-protein coupled mechanism [8]. Moreover, DHEA could also modulate cell proliferation / apoptosis via a phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K)/ AKT dependent pathway [9, 10].

Since neural and cardio-vascular functions depend on the activity of ion channels, it has also been suggested that DHEA could interact with ion channels. Indeed, DHEA reduces depolarization-induced intracellular  $\text{Na}^+$  rise in chromaffin cells [11] and increases calcium-activated potassium channel activity in the pulmonary artery [6, 12], leading to a vasodilatation. DHEA effects on calcium flux are yet unraveled. It reduces voltage-gated calcium channel currents in hippocampus neurons [13] or TRPC5 channel activity [14]. Interestingly, the DHEA metabolite, epiandrosterone, inhibits L-type calcium channel currents in cardiac myocytes [15].

It is yet unknown whether T-type calcium channels (T-channels) are modulated by DHEA, although recent studies have demonstrated that these channels are regulated by various pathways [16], including estrogens and steroid hormones [17-20]. T-channels ( $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  and  $\text{Ca}_v3.3$  channels) are low-voltage activated [21]. They are expressed in a large variety of cells, including neurons, cardiac myocytes, endothelial or smooth muscle cells [22], where they contribute to electrical activity and  $\text{Ca}^{2+}$  entry, and, consequently, to numerous physiological functions such as cardiac pacemaker, neuronal firing, hormone secretion,

1 sensory processing or cell proliferation (reviewed in [21]). Specifically in pulmonary artery  
2 smooth muscle cells, T-channels are expressed and participate to vasoreactivity and cell  
3 proliferation, both mechanisms being implicated in pulmonary hypertension [23]. Finally,  
4 since T-channel expression is highly age-dependent and is affected in cardio-vascular and  
5 brain diseases, T-channels could act as targets for DHEA modulation.  
6  
7

8  
9 In this article, we report the first electrophysiological study of the DHEA effect on the  
10 recombinant and native pulmonary vascular T-type  $Ca^{2+}$  channels. We show here that DHEA  
11 inhibits these channels in a concentration-dependent manner and that this inhibition involves  
12 pathway(s) including a modulation of a  $G_i$  protein. Moreover, DHEA and the T-type inhibitor  
13 NNC 55-0396 display functional effect in that they inhibit KCl-induced contraction of  
14 pulmonary artery rings and their effects are not cumulative. Such a study could help to better  
15 understand the therapeutic action and side effects of DHEA in diseases such as pulmonary  
16 hypertension [6].  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

## 2) Material and methods

### 2-1) NG108-15 Cell transfection

The clonal NG108-15 cell line was grown in plastic dish with Dubelcco's modified Eagle's medium supplemented with 7.5 % fetal bovine serum (v/v), 2 mM glutamine, HAT complement, 10000 U/ml penicillin / streptomycin in an humidified environment of 5% CO<sub>2</sub>, 95 % air at 37°C. At confluence, cells were mechanically re-suspended, diluted 3 fold and plated in a new plastic dish.

Four hours after seeding at 60,000 cells/ml, NG108-15 cells were transiently co-transfected with pBK-CMV plasmids encoding the Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 or Ca<sub>v</sub>3.3 subunits [24] and pIRES plasmid construct that codes for the reporter gene CD8 in a ratio of 1/5 with JET-PEI reagent according to the manufacturer recommendations (Polyplus Transfection, France). The plasmid constructs code for the recombinant human Cav3 channels (Cav3.1[25], Cav3.2 [26] and Cav3.3[27]) were described earlier. Twenty-four hours after transfection, CD8-positive cells were identified with anti-CD8 antibody-coated beads (Dyna, France) and further analyzed by voltage-clamp experiments.

### 2-2) Pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) preparation

Dissociated smooth muscle cells from pulmonary arteries (PASMC) were obtained as previously described [28]. Briefly, intrapulmonary arteries of the first and second order from the left rat lung were dissected free from surrounding connective tissues. Endothelium was removed by rubbing the luminal surface. Freshly isolated PASMC were obtained by enzymatic dissociation using first an Hanks solution at 37°C containing 0.5 mg/mL papain and 0.3 mM dithioerythritol, 50 μM CaCl<sub>2</sub> for 15 min, and then containing 0.3 mg/mL collagenase with 50 μM CaCl<sub>2</sub> for 10 min. Cells were seeded on round glass coverslips, stored in culture medium (DMEM) enriched with 10% FCS, and antibiotics maintained at 37°C in a humidified atmosphere gassed with 5% CO<sub>2</sub>, and used between 2 and 48 h after isolation for electrophysiology. Smooth muscle characteristics of isolated cells were confirmed by positive immunostaining with an anti-α smooth muscle actin antibody (data not shown).

### 2-3) Membrane current and potential recordings

1 Voltage-clamp and current-clamp recordings were made with a standard patch-clamp  
2 technique using a Biologic RK300 patch-clamp amplifier (Biologic, France). Whole-cell  
3 recordings were performed with patch pipettes having resistances of 2-5 MΩ. Membrane  
4 potential and current recordings were stored and analyzed using a PC computer (pCLAMP 10  
5 system, Molecular Devices, Foster City, CA). Junction potential was electronically  
6 compensated before acquisition with patch-clamp amplifier. The currents were measured by a  
7 test pulse from -80 mV to -10 mV. Kinetics of inactivation of the current was calculated with  
8 a mono-exponential function according to pCLAMP software. Steady-state inactivation  
9 experiments were performed by a double-pulse protocol. The HP (Holding Potential) was -80  
10 mV, a test-pulse to 0 mV was preceded by a pre-pulse of 5 s duration and of variable  
11 amplitude -100 mV up to 10 mV. Steady-state activation curve was constructed from current-  
12 voltage relationship, which was fitted using a combined Boltzmann and linear Ohmic  
13 relationship as described before [24]. Activation and inactivation curves were fitted with a  
14 Boltzmann equation, which gives the potential for half-activation and half-inactivation.  
15

16 Cells were superfused with an extracellular solution (Ca<sup>2+</sup> solution) containing (mM): 130  
17 NaCl, 5.6 KCl, 1 MgCl<sub>2</sub>, 2 CaCl<sub>2</sub>, 11 glucose, 10 HEPES, tetrodotoxin (TTX) 0.2 μM pH 7.4  
18 with NaOH. In some experiments CaCl<sub>2</sub> was substituted by 2 or 20 mM BaCl<sub>2</sub> as charge  
19 carrier (NaCl reduced to 110 mM in the presence of 20 mM BaCl<sub>2</sub>). To record more  
20 accurately T-type current, the following intracellular solution (Cs<sup>+</sup> solution) was used: (mM):  
21 130 CsCl, 10 EGTA, 5 ATPNa<sub>2</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub> 10 HEPES, pH 7.3 with CsOH. In the current  
22 clamp configuration (to record calcium action potential), a K<sup>+</sup> solution was used and  
23 contained (mM): 5 NaCl, 50 KCl, 65 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 MgCl<sub>2</sub>, 2 ATP, 10 HEPES, pH 7.3 with KOH.  
24 Drugs were applied on the cells *via* pressure ejection from a glass pipette. All experiments  
25 were performed at room temperature. Potassium channels were recorded on PASMC with a  
26 K<sup>+</sup> intracellular solution and a Ca<sup>2+</sup> extracellular solution (HP -30 mV, ramp depolarization up  
27 to + 80 mV).  
28

29 Intracellular calcium concentration was determined with an indo-1 setup [29].  
30

## 31 **2-4) Contraction experiments**

32 Isometric contraction was recorded in rat intrapulmonary denuded arterial rings. Mechanical  
33 properties were assessed using organ bath and transducer systems, coupled to IOX software  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 (EMKA Technologie, France). As determined in preliminary experiments, tissues were set at  
2 optimal length by equilibration against a passive load of 0.8 g. At the outset of each  
3 experiment, K<sup>+</sup>-rich (80 mM) solution, was applied in order to obtain a reference contraction  
4 used to normalize subsequent contractile responses. For each ring, a cumulative  
5 concentration–response curve (CCRC) to KCl (4.7 mM to 60 mM) was constructed in the  
6 absence and in the presence of DHEA or NNC 55-0396. Drugs were added to the external  
7 solution 30 minutes before the beginning of the CCRC to KCl.  
8  
9  
10  
11  
12  
13

## 14 **2-5) Chemicals**

15 BSA-DHEA was purchased from Steraloids (Newport, RI, USA). All other chemicals were  
16 purchased from Sigma (St Louis, MO, USA).  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

## 25 **2-6) Statistics**

26 Values are given as means ± SEM. A student's t-test or anova with post Dunnett test was  
27 performed to estimate the significance of the differences between two mean values. A value  
28 of  $p < 0.05$  was considered significant.  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

### 3) Results

#### 3-1) DHEA inhibition of recombinant T-type Ca<sup>2+</sup> channels.

NG108-15 cells transfected with Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 or Ca<sub>v</sub>3.3 plasmids expressed typical Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 or Ca<sub>v</sub>3.3 currents, respectively (Figure 1), with a slower kinetic of inactivation (inactivation time-constant at -10 mV from a holding potential (HP) at -80 mV:  $94 \pm 15$  ms, n = 25) for the Ca<sub>v</sub>3.3 current, as compared to Ca<sub>v</sub>3.1 ( $14 \pm 4$  ms, n = 25) and Ca<sub>v</sub>3.2 currents ( $16 \pm 4$  ms, n = 25). Application of DHEA (10  $\mu$ M) significantly reduced the current peak amplitude (Figure 1A, C, E). The average peak current inhibition induced by 10  $\mu$ M DHEA was  $36 \pm 5$  %,  $48 \pm 6$  % and  $39 \pm 5$  % for Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 and Ca<sub>v</sub>3.3 currents, respectively (n = 12 - 15 for each experiments). The inhibitory effect of DHEA was observed at every test potential, as shown on the corresponding current-voltage curves for Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, and Ca<sub>v</sub>3.3 currents (Figure 1B, D, F). DHEA inhibition reached its maximum after nearly 60 s and was partially reversible upon washout (Figure 2A). Time-course effect of DHEA was not dependent on the channel opening because similar inhibition was observed after a 2 minute application of DHEA (10  $\mu$ M) in the presence or in the absence of step depolarization (0.1 Hz) (Figure 2B). DHEA increased the inactivation speed for Ca<sub>v</sub>3.3 current (inactivation time-constant:  $93 \pm 12$  ms, n = 15, and  $71 \pm 8$  ms, n = 15, in the absence and in the presence of 10  $\mu$ M DHEA, respectively (Figure 2C). DHEA inhibition was not associated to a non-specific effect of DHEA on membrane as this hormone had no significant effect on endogenous voltage-gated potassium channels of NG108-15 cells. ( $5 \pm 4$  %, n = 7, at +50 mV, data not shown).

#### 3-2) T-type current inhibition by DHEA is concentration- and voltage-dependent

Increasing concentrations of DHEA were then applied to transfected NG108-15 cells. T-current inhibition was concentration-dependent for Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, and Ca<sub>v</sub>3.3 channels (Figure 3). Analysis of the dose-response curves for DHEA revealed IC<sub>50</sub> values of  $7.2 \pm 0.11$   $\mu$ M (n = 7),  $1.7 \pm 0.11$   $\mu$ M (n = 9) and  $6 \pm 0.14$   $\mu$ M (n = 9) for Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2 and Ca<sub>v</sub>3.3 currents, respectively. Hill slope factors were  $0.67 \pm 0.15$ ,  $0.75 \pm 0.18$ , and  $0.9 \pm 0.18$ , for Ca<sub>v</sub>3.1, Ca<sub>v</sub>3.2, and Ca<sub>v</sub>3.3 currents, respectively. DHEA inhibitory effect was significantly stronger for Ca<sub>v</sub>3.2 current than for the other currents.

Next, we investigated whether the effect of DHEA on T-currents is state-dependent. A double-pulse protocol was used to assess whether DHEA affects the voltage dependence of

1 the steady-state inactivation of Ca<sub>v</sub>3 channels (Figure 4). DHEA significantly shifted the  
2 steady-state inactivation curves of Ca<sub>v</sub>3.2 currents toward more hyperpolarized potentials of  
3 12 mV (V<sub>0.5</sub> value, 10 μM DHEA, n = 6, Figure 4B). A smaller although significant shift was  
4 observed in the steady-state inactivation curve for Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.3 (-10 mV and -9 mV,  
5 respectively n = 6) (Figure 4AC). Such an effect on the voltage-dependence of the steady-  
6 state inactivation suggests that DHEA interacts with the inactivated state of the channels. As a  
7 consequence of such steady-state inactivation shift, the inhibition of Ca<sub>v</sub>3.2 currents by 10  
8 μM DHEA should be larger for depolarized resting potential than for more hyperpolarized  
9 one. As expected, 10 μM DHEA-induced inhibition of Ca<sub>v</sub>3.2 current at HP -70 mV (-56 ± 7  
10 %, n = 4) was more pronounced than at HP -100 mV (-34 ± 6 %, n = 4).  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18

19 Analysis of the steady-state activation and inactivation properties of the Ca<sub>v</sub>3.1 or Ca<sub>v</sub>3.3 T-  
20 type Ca<sup>2+</sup> channels in NG108-15 cells revealed that a steady-state Ca<sup>2+</sup> current, referred to as  
21 a ‘window current’, could exist (Figure 5A). Window current correspond to the area  
22 determined by the overlap of steady state inactivation and activation curves. A shift in the  
23 steady-state curve may reduce the window current. T-type Ca<sup>2+</sup> channel window current was  
24 assessed by using a ramp potential from -85 to +10 mV at a slow depolarization speed (- 0.6  
25 mV/s). In Ca<sub>v</sub>3.1-transfected NG108-15 cells, this ramp protocol induced a significant  
26 increase in the intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>; Fig. 5B). This bell-shaped Ca<sup>2+</sup>  
27 response exhibited a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increase in the potential range of the window current which was  
28 significantly reduced in the presence of 10 μM DHEA (-61 ± 8 %, n = 3). We have previously  
29 described that this window current is crucial to generate membrane potential oscillations  
30 (MPOs,[28]). Indeed, shift of steady-state curve to more negative value reduced the window  
31 current and, as expected, 10 μM DHEA inhibited spontaneous MPOs on all Ca<sub>v</sub>3.1  
32 transfected cells tested (Figure 5C, n = 7) or Ca<sub>v</sub>3.3 transfected cells (n = 3, data not shown).  
33 Importantly, DHEA at lower concentration (1 μM) inhibited spontaneous MPOs on 33% of  
34 Ca<sub>v</sub>3.1 transfected cells tested (n = 6)  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48

### 49 **3-3) T-current inhibition by DHEA involves a Gi protein dependent pathway.**

50  
51 Then, we investigated for the signaling pathways underlying the DHEA inhibitory effect on  
52 T-type currents. First, we identified that intracellular calcium ions were not required for this  
53 effect as DHEA by itself did not increase [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> measured with an indo-1 setup (n = 7, 95 ± 7  
54 nM and 93 ± 6 nM in the absence and in the presence of DHEA, data not shown).  
55 Furthermore, in the presence of Ba<sup>2+</sup> (2 mM) as charge carrier (instead of Ca<sup>2+</sup>), 10 μM  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1 DHEA still inhibited  $Ca_v3$  current by  $32 \pm 5 \%$ ,  $45 \pm 4 \%$  and  $35 \pm 4 \%$  for  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$   
2 and  $Ca_v3.3$  currents ( $n = 4$ ), respectively. Second, kinases such as PKA and PKC or PI3K  
3 were not involved as H89 ( $0.5 \mu\text{M}$ , PKA inhibitor), calphostine C ( $0.5 \mu\text{M}$ , PKC inhibitor  
4 activated by UV illumination) or wortmanin ( $0.2 \mu\text{M}$ , PI3K inhibitor) did not reverse DHEA  
5 effect on  $Ca_v3.2$  currents (Figure 6A, C). Similar results were obtained with  $Ca_v3.1$  and  
6  $Ca_v3.2$  channels (data not shown,  $n = 3$  for each experiments). Third, the redox modulation of  
7 T-channels does not modify the DHEA action (Figure 6D) as we found that preincubation of  
8 transfected cells with DTT ( $1 \text{ mM}$ ) left DHEA inhibition unchanged. Yet, as effect of DHEA  
9 could be exerted *via* its conversion to estradiol or testosterone, nuclear androgen or estrogen  
10 receptors antagonists have been tested. Both flutamide ( $20 \mu\text{M}$ ), a nuclear androgen receptor  
11 antagonist, and ICI 182780 ( $1 \mu\text{M}$ ), a nuclear estrogen receptor antagonist did not affect  
12 DHEA inhibition (Figure 6A, D). Although nuclear receptors were not involved in the effect  
13 of DHEA, we checked the effect of the sexual hormones, testosterone and estrogen, on T-  
14 channel current. Experiments were performed on  $Ca_v3.2$  current. Testosterone ( $1 \mu\text{M}$ )  
15 inhibited T-current whereas estradiol had no effect ( $50 \%$  of the cells) or stimulated T-current  
16 (Figure 6B, E).

17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30 Then, we tested whether DHEA may act via a membrane receptor. For this, DHEA ( $50 \mu\text{M}$ )  
31 coupled to BSA (DHEA-BSA) was tested in order to prevent membrane crossing. DHEA-  
32 BSA induced a smaller but significant inhibition of  $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  and  $Ca_v3.3$  currents  
33 (Figure 7A, D). This result suggests that a significant part of DHEA inhibition is dependent  
34 on a plasma membrane pathway. It is however noteworthy that further addition of DHEA (in  
35 the presence of DHEA-BSA) induced a supplemental inhibition of the current (data not  
36 shown,  $n = 2$ ). Finally, we addressed the involvement of a G-protein in the action of DHEA.  
37 Infusion of GDP- $\beta$ -S ( $500 \mu\text{M}$ ) in the cell via the patch-clamp pipette significantly reduced  
38 the inhibitory effect of DHEA (Figure 7B, D) or DHEA-BSA ( $19.5 \pm 4 \%$ ,  $n = 4$ , and  $11.1 \pm 3$   
39  $\%$ ,  $n = 2$ , inhibition of the  $Ca_v3.2$  current, for DHEA and DHEA-BSA, respectively in the  
40 presence of GDP- $\beta$ -S). Overnight incubation of PTX ( $0.5 \mu\text{g/ml}$ ), a  $G_i$  protein inhibitor,  
41 significantly reduced DHEA effect (Figure 7C, D). Finally PTX also strongly reversed  
42 DHEA-BSA inhibitory effect confirming that modulation of  $Ca_v3.2$  channels by DHEA  
43 involved a  $G_i$  protein (Figure 7D).

### 3-4) DHEA inhibition of native smooth muscle cells T-type $Ca^{2+}$ channels.

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

When PASMC were depolarized from a HP of -80 mV to -30 mV, a typical T-type current with a kinetic of inactivation of  $21 \pm 4$  ms ( $n = 6$ ) was observed (Figure 8A). At this negative HP, the major current is a T-type and contamination by L-type current is weak. Indeed, when the HP was -55 mV, this T-type current could not be recorded (data not shown). DHEA concentration-dependently inhibited T-type current amplitude as illustrated in Figure 8B (depolarization at -30 mV). Analysis of the concentration-response curve for DHEA revealed a mean  $IC_{50}$  value of  $8.7 \pm 3$   $\mu$ M ( $n = 3$ ) with a Hill slope factor of  $1.3 \pm 0.3$ . DHEA blockade reached its maximum after nearly 60 s and was partially reversible upon washout (Figure 8C). Finally, DHEA significantly shifted the steady-state inactivation curve of T-type currents toward hyperpolarized potentials (10  $\mu$ M DHEA,  $n = 3$ ). Importantly, DHEA inhibition was not associated to a non-specific effect of DHEA on membrane since it was possible to display an opposite effect on other channels such as calcium-activated potassium channels which were stimulated ( $+ 95 \pm 30$  %,  $n = 6$ , at + 60 mV, data not shown).

### **3-5) DHEA-induced vascular relaxation involves T-type $Ca^{2+}$ channels.**

In a latter set of experiments, we checked the physiological role of T-Type  $Ca^{2+}$  channels in vascular reactivity and the potential interest of DHEA as relaxant drug. The effect of the T-type antagonist NNC55-0396 was so tested on DHEA relaxing effect. In rat pulmonary artery ring, KCl (20-80 mM) induced concentration-dependent contraction that was decreased significantly by DHEA (20  $\mu$ M). DHEA increased the  $EC_{50}$  of KCl without significantly modification of the maximum response. ( $EC_{50} = 19 \pm 2$  mM and  $28 \pm 4$  mM  $p < 0.05$  respectively for KCl and KCl+ DHEA response) (Figure 9). For a unique challenging concentration of KCl (30 mM), DHEA inhibited contraction in a concentration-dependent manner with an  $IC_{50} = 22 \pm 3$   $\mu$ M (data not shown). The T-type antagonist NNC55-0396 used at two different concentrations (0.1 and 0.5  $\mu$ M) also decreased significantly KCL-induced contraction ( $EC_{50} = 31 \pm 5$  and  $40 \pm 6$  mM respectively for KCl concentration response in the presence of 0.1 and 0.5  $\mu$ M NNC55-039) ( Figure 9Aa and 9Ab). Similar results could be obtained with another T-type inhibitor mibefradil at 0.5  $\mu$ M (data not shown). When NNC55-0396 (at both concentrations) was added in the presence of DHEA (20  $\mu$ M) no further inhibitory effect was observed (Figure 9A). It could be noted that DHEA and NCC55-0396 exhibited a greater inhibitory effect for low (20-30 mM) than for high (60-80 mM) KCl concentrations.

#### 4) Discussion

The main finding of the present study is the demonstration that DHEA inhibits the three recombinant  $Ca_v3$  T-type channels expressed in the NG108-15 cell line, as well as native T-type channels in pulmonary artery vascular smooth muscle cells. We have identified that this inhibitory effect of DHEA involves a plasma membrane,  $G_i$  protein pathway in NG108-15 cell line and DHEA inhibits KCl induced contraction in pulmonary artery.

Recombinant  $Ca_v3$  channels are efficiently inhibited by micromolar concentrations of DHEA,  $Ca_v3.2$  being the most sensitive. DHEA also inhibits, in the same concentration range, native T-channels. In several clinical trials with DHEA supplementation, the oral dose range was between 50 and 1000 mg/d, which resulted in serum levels between 10 and 230 nmol/L, whereas sulfate DHEA varies between 10 and 60  $\mu$ mol/l [30]. In rats, an oral DHEA supplementation produced a serum concentration of sulfate DHEA superior to 0.1  $\mu$ M [6]. Therefore it appears that the concentrations of DHEA that block T-type  $Ca^{2+}$  channels in our study are within the same range as those observed after an oral administration of the drug, and suggests that a significant inhibition of T-channels may occur in patients receiving a DHEA treatment.

DHEA acts on other channels in the same or even higher concentration range than that inhibiting T-type channel. In hippocampus neurons, DHEA > 10  $\mu$ M inhibits intracellular calcium increase induced by GABA or KCl [13]. Similar or higher concentrations (100  $\mu$ M) of DHEA are required for stimulating potassium channels in vascular smooth muscle cells [6, 12] or for inhibiting sodium influx in adrenal chromaffin cells [11] or P2X channels in PC12 cells [31]. Taken together, these results indicate that the inhibition of T-type channels is likely to be a pharmacological effect of DHEA.

We previously demonstrated that the inhibitory effect of DHEA on chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in rat, partly involved a redox-dependent activation of  $K^+$  channels in PASMC—and that the application of DTT inhibits DHEA effects [6]. T-channel activity also depends on the redox state notably the  $Ca_v3.2$  isotype [32]. However, in NG108-15 model, DTT did not prevent the DHEA effect on the three T-channel isotypes. Therefore, modulation of redox state by DHEA could not account for the inhibitory effect of DHEA on T-channels. Alternative mechanisms for DHEA effect were thus investigated. Some of the beneficial effect of DHEA could be exerted *via* its conversion to estradiol or testosterone [2]. Conversion into estradiol cannot explain our results since this hormone did not inhibit T-type

1 current (Figure 6B). On the contrary, estradiol slightly increased T-current as previously  
2 observed in neurons [20]. Conversion to testosterone could also be an alternative. However,  
3 the rapid inhibitory effect (within 1 min) of DHEA or DHEA coupled to BSA does not argue  
4 in favor of such biochemical conversion. Furthermore, the cytosolic/nuclear testosterone  
5 receptor is not involved in DHEA effect (neither the estrogen receptor) as assessed by the lack  
6 of effect of the receptor antagonists, flutamide and ICI 182780. Interestingly, we report that  
7 similar to DHEA, testosterone inhibits T-type channels (Figure 6E). Such an effect has been  
8 previously described on A7R5 smooth muscle cell line [19]. It could thus be suggested that  
9 DHEA or testosterone may act via a common pathway independent of nuclear testosterone  
10 receptor.  
11

12 Steroids coupled with BSA have been used extensively to characterize the plasma membrane-  
13 initiated signaling. DHEA-BSA did inhibit T-channels but less than DHEA alone, which  
14 suggests a dependence on membrane signaling pathway. DHEA may act at the membrane by  
15 at least two means. On the one hand, it may insert in the membrane close to the channel or  
16 directly on the channel as complex lipids. Indeed, lipids inhibit  $Ca_v3$  channels in the  
17 micromolar range through a membrane-delimited – possibly direct – interaction [33]. On the  
18 other hand, it could act via a putative membrane receptor. In this connection, there is  
19 emerging evidence that DHEA acts via a membrane receptor; the nature of which is still in  
20 debate [8, 34].  
21

22 Previous studies have shown the modulation of T-type channels by G protein (reviewed in  
23 [35]. For example,  $Ca_v3.2$  channels were specifically inhibited through a cholera toxin  
24 dependent pathway [36] or a  $G\beta_2\gamma_2$ , and  $Ca_v3.3$  could be inhibited through a  $Gaq/\alpha11$   
25 pathway [37]. On the contrary, it is yet unclear whether recombinant or native T-channels are  
26 modulated by  $G_i$  protein. Our study shows that DHEA effect involves activation of a  $G_i$ -  
27 protein pathway, as GDP- $\beta$ S and PTX decreased the inhibitory DHEA on T-type current  
28 (Figure 7). This result is in accordance with other studies showing that PTX-sensitive G  
29 proteins are involved in the effect of DHEA on proliferation and apoptosis of vascular smooth  
30 muscle cells [10] or endothelial proliferation and angiogenesis [38]. To date, there is no  
31 information about a direct modulation of T-channels by  $G_i$  protein. However, in DRG  
32 neurons, activation of  $M_3$  muscarinic receptors inhibits T-type calcium channel currents via  
33 PTX and protein kinase C pathway [39]. Furthermore, T-type channels are modulated by PKC  
34 (as well as PKA) in a variety of mammalian cells [35]. Yet, in our experiments, DHEA was  
35 still effective in presence of PKA and PKC inhibitors. Taken together, these results indicate  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 that DHEA acts at least via a Gi protein, but the mechanism downstream the G protein  
2 remains unclear.  
3

4 DHEA has several effects on vascular smooth muscle cells. We paid special attention to the  
5 pulmonary circulation since we previously showed that DHEA treats pulmonary hypertension  
6 in an animal model. DHEA is a pulmonary vasodilator due, at least in part, to the opening of  
7 potassium channels, especially BK<sub>Ca</sub> channels [6, 12, 40]. Activation of potassium channels  
8 will hyperpolarize cell membrane and then closing voltage-gated calcium channels. However,  
9 our results further indicate that the relaxant effect of DHEA was not only dependent on  
10 activation of potassium channel, but also depended on T-type channel inhibition. Indeed, T-  
11 type channels are expressed in pulmonary arteries [41] and may so participate to the  
12 vasoreactivity. DHEA inhibited T-type current in the quite same concentration range as it  
13 inhibited KCl induced contraction (see figure 3 and 9). As T-type channels are low threshold  
14 voltage-gated channel as compared to L-type, low concentration of KCl may activate mainly  
15 T-channel. In accordance with this idea, we observed that DHEA and NNC55-0396 have a  
16 greater effect on low KCl concentration as compared to high one consistent to the  
17 involvement of T-channels in DHEA effect. Inhibition of recombinant or native T-type Ca<sup>2+</sup>  
18 channels is highly dependent on their inactivation state. Indeed, DHEA shifts by  
19 approximately -10 mV the steady-state inactivation curve for each T-channel isotype.  
20 Therefore, DHEA blockade is more potent at depolarized resting potentials. As resting  
21 potential of smooth muscle cells is weak (around -55 mV), DHEA effect should be even more  
22 important than the one described in this study.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39

40 T-channels inhibition by DHEA could have a pharmacological relevance in other tissues. In  
41 our experiments, DHEA inhibited T-type mediated membrane potential oscillations. In the  
42 voltage range defined by the overlap between activation and inactivation curves, channels  
43 activated but were not completely inactivated leading to a steady-state current (or window  
44 current). This window current is a pacemaker current allowing membrane potential  
45 oscillations (MPOs) [29, 42, 43]. This suggests that DHEA could be an important regulator of  
46 firing activities dependent on T-type Ca<sup>2+</sup> channels in neurons. DHEA may alter neuronal AP  
47 by another way. Ca<sub>v</sub>3.3 channels are mainly expressed in neurons. We previously showed  
48 that slow kinetics of inactivation of Ca<sub>v</sub>3.3 channels favor long lasting AP [43] as in thalamus  
49 [44]. Since DHEA accelerated inactivation kinetics, it should transformed long lasting AP in a  
50 short one which could reduced calcium influx and modify neuronal electrical activity.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1 To sum up, the data presented here points out that DHEA potently inhibits the three T-type  
2  $\text{Ca}^{2+}$  channel isotypes. DHEA preferentially blocks inactivated T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels, which  
3 corresponds to their status in vascular physiological conditions, by a Gi-dependent pathway.  
4 Inhibition of T-type  $\text{Ca}^{2+}$  channels thus represents a novel mechanism by which DHEA is  
5 pharmacologically active and could account for some of the clinical effects observed in  
6 patients who are given DHEA mainly in vascular diseases.  
7  
8  
9

#### 10 11 12 13 14 **Acknowledgments:**

15  
16  
17 This study was funded in part by a grant Preciput (2010) from the "Université Bordeaux  
18 Segalen".  
19

#### 20 21 **Authorship contributions:**

22  
23  
24 *Participated in research design:* Chevalier, Lory, Quignard

25  
26  
27 *Conducted experiments:* Chevalier, Gilbert, Quignard

28  
29  
30 *Contributed new reagents or analytic tools:* Lory

31  
32  
33 *Performed data analysis:* Quignard, Chevalier

34  
35  
36 *Wrote or contributing to the writing of the manuscript:* Quignard, Lory, Marthan, Savineau

#### 37 38 **5) Figures**

39  
40  
41 Figure 1: DHEA inhibits cloned  $\text{Ca}_v3$   $\text{Ca}^{2+}$  channels. A, C, E) effect of 10  $\mu\text{M}$  DHEA (closed  
42 symbols) on  $\text{Ca}^{2+}$  currents (open symbols) elicited by a -10 mV test pulse obtained for  $\text{Ca}_v3.1$   
43 currents (A, squares),  $\text{Ca}_v3.2$  currents (B, circles) and  $\text{Ca}_v3.3$  currents (C, triangles). The  
44 holding potential (HP) was -80 mV. B, D, F) effect of 10  $\mu\text{M}$  DHEA on current-voltage  
45 curves obtained for  $\text{Ca}_v3.1$  currents (A, squares; n = 7),  $\text{Ca}_v3.2$  currents (B, circles; n = 6)  
46 and for  $\text{Ca}_v3.3$  currents (C, triangles; n = 6). The holding potential was -80 mV. Maximum  
47 current amplitude of control currents (before application of DHEA) were normalized to 1.  
48 Open symbols: control condition, closed symbols: in the presence of DHEA.  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

Figure 2: DHEA inhibited rapidly T-type/Ca<sub>v</sub>3 Ca<sup>2+</sup> channels. A) Time course and inhibitory effects of two consecutive application of 10 μM DHEA on Ca<sub>v</sub>3.2 T-type currents (HP: -80 mV, step depolarization -10 mV every 10 s, n = 8). B) Absence of use-dependence effect of DHEA. The % of DHEA inhibition did not depend on the activity of the Ca<sub>v</sub>3.2 channel (HP: -80 mV, step depolarization -10 mV every 10 s with a stop during 2 minutes, n = 4). C) Effect of 10 μM DHEA on the inactivation kinetics of Ca<sub>v</sub>3 Ca<sup>2+</sup> channels. DHEA accelerated significantly the inactivation rate of Ca<sub>v</sub>3.3 current as shown in the inset (inset: Ca<sub>v</sub>3.3 current in the presence (dashed line) or absence of DHEA, current amplitude was normalized to highlight the acceleration of inactivation kinetics). Currents inactivation was fitted with a mono exponential function (n = 10-15 for each experiments).

Figure 3: Concentration-dependent inhibition of Ca<sub>v</sub>3 currents by DHEA. Concentration-response curves for DHEA inhibition of Ca<sub>v</sub>3.1 (▪, n = 9), Ca<sub>v</sub>3.2 (•, n = 7), and Ca<sub>v</sub>3.3 (▲, n = 9) currents. Concentration-response curves were established by fitting the normalized currents with a sigmoid Hill equation. % of inhibition is calculated from current recorded in the same condition as in figure 1.

Figure 4: Voltage dependence inhibition of Ca<sub>v</sub>3 currents by DHEA. Normalized steady-state inactivation curves for the Ca<sub>v</sub>3.1 (n = 5), Ca<sub>v</sub> 3.2 (n = 6), Ca<sub>v</sub> 3.3 (n = 5) subunit in the presence (closed symbols) and in the absence (open symbols) of 10 μM DHEA. The steady-state inactivation was estimated from the variation of the current amplitude at -10 mV after a 5-s predepolarization of increasing amplitude (-100 to -20 mV with 10-mV increments). C insert: typical traces showing the effect of 10 μM DHEA on the steady-state inactivation of the Ca<sub>v</sub>3.2 subunit.

Figure 5: DHEA reduced Ca<sub>v</sub>3.1 window current and inhibited Ca<sub>v</sub>3.1 mediated membrane potentials oscillations (MPO). A) Normalized activation curve and steady-state inactivation curve of Ca<sub>v</sub>3.1 channel in the presence (dashed line) or absence of 10 μM DHEA (solid line) which show window current potential range under the intersection of the two curves (n = 5). The scale was expended to highlight the potential range of the window current. The activation curve was constructed from current–voltage relationship as in figure 2. Overlaps between

1 activation and inactivation curves (window current) in the presence of DHEA (10  $\mu\text{M}$ ) were  
2 reduced as compared to control condition. B) Long-lasting variation of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$   
3 concentration in response to very slow ramp depolarization from  $-85$  to  $10$  mV at a slow  
4 depolarization speed ( $0.6$  mV/s) on  $\text{Ca}_v3.1$ -transfected cells (a,b) and nontransfected cells (c).  
5 This protocol allows visualization of the calcium window current only on transfected cells,  
6 that was reduced in the presence of DHEA ( $10$   $\mu\text{M}$ ) (b). Experiments performed in voltage-  
7 clamp on NG108-15 cells loaded with indo-1. C) DHEA inhibits typical MPOs.  
8 Measurements were made in the current-clamp mode. In B and C: external Ca solution and  
9 intrapipette solution with KCl solution instead of CsCl one were used.  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16

17 Figure 6: T-current inhibition by DHEA did not involved classical kinase or sexual nuclear  
18 receptors. A) Typical inhibitory effect of  $10$   $\mu\text{M}$  DHEA on  $\text{Ca}_v3.2$  transfected NG108-15  
19 cells pre-incubated with H89 or flutamide (open symbol before application of DHEA, closed  
20 symbol, in the presence of  $10$   $\mu\text{M}$  DHEA). B) Typical stimulatory effect of  $1$   $\mu\text{M}$  estradiol on  
21  $\text{Ca}_v3.2$  current (open symbol before application of estradiol, closed symbol, in the presence of  
22 estradiol). C) Summary bar graph showing that DHEA effect was not altered by preincubation  
23 of  $\text{Ca}_v3.2$  transfected NG108-15 cells with H89 ( $0.5$   $\mu\text{M}$ , PKA inhibitor), calphostine C ( $0.5$   
24  $\mu\text{M}$ , PKC inhibitor) or wortmanin ( $0.2$   $\mu\text{M}$ , PI3K inhibitor) ( $n = 4$  for each experiments). D)  
25 Preincubation of  $\text{Ca}_v3.1$ ,  $\text{Ca}_v3.2$  or  $\text{Ca}_v3.3$  transfected NG108-15 with DTT ( $1$  mM, a  
26 reducing agent), flutamide (Flut,  $20$   $\mu\text{M}$ , testosterone receptor antagonist), ICI 182780 (ICI,  $1$   
27  $\mu\text{M}$ , estrogen receptor antagonist) did not altered DHEA effect ( $n = 4 - 6$  for each  
28 experiments). E) Summary bar graph showing the testosterone ( $n = 4$ ) or estradiol ( $n = 7$ , only  
29 cells with a response) effect on  $\text{Ca}_v3.2$  transfected NG108-15 cells.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44

45 Figure 7: T-current inhibition by DHEA involved a Gi protein dependant pathway. A) Typical  
46 trace of  $\text{Ca}_v3.2$  current in the presence (closed symbols) or absence (open symbols) of  
47 DHEA-BSA ( $50$   $\mu\text{M}$ ); B and C) Typical weak inhibitory effect of  $10$   $\mu\text{M}$  DHEA on  $\text{Ca}_v3.1$  or  
48  $\text{Ca}_v3.3$  currents pre-incubated with GDP  $\beta$  S or PTX (open symbol before application of  
49 DHEA, closed symbol, in the presence of DHEA). D) DHEA coupled to BSA (DHEA-BSA)  
50 induced a significant inhibition of the 3 cloned channels ( $n = 4$  for each experiments) whereas  
51 BSA alone induced a smaller alteration of the current. The effects of DHEA were  
52 significantly reduced by preincubation of the cells with PTX ( $0.5$   $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or GDP- $\beta$ -S ( $500$   
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



1  
2  $\mu\text{M}$ ) ( $n = 4$  for each experiments). PTX were preincubated over night. GDP- $\beta$ -S were infused  
3 into the cells via the patch-clamp pipette 5 minutes before current recording.

4  
5 Figure 8: DHEA inhibited T-type currents in PASMC. A) Typical trace of T-type current in  
6 the presence or absence of 10  $\mu\text{M}$  DHEA. Current were recorded in the presence of 20 mM  
7  $\text{Ba}^{2+}$  instead of 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  as charge carrier and in the presence of 0.1  $\mu\text{M}$  isradipine to  
8 inhibited L-type calcium (step depolarization from -80 mV to -35 mV). B) Dose-response  
9 curves for DHEA inhibition of vascular T-type current ( $n = 3$  for each experiments).  
10 Concentration-response curves were established by fitting the normalized currents with a  
11 sigmoidal Hill equation. C) Time course and inhibitory effects of two consecutive application  
12 of 10  $\mu\text{M}$  DHEA on T-type currents. D Normalized steady-state inactivation curves for the T-  
13 type current in the presence (closed symbols) and in the absence (open symbols) of 10  $\mu\text{M}$   
14 DHEA ( $n = 3$ ). The steady-state inactivation was estimated from the variation of the current  
15 amplitude at -30 mV after a 5-s predepolarization of increasing amplitude (-100 to -20 mV  
16 with 10-mV increments).

17  
18  
19 Figure 9: DHEA inhibition of KCl-induced contraction involved T-type currents in pulmonary  
20 arteries. A) Effect of DHEA ( $\mu\text{M}$ ), NNC55-0396 (0.1 $\mu\text{M}$  in Aa and 0.5 $\mu\text{M}$  in Ab) and  
21 addition of DHEA plus NNC55-0396 on a KCl CCRC. Note that addition of DHEA to  
22 NNC55-0396 did not increase NNC55-0396 effect. Experiments performed on rat  
23 intrapulmonary artery rings ( $n=5$ ). Values are normalized to an 80 mM KCl contraction  
24 experiments conducted before addition of DHEA or NNC55-0396.  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65

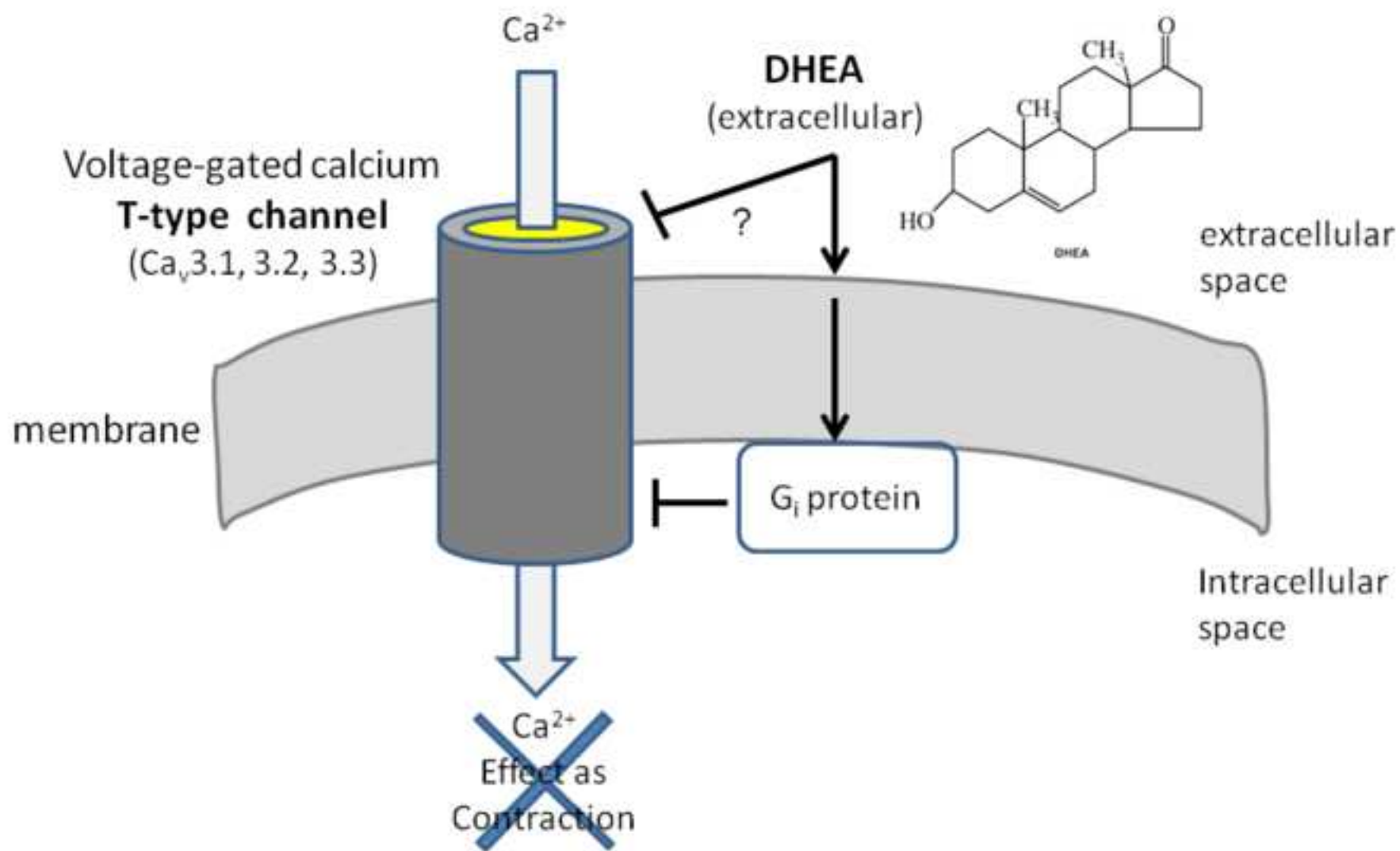
## 6) References

- 1
- 2
- 3
- 4
- 5 [1] Miller WL. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:7-14.
- 6
- 7 [2] Baulieu EE. Androgens and aging men. *Mol Cell Endocrinol* 2002;198:41-9.
- 8 [3] Lasco A, Frisina N, Morabito N, Gaudio A, Morini E, Trifiletti A, et al. Metabolic effects of dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 2001;145:457-61.
- 9
- 10
- 11
- 12 [4] Dumas de la Roque E, Savineau JP, Bonnet S. Dehydroepiandrosterone: A new treatment for vascular remodeling diseases including pulmonary arterial hypertension. *Pharmacol Ther* 126:186-99.
- 13
- 14
- 15 [5] Barbagallo M, Shan J, Pang PK, Resnick LM. Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular calcium responsiveness and vascular contractility. *Hypertension* 1995;26:1065-9.
- 16 [6] Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, et al. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:9488-93.
- 17 [7] Perez-Neri I, Montes S, Ojeda-Lopez C, Ramirez-Bermudez J, Rios C. Modulation of neurotransmitter systems by dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfate: mechanism of action and relevance to psychiatric disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2008;32:1118-30.
- 18 [8] Liu D, Dillon JS. Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids* 2004;69:279-89.
- 19 [9] Liu D, Iruthayanathan M, Homan LL, Wang Y, Yang L, Wang Y, et al. Dehydroepiandrosterone stimulates endothelial proliferation and angiogenesis through extracellular signal-regulated kinase 1/2-mediated mechanisms. *Endocrinology* 2008;149:889-98.
- 20 [10] Bonnet S, Paulin R, Sutendra G, Dromparis P, Roy M, Watson KO, et al. Dehydroepiandrosterone reverses systemic vascular remodeling through the inhibition of the Akt/GSK3- $\beta$ /NFAT axis. *Circulation* 2009;120:1231-40.
- 21 [11] Liu PS, Lin MK, Hsieh HL. Dehydroepiandrosterone sulfate inhibition of catecholamine secretion from bovine adrenal chromaffin cells. *Neurosci Lett* 1996;204:181-4.
- 22 [12] Farrukh IS, Peng W, Orlinska U, Hoidal JR. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup>-channel opener. *Am J Physiol* 1998;274:L186-95.
- 23 [13] French-Mullen JM, Spence KT. Neurosteroids block Ca<sup>2+</sup> channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur J Pharmacol* 1991;202:269-72.
- 24 [14] Majeed Y, Amer MS, Agarwal AK, McKeown L, Porter KE, O'Regan DJ, et al. Stereo-selective inhibition of transient receptor potential TRPC5 cation channels by neuroactive steroids. *Br J Pharmacol* 162:1509-20.
- 25 [15] Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M, Ochi R. Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J Mol Cell Cardiol* 2002;34:679-88.
- 26 [16] Iftinca MC, Zamponi GW. Regulation of neuronal T-type calcium channels. *Trends Pharmacol Sci* 2009;30:32-40.
- 27 [17] Jevtovic-Todorovic V, Covey DF, Todorovic SM. Are neuroactive steroids promising therapeutic agents in the management of acute and chronic pain? *Psychoneuroendocrinology* 2009;34 Suppl 1:S178-85.
- 28 [18] Ronnekleiv OK, Bosch MA, Zhang C. Regulation of endogenous conductances in GnRH neurons by estrogens. *Brain Res* 1364:25-34.
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60
- 61
- 62
- 63
- 64
- 65

- 1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65
- [19] Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca(2+) channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:503-6.
  - [20] Zhang C, Bosch MA, Rick EA, Kelly MJ, Ronnekleiv OK. 17Beta-estradiol regulation of T-type calcium channels in gonadotropin-releasing hormone neurons. *J Neurosci* 2009;29:10552-62.
  - [21] Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;83:117-61.
  - [22] Perez-Reyes E, Lory P. Molecular biology of T-type calcium channels. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2006;5:605-9.
  - [23] Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, et al. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res* 2005;96:864-72.
  - [24] Chemin J, Monteil A, Bourinet E, Nargeot J, Lory P. Alternatively spliced alpha(1G) (Ca(V)3.1) intracellular loops promote specific T-type Ca(2+) channel gating properties. *Biophys J* 2001;80:1238-50.
  - [25] Monteil A, Chemin J, Bourinet E, Mennessier G, Lory P, Nargeot J. Molecular and functional properties of the human alpha(1G) subunit that forms T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2000;275:6090-100.
  - [26] Cribbs LL, Lee JH, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, et al. Cloning and characterization of alpha1H from human heart, a member of the T-type Ca2+ channel gene family. *Circ Res* 1998;83:103-9.
  - [27] Monteil A, Chemin J, Leuranguer V, Altier C, Mennessier G, Bourinet E, et al. Specific properties of T-type calcium channels generated by the human alpha 1I subunit. *J Biol Chem* 2000;275:16530-5.
  - [28] Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP. Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 48:251-9.
  - [29] Chevalier M, Mironneau C, Macrez N, Quignard JF. Intracellular Ca(2+) oscillations induced by over-expressed Ca(V)3.1 T-type Ca(2+) channels in NG108-15 cells. *Cell Calcium* 2008;44:592-603.
  - [30] Tummala S, Svec F. Correlation between the administered dose of DHEA and serum levels of DHEA and DHEA-S in human volunteers: analysis of published data. *Clin Biochem* 1999;32:355-61.
  - [31] Liu PS, Hsieh HL, Lin CM. Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) suppresses P2X purinoceptor-coupled responses in PC12 cells. *Neurochem Int* 2001;39:193-8.
  - [32] Joksovic PM, Nelson MT, Jevtovic-Todorovic V, Patel MK, Perez-Reyes E, Campbell KP, et al. CaV3.2 is the major molecular substrate for redox regulation of T-type Ca2+ channels in the rat and mouse thalamus. *J Physiol* 2006;574:415-30.
  - [33] Chemin J, Nargeot J, Lory P. Chemical determinants involved in anandamide-induced inhibition of T-type calcium channels. *J Biol Chem* 2007;282:2314-23.
  - [34] Webb SJ, Geoghegan TE, Prough RA, Michael Miller KK. The biological actions of dehydroepiandrosterone involves multiple receptors. *Drug Metab Rev* 2006;38:89-116.
  - [35] Huc S, Monteil A, Bidaud I, Barbara G, Chemin J, Lory P. Regulation of T-type calcium channels: signalling pathways and functional implications. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:947-52.
  - [36] Tao J, Hildebrand ME, Liao P, Liang MC, Tan G, Li S, et al. Activation of corticotropin-releasing factor receptor 1 selectively inhibits CaV3.2 T-type calcium channels. *Mol Pharmacol* 2008;73:1596-609.
  - [37] Hildebrand ME, David LS, Hamid J, Mulatz K, Garcia E, Zamponi GW, et al. Selective inhibition of Cav3.3 T-type calcium channels by Galphaq/11-coupled muscarinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem* 2007;282:21043-55.
  - [38] Williams MR, Dawood T, Ling S, Dai A, Lew R, Myles K, et al. Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by

mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4708-15.

- 1  
2 [39] Zhang Y, Zhang L, Wang F, Zhang Y, Wang J, Qin Z, et al. Activation of M3 muscarinic  
3 receptors inhibits T-type Ca(2+) channel currents via pertussis toxin-sensitive novel protein  
4 kinase C pathway in small dorsal root ganglion neurons. *Cell Signal* 23:1057-67.  
5 [40] Gupte SA, Li KX, Okada T, Sato K, Oka M. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause  
6 vasodilation: involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther*  
7 2002;301:299-305.  
8 [41] Pluteanu F, Cribbs LL. Regulation and function of Cav3.1 T-type calcium channels in IGF-I-  
9 stimulated pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 300:C517-25.  
10 [42] Crunelli V, Cope DW, Hughes SW. Thalamic T-type Ca<sup>2+</sup> channels and NREM sleep. *Cell*  
11 *Calcium* 2006;40:175-90.  
12 [43] Chevalier M, Lory P, Mironneau C, Macrez N, Quignard JF. T-type CaV3.3 calcium channels  
13 produce spontaneous low-threshold action potentials and intracellular calcium oscillations.  
14 *Eur J Neurosci* 2006;23:2321-9.  
15 [44] Destexhe A, Sejnowski TJ. The initiation of bursts in thalamic neurons and the cortical control  
16 of thalamic sensitivity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2002;357:1649-57.  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65



Extracellular DHEA inhibits T-channels by a G<sub>i</sub> protein dependent pathway. This effect account for DHEA inhibition of pulmonary artery contraction and thus account for its therapeutic action and/or physiological effects

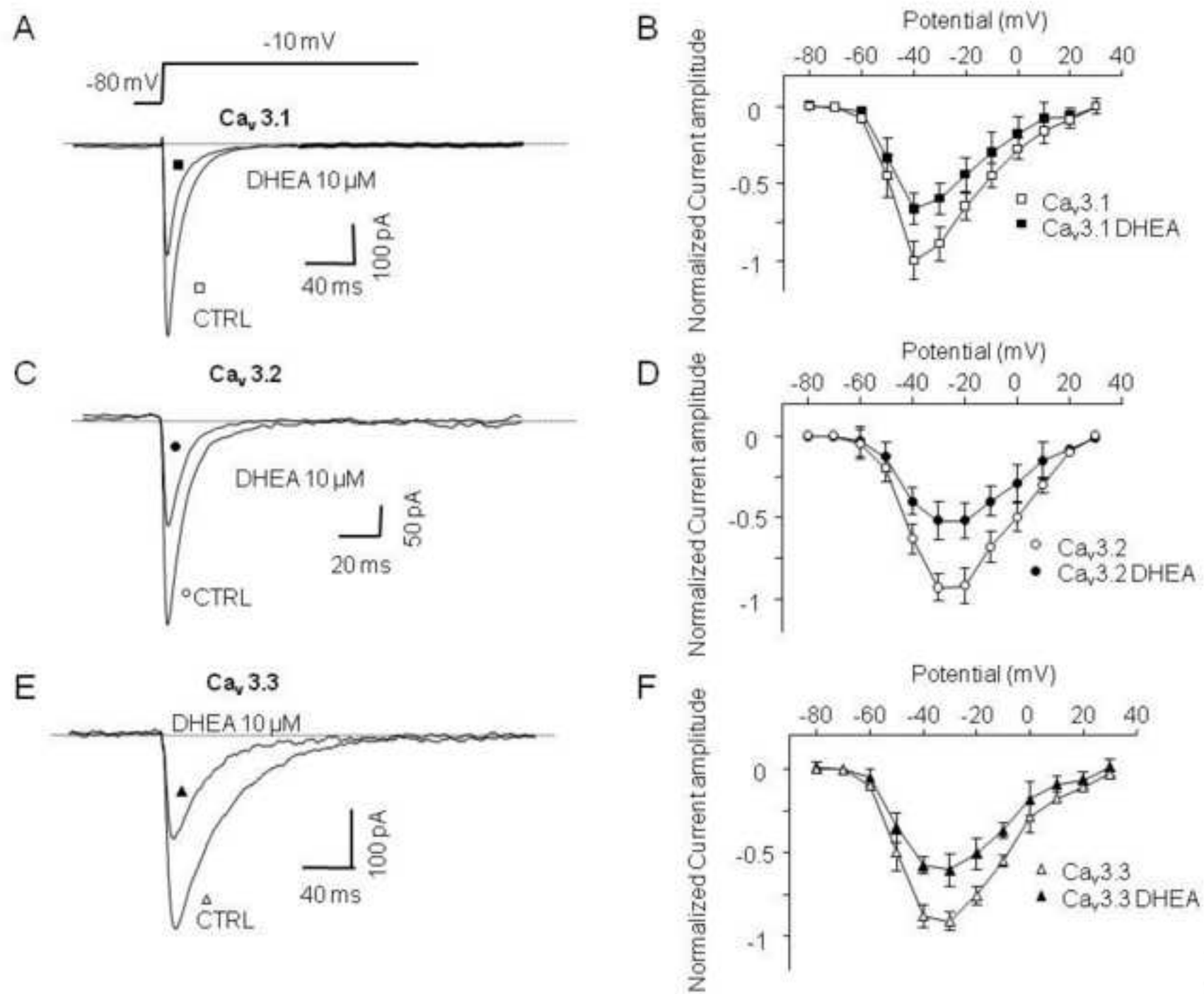
**Figure1**[Click here to download high resolution image](#)**Fig 1**

Figure 2

[Click here to download high resolution image](#)

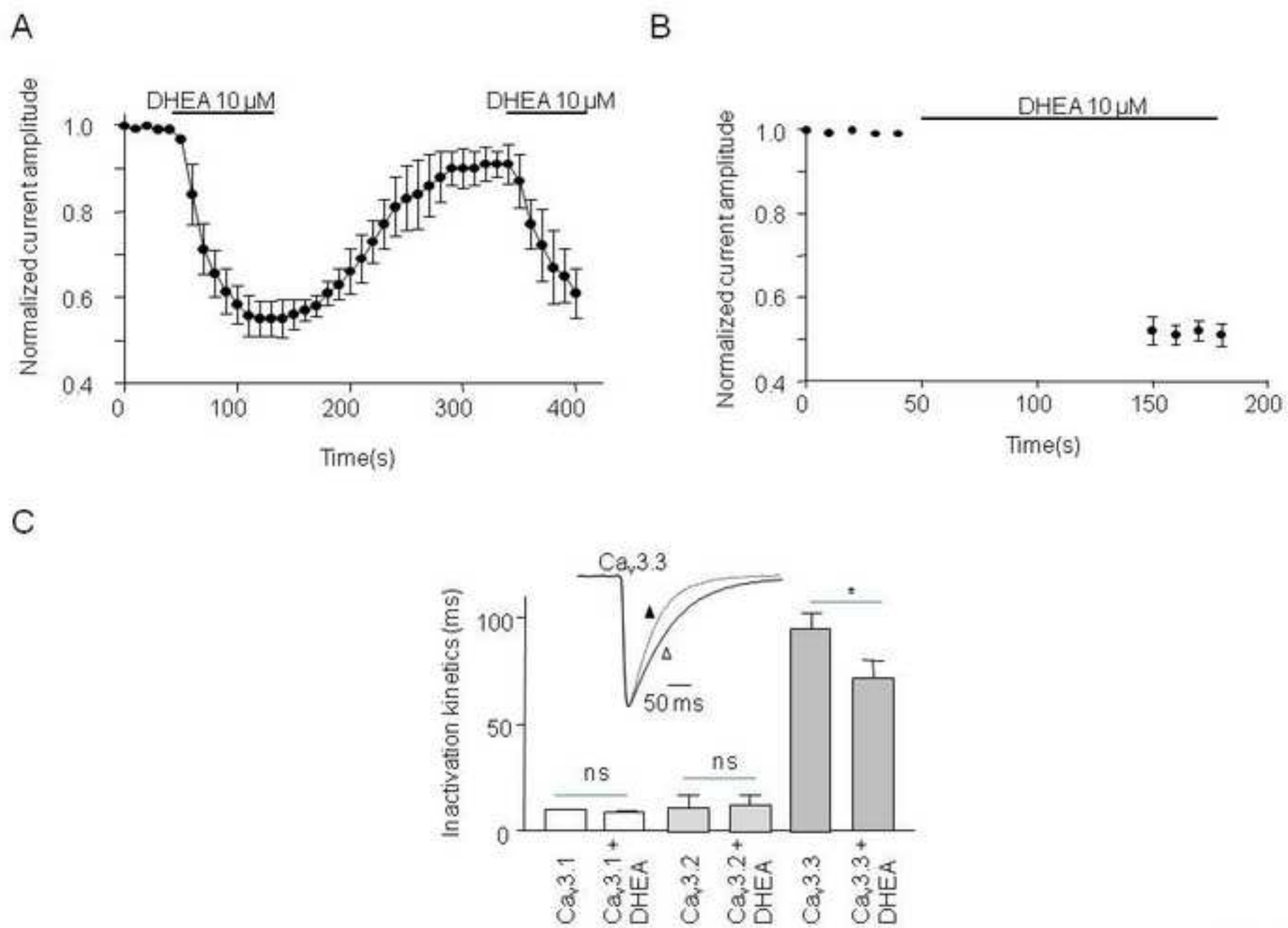


Fig 2

Figure3

[Click here to download high resolution image](#)

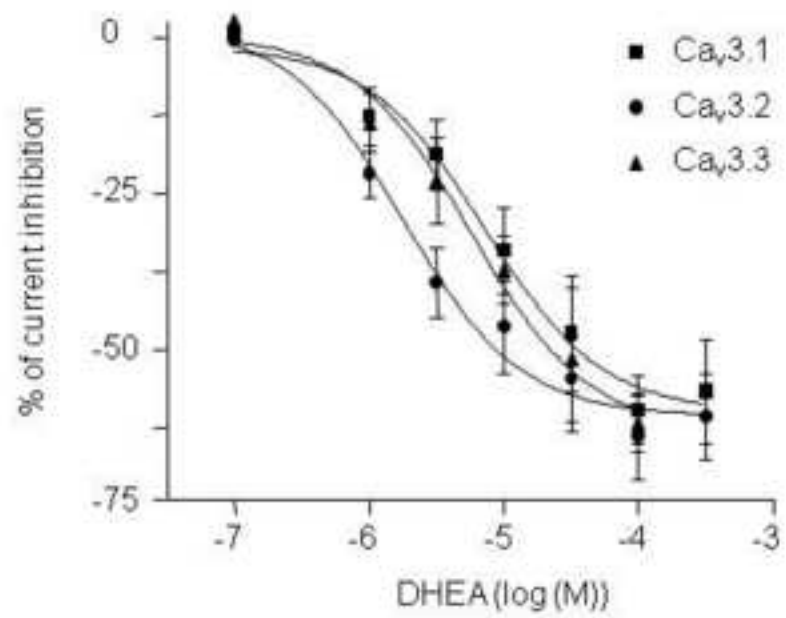


Fig 3



Figure 4

[Click here to download high resolution image](#)

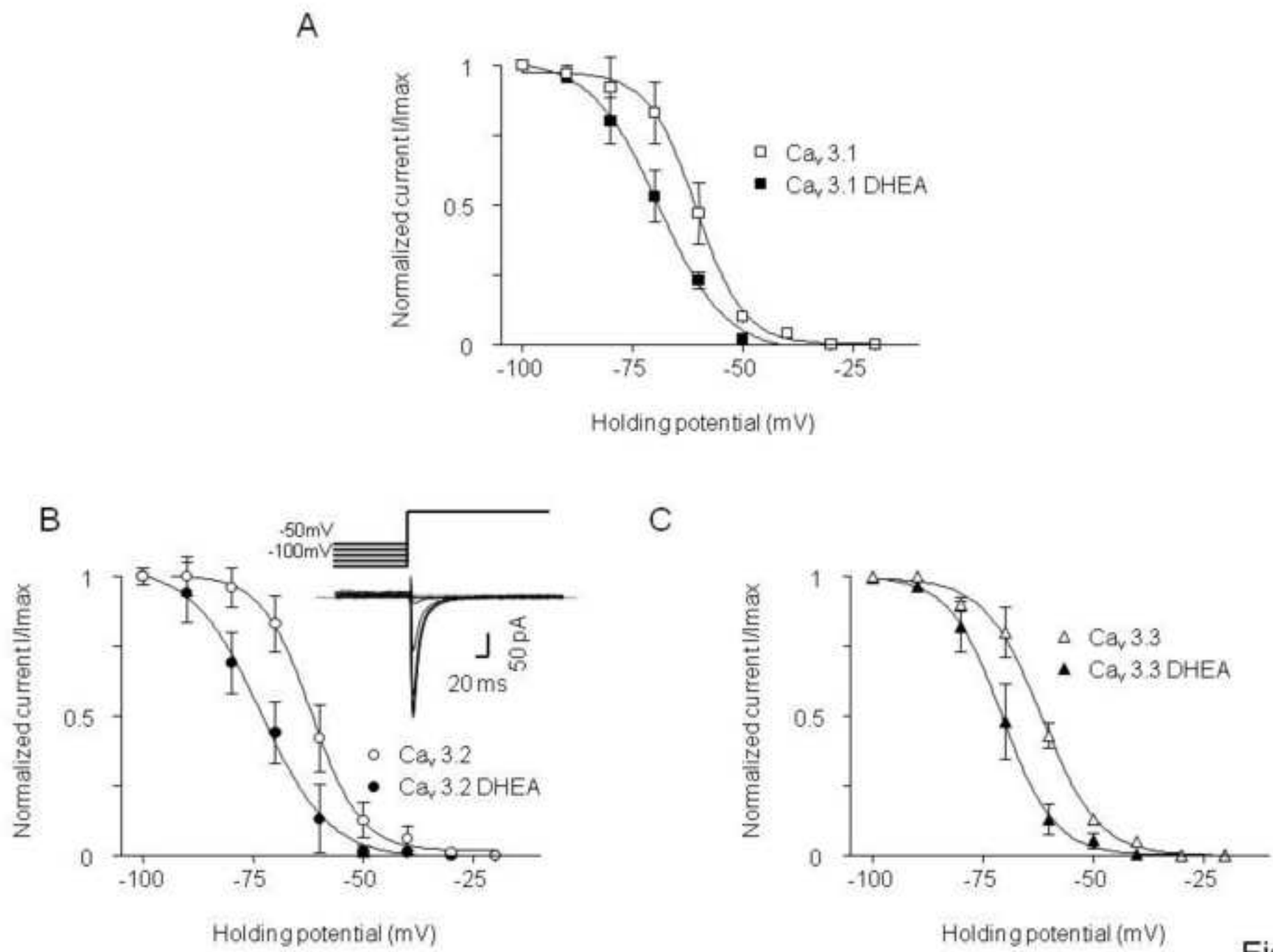


Fig 4

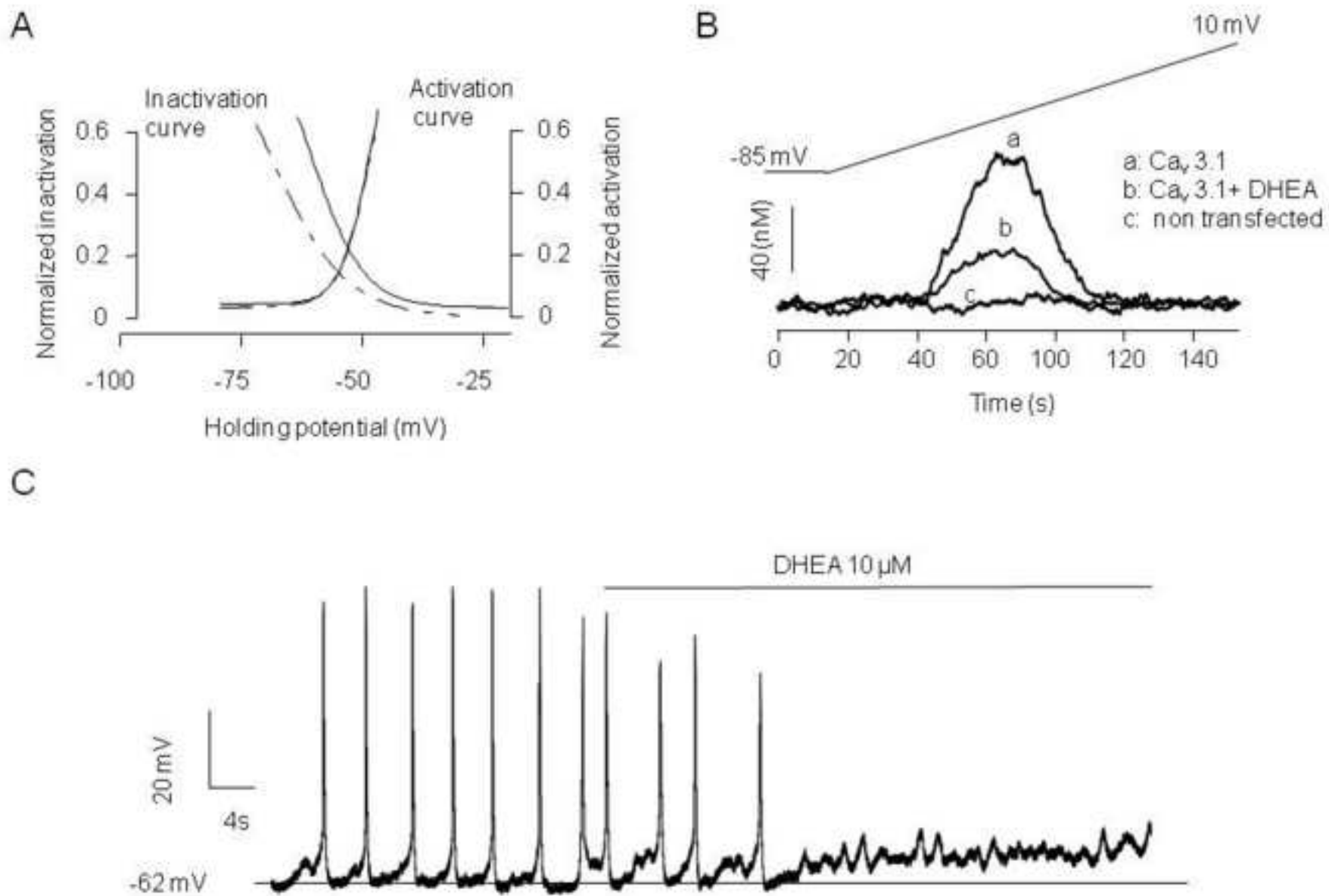
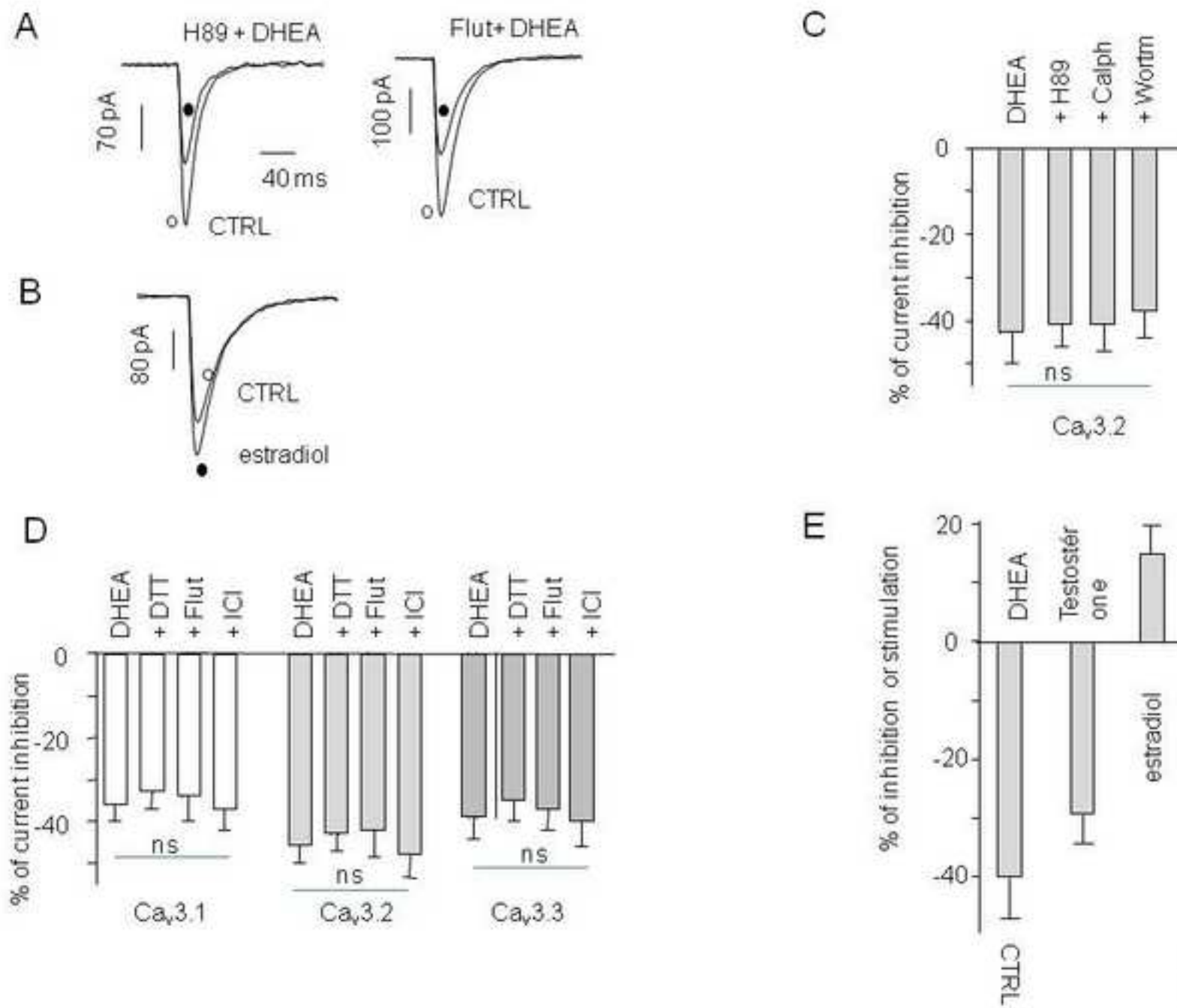


Fig 5

**Figure6**  
[Click here to download high resolution image](#)



**Fig 6**

Figure7

[Click here to download high resolution image](#)

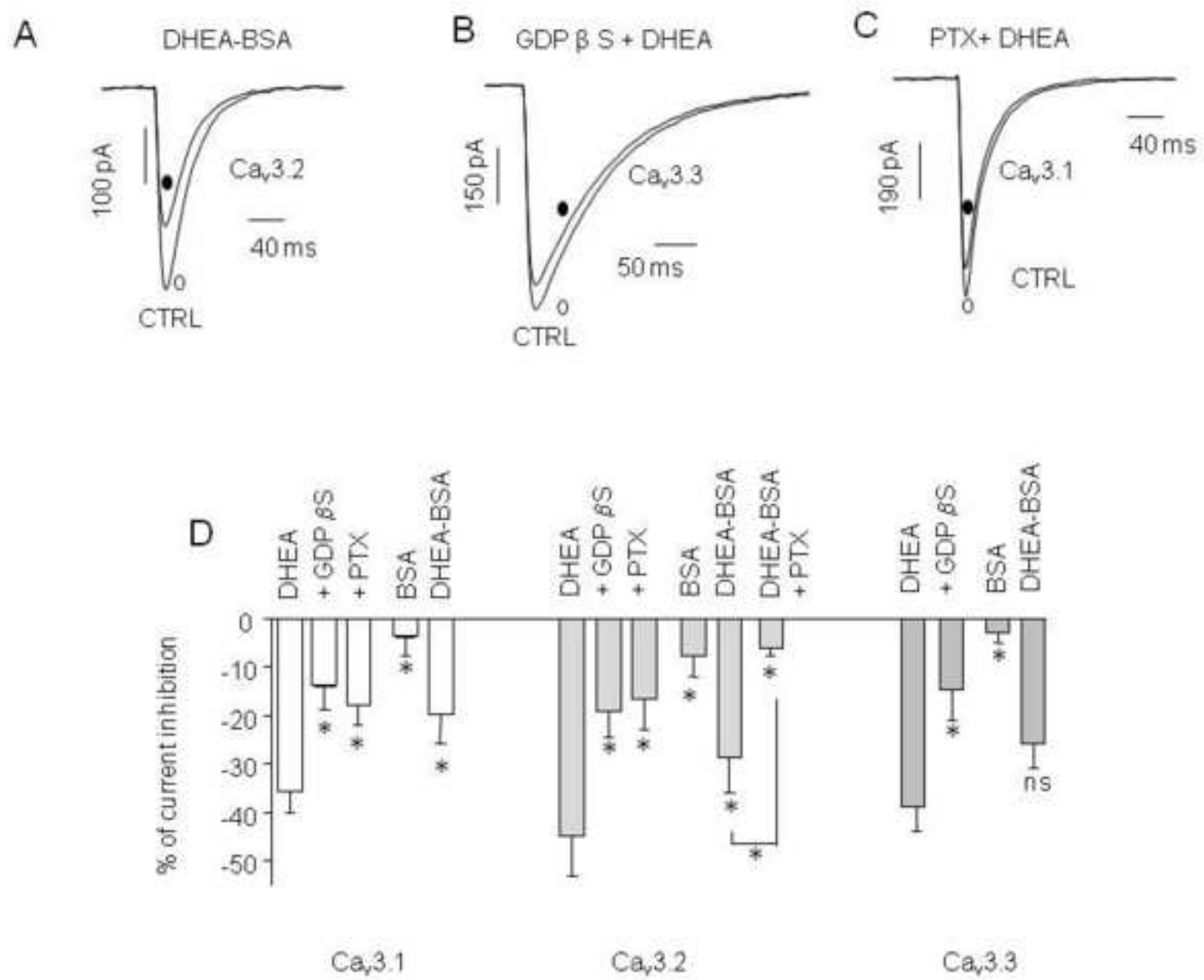


Fig 7

Figure 8

[Click here to download high resolution image](#)

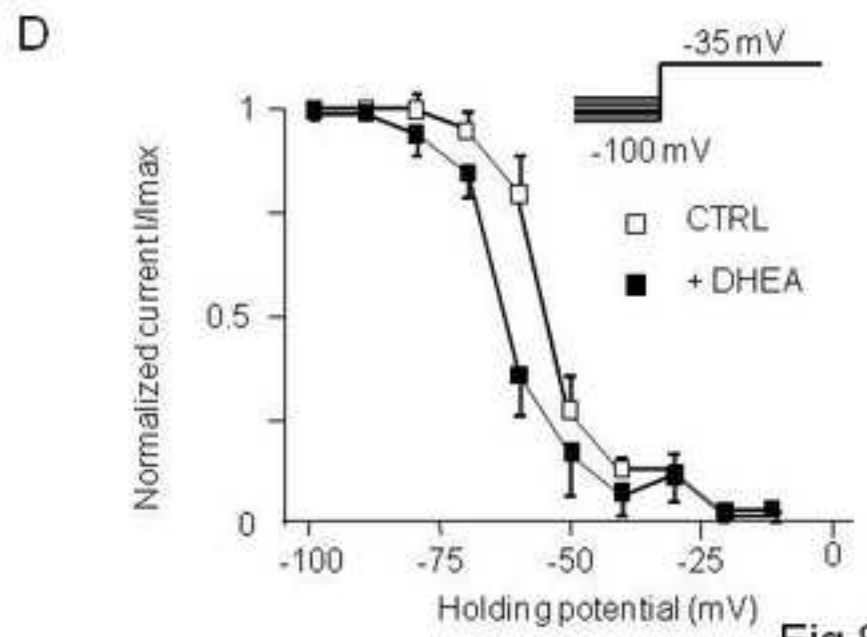
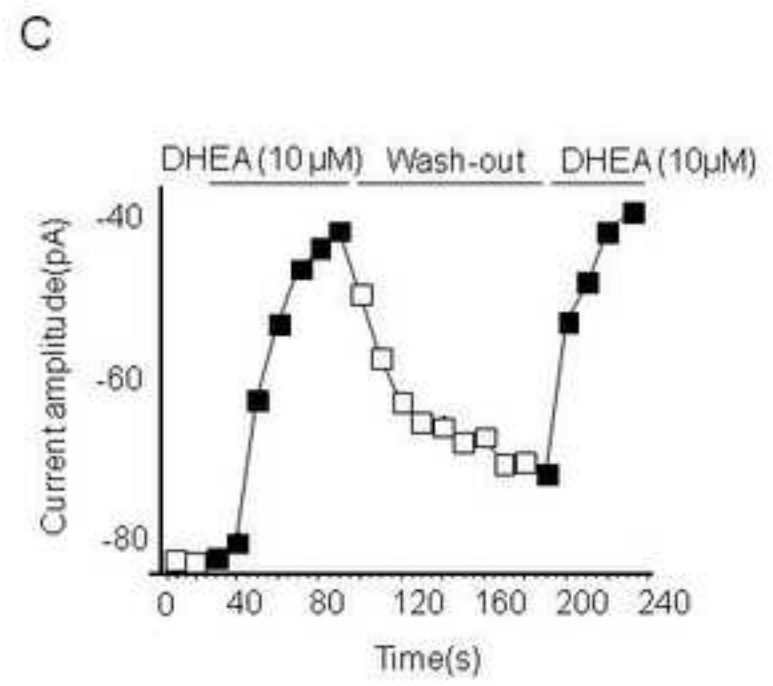
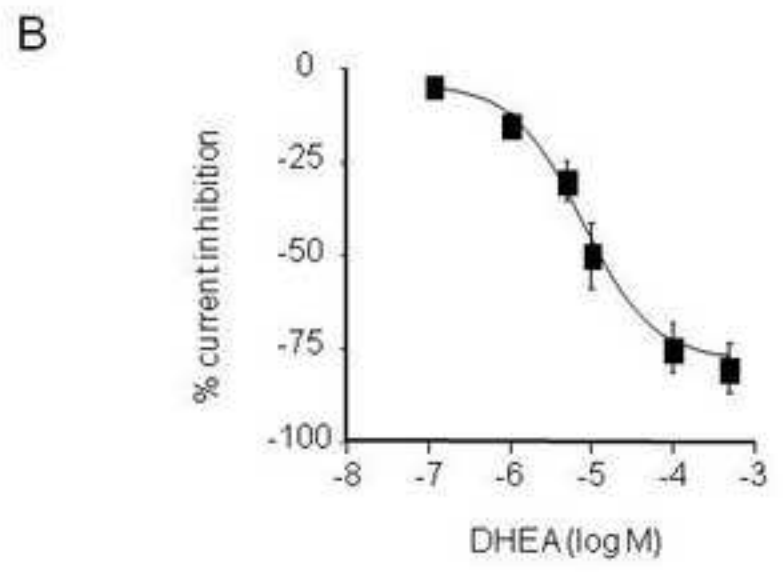
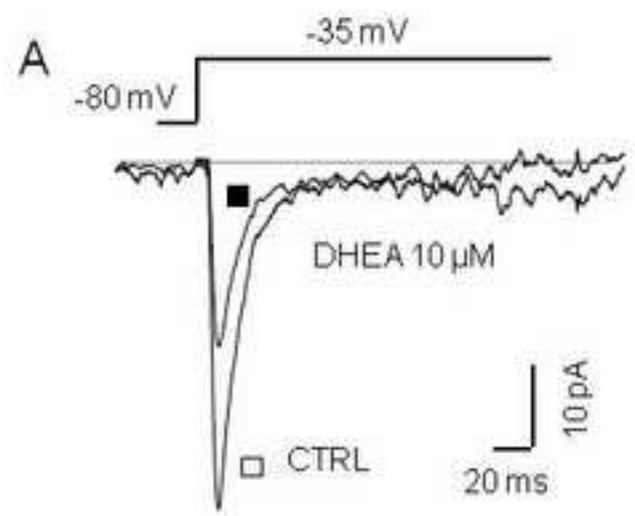


Fig 8

Figure9

[Click here to download high resolution image](#)

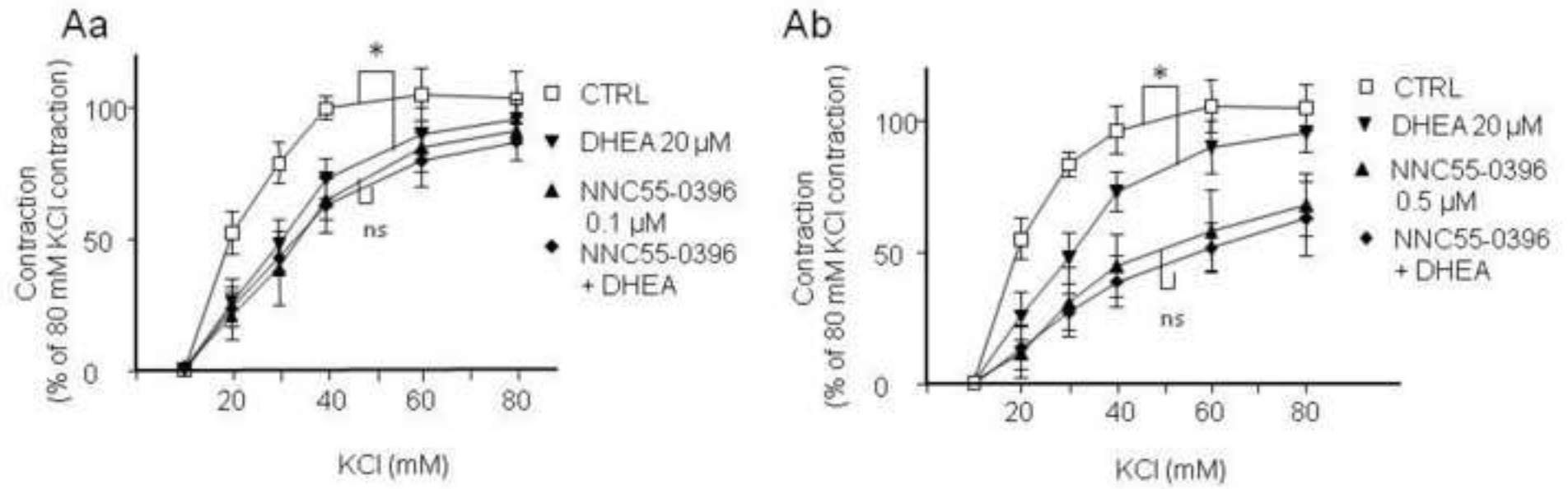


Fig 9

## **T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension**

Marc Chevalier<sup>1,2</sup>, Guillaume Gilbert<sup>1,2</sup>, Etienne Roux<sup>1,2</sup>, Philippe Lory<sup>3</sup>, Roger Marthan<sup>1,2,4</sup>, Jean-Pierre Savineau<sup>1,2</sup>, Jean-François Quignard<sup>1,2\*</sup>.

<sup>1</sup>. Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U 1045, F-33000 Bordeaux, France

<sup>2</sup>. INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, 1045, F-33000, Bordeaux, France

<sup>3</sup>. CNRS, UMR-5203, Institut de Génomique Fonctionnelle, F-34094 Montpellier, France

<sup>4</sup>. CHU Bordeaux, Exploration Fonctionnelle Respiratoire, F-33000, Bordeaux, France.

\*Corresponding author: Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U 1045, F-33000 Bordeaux, France, 33-557579571, jean-francois.quignard@u-bordeaux2.fr

Short title: T-channels and pulmonary artery

**6328** words, including the abstract, manuscript text, references and figure legends

**Abstract:** T-type calcium channels are involved in hypoxic pulmonary hypertension. Marc Chevalier, Guillaume Gilbert, Etienne Roux, Philippe Lory, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Jean-François Quignard.

**Aims:** Pulmonary hypertension (PH) is the main disease of pulmonary circulation. Alteration in calcium homeostasis in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) is recognized as a key feature in PH. The present study was undertaken to investigate the involvement of T-type voltage gated calcium channels (T-VGCC) in the control of the pulmonary vascular tone and thereby in pulmonary hypertension development.

**Methods and results:** Experiments were conducted in animals (rats and mice) kept 3-4 weeks in either normal (normoxic) or hypoxic environment (hypobaric chamber) to induce chronic hypoxia (CH) PH. *In vivo*, chronic treatment of CH rats with the T-VGCC blocker TTA-A2 prevented PH and the associated vascular hyper-reactivity, pulmonary arterial remodeling and right cardiac hypertrophy. Deletion of the  $Ca_v3.1$  gene (a T-VGCC isoform) protected mice from CH-PH. *In vitro*, patch-clamp and PCR experiments revealed the presence of T-VGCC (mainly  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$ ) in PASMC. Mibefradil, NNC550396 and TTA-A2 inhibited, in a concentration-dependent manner, T-VGCC current, KCl-induced contraction and PASMC proliferation.

**Conclusion:** The present study demonstrates that T-VGCC contribute to intrapulmonary vascular reactivity and are implicated in the development of hypoxic PH. Specific blockers of T-VGCC may thus prove useful for the therapeutic management of PH.

**Key words:** Arterial reactivity - calcium channel blockers - Pulmonary circulation - Patch-clamp - T-type calcium currents.



## 1. Introduction.

Pulmonary circulation is a specific circulation with low pressure and high flow. The main disease of the pulmonary circulation is pulmonary hypertension (PH). According to the classification of PH, pulmonary arterial hypertension (PAH), the most evident form of PH, is a fatal disease characterized by an increase in pulmonary blood pressure (mean value > 25 mmHg) and vascular resistance. It leads to a right ventricular heart failure and ultimately to death<sup>1</sup>. This disease is associated with a hyper-reactivity to vasoconstrictors agents such as serotonin<sup>2</sup> and a remodeling of pulmonary arteries with proliferation and migration of pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMOC)<sup>1, 3</sup>.

An increase in the intracellular calcium concentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ) is a critical event involved in PASMOC contraction, proliferation and migration which evolves during PH<sup>4</sup>. Evidence indicates that changes in expression and function of ionic channels involved in  $[Ca^{2+}]_i$  handling such as potassium channels, voltage-independent channels (TRPC6, TRPC1) or voltage-gated calcium channels (VGCC) are implicated in PH<sup>5-7</sup>.

VGCC constitute a main route for calcium influx into PASMOC<sup>8</sup>. The family of VGCC is divided into high voltage-gated channels (L-VGCC, for instance in PASMOC) and low voltage-gated T-type channels (T-VGCC). Three isoforms ( $Ca_v3.1$ ,  $Ca_v3.2$  and  $Ca_v3.3$ )<sup>9</sup> encode for T-VGCC. Although L- and T-VGCC are both activated by depolarization, L-VGCC are mainly activated by large depolarization whereas T-VGCC are activated near to the resting membrane potential and inactivate rapidly<sup>9</sup>.

Although L-VGCC inhibitors are largely used in the treatment of systemic vascular diseases, they are not so efficient in the treatment of PH<sup>10</sup>. We hypothesize that T-VGCC could constitute an alternative therapeutic target in PH since they also

participate **in** cell proliferation and **in** vascular tone of pulmonary arteries. Indeed, T-VGCC protein expression is increased in PH<sup>11, 12</sup> and DHEA, a T-VGCC inhibitor<sup>13</sup>, prevents PH<sup>3</sup>. Those channels are involved in vascular contraction induced by L-NNA in rat hypertensive pulmonary arteries<sup>14</sup> or by serotonin in bovine pulmonary vessels<sup>15</sup>. Finally, the selective blockade of Ca<sub>v</sub>3.1 expression (a T-VGCC isoform) inhibits PASMC proliferation, *in vitro*<sup>16, 17</sup>. Studies on T-VGCC have been hampered, thus far, by the use of weakly selective inhibitors (mibefradil, nickel, flunarizine or pimozide)<sup>9, 18</sup>. Whereas these drugs also target L-VGCC, new classes of blockers (TTA-A2 or NNC550396), are reported to be more selective<sup>19, 20</sup> and have therefore been used in this study.

The purpose of this study was thus to specifically evaluate the involvement of T-VGCC in pulmonary vascular reactivity and in PH. Using animal models of PH (chronically hypoxic rats and mice), genetically modified mice (Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup> mice) and selective T-VGCC blockers, we demonstrate that T-VGCC are involved in the development of PH.

## **2. Material and Methods.**

Complete section is provided in supplemental data S1.

### **2.1. Animal models.**

The investigations were carried out according to the care and use of our local ethic committee ("Comité d'Ethique de Bordeaux en Experimentation Animale N°50)

Wistar male rats (200–300 g) were housed in ambient room air (normoxic rats -Nx) or in a hypobaric chamber (50 kPa) for 3 weeks to induce PH (chronic hypoxic rats - CH). At completion of the 3 weeks period, rats were anesthetized with 10 mg/kg xylazine and 50 mg/kg ketamine by intraperitoneal injection, and mean pulmonary arterial pressure (PAP) was measured, in closed-chest rats, by means of a catheter inserted into the pulmonary artery and attached to a Baxter Uniflow gauge pressure transducer.

Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup> mice were a gift from Pr. Shin (KIST, Seoul, Republic of Korea). Animals were genotyped as previously described<sup>21</sup>. Littermate mice were separated in four groups. Normoxic (Nx) Ca<sub>v</sub>3.1<sup>+/+</sup> or Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup> mice were housed in ambient room air, whereas chronic hypoxic (CH) Ca<sub>v</sub>3.1<sup>+/+</sup> or CH Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup> mice were housed for 4 weeks in the hypobaric chamber (50 kPa)<sup>22</sup>. To measure right ventricle pressure (RVP), mice were anesthetized with 10 mg/kg xylazine and 50 mg/kg ketamine by intraperitoneal injection, and mean RVP was measured, in closed-chest mice, through a mylan catheter inserted in the right ventricle through the cardiac wall.

For *in vitro* and histology experiments, rats and mice were euthanized by intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (120 mg/Kg)

## **2.2. Membrane current recordings.**

Voltage-clamp recordings (whole-cell configuration) were made with a standard patch-clamp technique on freshly isolated PASMC obtained by enzymatic dissociation of intrapulmonary artery (IPA)<sup>13</sup>. Complete electrophysiological details are provided in S1.

## **2.3. PCR experiments.**

PCR experiments were conducted on a Rotor-Gene 2000 (Corbett Research). Primers are indicated in S1.

## **2.4. Contraction experiments.**

Rat IPA rings of 1.6–2 mm length were mounted in organ baths of a computerized isolated organ bath system (IOX, EMKA Technologies, Paris) containing a Krebs solution (S1). IPA rings from Nx and CH rats were set at optimal length by equilibration against a passive load of 1 g and of 1.6 g, respectively<sup>2</sup>. At the beginning of each experiment, K<sup>+</sup>-rich (KCl, 80 mM) solution was applied in order to obtain a reference contraction, which was used to normalize subsequent contractile responses. Reactivity of rings was assessed by constructing both cumulative and non cumulative concentration–response curve to KCl (15 mM to 80 mM) (fig S1).

## **2.5. Cell proliferation assay.**

Briefly, DNA synthesis was assayed using BrdU incubation (10  $\mu$ M, 2h) according to the manufacturer's instructions (BrdU colorimetric method Roche Applied Science) on cultured PASMC in the presence of different calcium inhibitors (S1).

## **2.6. Histology.**

A section of lung was formalin-fixed for histological studies. IPA external diameter (PAED), IPA internal diameter (PAID), and percentage vessel wall thickness ( $(PAED - PAID)/PAED \times 100$ ) were measured in small- and medium-sized IPA (80–200  $\mu$ m). Each group consisted of four rats or mice, and 10 measures were made per rat by an investigator blinded to the treatment groups.

## **2.7. TTA-A2 infusion in rats.**

The T-VGCC blocker, TTA-A2, was dissolved in vehicle: 10% ethanol, 40% PEG400, 25% hydroxypropyl-beta-cyclodextrin at a concentration of 20 mg/mL. TTA-A2 was delivered at the rate of 0.05 mg/h for 3 weeks using an osmotic mini pump (Alzet, model 2ML4) implanted subcutaneously two days before exposition to CH (anesthesia: 60 mg/Kg pentobarbital, intra-peritoneal injection). Such a protocol led to a TTA-A2 concentration in blood around 1  $\mu$ M.

## **2.8. Drugs.**

All drugs were from Sigma. TTA-A2 was provided by Merck and Co., Inc.

## **2.9. Statistics.**

Data are given as mean  $\pm$  s.e.m. of n experiments. In Figures 5 and 6, n was the number of animal tested. Statistical **analyses** were performed with a two way ANOVA

test for repeated measures (figures 1C, 4A,B,C, 6A), one-way ANOVA test with a Bonferroni correction for post test (Figure 2A,B,D,E, 3A,B,D, 4D, 5D, 6B,C) and Mann-Whitney test (figure 5A). Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ .

### 3. Results.

#### 3.1. T-VGCC are expressed in PASMIC.

Depolarization of freshly isolated PASMIC from Nx or CH rats activated a fast inward and transient current (fig 1A,B) in the presence of L-VGCC inhibitors. This current has T-VGCC characteristic as (1) it inactivated rapidly ( $\tau$  inactivation at -30 mV:  $22 \pm 4$  ms  $n=7$  and  $25 \pm 6$  ms  $n=5$ , for Nx and CH rats, respectively), (2) the threshold of activation was around -50 mV and (3) the maximum peak current was measured around -30 mV (fig 1C). Furthermore, T-VGCC blockers TTA-A2 (1  $\mu$ M) and NNC550396 (1  $\mu$ M) inhibited this current in Nx-rats at all depolarizing potentials tested (fig 1A and S2A, B, C).  $Ni^{2+}$  (50  $\mu$ M) partially inhibited this current ( $-38 \% \pm 5$ ,  $n=3$ ). The electrophysiological identification of T-VGCC current was also confirmed by RT-PCR analysis using specific primers for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  on RNA extracts from the media of rat IPA (fig 1D). PASMIC also expressed L-VGCC current. This current was completely inhibited by the L-VGCC antagonist diltiazem (fig S2D), partially inhibited by mibefradil (1  $\mu$ M, 34% inhibition,  $n=4$ ) and NNC550396 (1  $\mu$ M, 22% inhibition,  $n=4$ ) but almost not modified by TTA-A2 (1  $\mu$ M, 4% inhibition,  $n=4$ ) (fig.1E, F)

#### 3.2. TTA-A2 prevents CH-induced PH.

Since PASMIC express T-VGCC, we investigated the involvement of T-VGCC on the development of PH by using TTA-A2 treatment *in vivo*. Rats were implanted with an osmotic pump filled with TTA-A2 and then kept in the hypobaric chamber for 3 weeks. TTA-A2 treatment prevented CH-induced increase in both mean pulmonary pressure (37 and 25 mmHg,  $p<0.05$ , in CH and CH-TTA rats, respectively) and

Fulton's index (0.5 and 0.36,  $p < 0.05$ ) in CH and CH-TTA rats, respectively) (fig 2A, B). TTA-A2 treatment also protected from CH-induced wall thickness hypertrophy as shown in figure 2C, D. We investigated whether the *in vivo* chronic treatment with TTA-A2 also prevented hyper-reactivity of IPA to vasoconstrictors (KCl and serotonin). *In vitro*, 15 mM KCl induced a contraction of  $29 \pm 4\%$  ( $n=7$ ) of the maximal contraction (80 mM KCl) in IPA from CH-rats compared with  $5 \pm 3\%$  ( $n=7$ ) in IPA from Nx-rats. When CH-rats were treated *in vivo* with TTA-A2, 15 mM KCl-induced contraction was reduced to  $9 \pm 3\%$  ( $n=7$ ,  $p < 0.05$ ), showing that TTA-A2 prevented vascular hyper-reactivity (Fig 2E). Moreover, chronic TTA-A2 treatment *in vivo* also reduced the hyper-responsiveness of CH-IPA to serotonin (fig 2E).

### **3.3. Deletion of $Ca_v3.1$ gene protected mice from PH.**

To further confirm the contribution of T-VGCC in the development of CH-induced PH, we performed experiments on  $Ca_v3.1$  null mice ( $Ca_v3.1^{-/-}$ ). In Nx mice, right ventricle pressure and Fulton's index were not statically different between WT and  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice (fig 3). In WT mice, 4 weeks in the hypobaric chamber induced PH, confirmed by an increase in both right ventricle pressure and Fulton's index (fig 3A, B). In contrast, no significant increase was observed in  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice for any of these parameters (fig 3A, B). Using morphological analysis, in order to compare CH-induced IPA remodeling in WT and  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice, we observed that CH induced a potent remodeling in WT but not in  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice (fig 3C, D). Taken together, these results show, for the first time, that the  $Ca_v3.1$  contributes to the development of CH-induced PH.

### **3.4. T-VGCC and vascular reactivity in rat Nx- and CH-IPA.**



To better understand the mechanisms by which T-VGCC blockers prevent PH, we investigated the effect of acute application of T-VGCC blockers on KCl-induced contraction in vitro on Nx and CH-IPA.

#### **3.4.1. T- VGCC blockers reduce KCl-induced contraction in IPA from Nx-rats**

A non-cumulative concentration-response curve for KCl (15 to 80 mM, fig S1) was used to allow PASMCM repolarization between each KCl application and to avoid T-VGCC inactivation. TTA-A2 (1, 10 or 30  $\mu$ M) reduced the amplitude of KCl-induced contraction, in a concentration-dependent manner (fig 4A). Moreover, its inhibitory effect was more pronounced for low than for high KCl concentrations: TTA-A2 (30  $\mu$ M) reduced by 79% the 30 mM KCl-induced contraction and by only 35% the 80 mM KCl-induced contraction (fig 4A, D). NNC550396 was also a powerful inhibitor of KCl-induced contraction with similar characteristics: at 10  $\mu$ M, it fully abolished the 30 mM KCl-induced contraction but reduced the 80 mM KCl-induced contraction by 70% only (fig 4B, D). Mibefradil as well as flunarizine and pimoziide inhibited KCl-induced contraction but displayed the same inhibitory effect on contraction induced by either low (30 mM) or high (80 mM) KCl concentrations (fig 4C and S3), which may be associated with an effect on both T and L-VGCC. Finally, 50  $\mu$ M  $Ni^{2+}$  weakly inhibited the 30 mM KCl-induced contraction ( $14 \pm 5$  %,  $n=3$ , fig S3).

Since activation of T-VGCC depends on the resting membrane potential value, subsequent experiments were performed in the presence of cromakalim, a well known K-ATP channel opener which hyperpolarizes PASMCM<sup>23</sup>. TTA-A2 and mibefradil were more powerful inhibitors of KCl-induced contraction in the presence of 10  $\mu$ M cromakalim (fig 5A). Additionally, we performed a cumulative concentration-response curve to KCl, which favored progressive cell depolarization and T-VGCC

inactivation (fig S1). In these conditions, TTA-A2 (10  $\mu$ M) had a smaller inhibitory effect on 30 mM KCl-induced contraction than in the protocol performed in figure 3 (-26  $\pm$  4 % n=4 (fig 4) and -57  $\pm$  6 % n=8 (fig 5B)).

T-VGCC blockers were tested in the presence of the L-VGCC blocker diltiazem. Diltiazem (5  $\mu$ M), alone, decreased the contraction induced by non-cumulative doses of KCl (15 - 80 mM). However, TTA-A2 exhibited an additional inhibitory effect, mainly for low KCl concentrations (fig 5C). NNC550396 had a similar effect on 40 mM KCl induced contraction (fig 5D).

Altogether, these results imply that, in Nx rat IPA, KCl-induced contraction is sensitive to T-VGCC blockers, especially under conditions for which T-VGCC may be active (i.e. hyperpolarized resting membrane potential).

#### **3.4.2. T- VGCC blockers reduce KCl-induced contraction in IPA from CH-rats.**

We observed that low KCl concentrations (15 to 40 mM) induced a greater contraction in CH-IPA than in Nx-IPA, indicating a hyperactivity of CH-IPA to a weak depolarization (fig 6A, B). All T-VGCC blockers inhibited KCl-induced contraction on CH-IPA. The effect was similar to or slightly smaller than for Nx-rats (fig 6B). As for Nx-rats, TTA-A2 inhibitory effect was more pronounced for low than for high KCl concentrations: 30  $\mu$ M TTA2 reduced by 85 % and 35 % the 15 mM and 80 mM KCl-induced contraction, respectively. Mibefradil inhibition was consistent whatever the KCl concentration used (not shown). CH-IPA appeared thus hyper-reactive due to T-VGCC stimulation by low KCl concentration, and this feature was reverted by specific T-VGCC inhibitors.

#### **3.5. T-VGCC blockers reduce PASMC proliferation.**

Since cell proliferation is implicated in PH development<sup>17</sup>, PASMC proliferation stimulated by 10% fetal calf serum was evaluated. In the presence of T-VGCC blockers, PASMC proliferation was inhibited in a concentration-dependent manner (fig 6C). The anti-proliferative effect was still observed in the presence of the L-VGCC inhibitor, diltiazem. These data demonstrate the involvement of T-VGCC in PASMC proliferation.

#### 4. Discussion.

In this study, we have demonstrated that T-VGCC play a role in the control of pulmonary vascular tone. We show, for the first time that T-VGCC, and mostly  $Ca_v3.1$ , are involved in the development of PH since T-VGCC blockers administered *in vivo* or deletion of the  $Ca_v3.1$  gene prevent the development of CH-induced PH in rats and mice, respectively.

Patch-clamp experiments indicate that PASMC express functional T-VGCC characterized by a rapidly inactivating current, a low voltage activation threshold and a sensitivity to T-VGCC inhibitors, mibefradil, TTA-A2 and NNC550396<sup>9, 24</sup> as previously described in cerebral arteries<sup>25</sup>. Initially described in few SMC types<sup>17, 21, 24, 26-28</sup>, **the present study confirms that** T-VGCC are obviously present in more SMC types e.g., PASMC<sup>13</sup>. The molecular entity responsible for the T-current in IPA is a combination of  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  isoforms (fig1D). Indeed, in the present patch-clamp experiments, low  $Ni^{2+}$  concentrations (50  $\mu$ M), which inhibit only  $Ca_v3.2$  channel<sup>29</sup>, partially inhibited the T-current. In some SMC, the two isoforms display opposite effects on vasomotor response.  $Ca_v3.1$  is mainly implicated in cell proliferation and contraction<sup>17, 28, 30</sup>, whereas  $Ca_v3.2$  is involved in vessel relaxation as in coronary arteries due to its action on potassium channels<sup>21</sup>. If it was the case in PASMC, low  $Ni^{2+}$  concentration, which inhibits  $Ca_v3.2$ , could unmask a vasoconstrictor effect mediated by  $Ca_v3.1$  VGCC. Here, we did not observe such an effect thus indicating that both  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  VGCC are involved in IPA contraction. Patch-clamp experiments also show that TTA-A2 inhibits T-VGCC without affecting L-VGCC in PASMC confirming that it is ~300 fold more selective for T-VGCC than for related L-VGCC<sup>20</sup>. We therefore used this selective T-VGCC

inhibitor for *in vivo* treatment of rats. TTA-A2 did prevent PH as it statistically reduced mean PAP increase, right cardiac hypertrophy and pulmonary arterial remodeling that are hallmarks of PH<sup>3</sup>. The different critical functions of T-VGCC including control of cell proliferation, vascular tone and vascular hyper-reactivity may explain the global effect of TTA-A2 on PH. T-VGCC inhibition reduces PASMC proliferation as in carotid or IPA<sup>16, 17, 30</sup> thus counteracting vascular wall remodeling.

We show that chronic treatment by TTA-A2 administered *in vivo* reduces pulmonary vascular hyperreactivity to both KCl and serotonin<sup>2</sup> in CH-rats. This effect may be due to a continuous decrease in the calcium influx through T-VGCC, thus limiting vascular contraction and pressure increase. The subsequent lower calcium influx in IPA could also reduce calcium effect on IPA remodeling which normally occurs during CH-PH. Indeed, T-VGCC expression is increased in CH-PASMC<sup>12</sup>. Here, we did not observe a statistically significant increase in T-VGCC activity during PH *in vitro* in dissociated cell but it could be hypothesized that such activity is increased, *in vivo*, by local modulators. For instance, serotonin, whose concentration is increased in PH, could activate T-VGCC via a fine tuning of the membrane potential<sup>15</sup>. Additional signaling pathways could also account for the effect of T-VGCC inhibitors. For instance, hyper-reactivity is linked to Rho-kinase dependent pathway. Since interplays between T-VGCC and Rho-kinase have been previously described<sup>31</sup>, T-VGCC inhibitors may also reduce hyper-reactivity by interfering with this pathway. Modification of the expression of ionic channel (e.g., potassium channels), serotonin receptor, or intracellular calcium signaling pathway could not be excluded to explain the reduction of vascular hyper-reactivity by TTA-A2. All T-VGCC inhibitors inhibited KCl-induced contraction to the same extent as or more weakly than that observed in Nx-IPA. The

somewhat lower efficiency of blockers in CH-PASMC is consistent with the fact that membrane potential is more depolarized in CH-PASMC compared with Nx-PASMC<sup>32</sup> and this is associated with an extended inactivated state for T-VGCC (i.e. less available T-VGCC). TTA-A2 is a newly developed molecule and we have not examined its effect on all signaling pathways potentially involved in PH. The beneficial effect of TTA-A2 on PH development may also be due to an action on some other target such as L-VGCC, Cl<sup>-</sup> channels, TRP channels which are involved in the pathophysiology of PH, although, in the latter case, we have shown that it did not inhibit TRPV4 channels, fig S2 E).

We have confirmed the role of T-VGCC in PH using knock-out Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup> mice. We have performed experiments on this strain mouse as (1) these mice have a normal blood pressure without important vessel abnormalities<sup>33</sup>; (2) relaxation phenomena are not altered<sup>21</sup>; (3) SMC proliferation depends on this isotype<sup>34</sup>. Wild type CH mice develop PH evidenced by an increase in systolic pressure, pulmonary arterial wall remodeling and right ventricle hypertrophy (fig 3). By contrast, mice lacking Ca<sub>v</sub>3.1 gene (Ca<sub>v</sub>3.1<sup>-/-</sup>) did not develop these cardiovascular alterations when exposed to CH. Ca<sub>v</sub>3.1 deletion mimics TTA-A2 action in CH-rats and may act on PH by the same way. Other hypotheses may explain this prevention of PH. T-VGCC deletion in endothelium and cardiomyocytes may be involved in the reduction of PH symptoms. Indeed, T-VGCC participate in the endothelium-dependent regulation of vascular tone and red blood cells aggregation<sup>35</sup> and also in cardiac hypertrophy<sup>36</sup>. Involvement of Ca<sub>v</sub>3.2 channels in the development of PH could not be excluded and further experiments with Ca<sub>v</sub>3.2<sup>-/-</sup> mice will be required to address this issue. Overexpression of Ca<sub>v</sub>3.2 during PH is in favor of a putative role of this channel in PH<sup>12</sup>. However

Ca<sub>v</sub>3.2 VGCC may play a complex role since it is implicated in vascular relaxation in the coronary artery<sup>21</sup> or it can antagonize relaxation elicited by 5-6 EETs (epoxyeicosatrienoic acids)<sup>37</sup>.

While the role of L-VGCC in IPA contraction has been extensively described<sup>38</sup>, the role of T-VGCC is not yet established. The function of T-VGCC was emphasized in our experiments by using a variety of T-VGCC inhibitors on KCl-induced contraction. KCl-induced contraction is of physiologic relevance since it induces PASMC depolarization and VGCC activation is induced by several vasoconstrictor agents. In IPA, we show that TTA-A2 inhibits, in the concentration range specific to T-VGCC, KCl-induced contraction confirming that T-VGCC are important contributors to calcium influx in IPA. Previous studies have shown that TTA-A2 inhibits all three subtypes of low voltage-gated T-VGCC with a comparable potency (IC<sub>50</sub> around 1 μM)<sup>39</sup>. However TTA-A2 is a more powerful inhibitor of Cav3.2 at more depolarized holding potential<sup>40</sup> (IC<sub>50</sub> around 10 nM). The concentrations used in the present experiments are far greater and this does not allow to discriminate between the respective involvement of Ca<sub>v</sub>3.1 and Ca<sub>v</sub>3.2 isoforms in the contraction. NNC550396 is a less selective inhibitor of T-VGCC since it inhibits T and L-VGCC as previously described<sup>41</sup>. However, the observed inhibitory effect of NNC550396 at 1 μM was more important than that on L-VGCC, confirming the involvement of T-VGCC in contraction. Mibefradil inhibits T-VGCC current with an EC<sub>50</sub> around 1 μM on SMC<sup>42</sup> but also other calcium channels<sup>43</sup> according to the concentration used as shown in figure 1. In PASMC, low concentrations of mibefradil (<1 μM) inhibited KCl-induced contraction to a larger extent than L-VGCC (fig 1E and 3C) confirming the role of T-VGCC in KCl effect. Moreover, the additive effect of the combined application of

diltiazem and NNC550396 (fig 5C) confirms that the inhibition observed in the presence of less specific blockers of T-VGCC may be associated with a mixed inhibition of T-VGCC and L-VGCC current.

To further determine the role of T-VGCC in the contraction of IPA, we took into account the electrophysiological properties of these channels. Low depolarization activates mainly T-VGCC (low threshold channels) whereas high depolarization is required to activate L-VGCC as described in cerebral arteries<sup>26</sup>. Taking advantage of the well established relationship between extracellular KCl concentration and the resting membrane potential in IPA<sup>23</sup>, we assumed that the contraction induced by low KCl concentrations (estimated depolarization<sup>23</sup> of 8 and 16 mV for 15 mM and 30 mM KCl, respectively) implicates mainly T-VGCC, whereas high KCl concentrations (estimated depolarization<sup>23</sup> of 28 and 38 mV for 40 mM and 80 mM KCl, respectively) activate mainly L-VGCC. In accordance with this hypothesis, TTA-A2 (and NNC550396) mainly inhibited the contraction induced by low KCl concentrations as compared to contraction induced by high KCl concentrations while less specific T-VGCC inhibitors, such as mibefradil, inhibited both contractions to the same extent. Activity of T-VGCC is dependent on the resting membrane potential value. Indeed, when the resting membrane potential is depolarized, T-VGCC turn into an inactivated state. Accordingly, T-VGCC blockers were less powerful when cells depolarize gradually (as during CCRC to KCl, fig. 5B). In conclusion, T-VGCC inhibition could thus reduce the calcium influx that triggers vasoreactivity and myogenic tone in pulmonary artery as observed in cerebral artery<sup>26, 27, 41</sup>.

Since the resting membrane potential of PASMC is around -50 mV, a value at which T-VGCC are largely inactivated, the contribution of these channels to T-VGCC to the



KCl-induced contraction might be questioned. However, a "window" T-current<sup>44</sup> as well as a T-VGCC like current with a high threshold of activation<sup>45</sup>, might give rise to a sustained calcium influx also at more depolarized potentials. Both these currents are inhibited by TTA-A2<sup>40</sup>.

In conclusion, the present study indicates that T-VGCC participate to IPA vascular reactivity under control conditions. Using different animal models of PH including genetically modified mice ( $Ca_v3.1^{-/-}$  mice), we have also demonstrated that T-VGCC, i.e.  $Ca_v3.1$  channels, are implicated in the development of hypoxic PH. These results suggest that specific blockers of T-VGCC could be a valuable therapeutic means for PH.

## **5. Funding.**

This work was supported by grants from 'Preciput Universite Bordeaux Segalen' and 'Conseil Régional d'Aquitaine'

Conflict of Interest: none declared

## **6. Acknowledgements.**

We thanks Huguette Crevel, Paul Robillard (INSERM 1045, Bordeaux France) and Cecille Alliere (INSERM, 1034, Pessac, France) for technical assistance (contraction experiments and cardiac pressure measurement, respectively). We thank Pr. Hee-Sup Shin for  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice gift (Center for Neural Science KIST. 39-1 Hawolgok-dong Seongbuk-ku Seoul 136-791 Republic of Korea)

## 7. Figures legend.

**Figure 1:** Rat PASMC express functional T-VGCC. A, B) Typical traces of T-VGCC currents from Nx and CH-PASMC, respectively. C) Current–voltage relationships obtained from a holding potential of  $-80$  mV in Nx or CH-cells ( $n=4$ ). Current values were normalized by cell capacity (pF). Currents were recorded in the presence of 5 mM  $Ba^{2+}$  as charge carrier and in the presence of 0.1  $\mu$ M nifedipine to inhibit L-VGCC (step depolarization from  $-80$  mV to  $-30$  mV). D) The presence of  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$  transcripts was tested through standard RT-PCR. Expected lengths of PCR products were 174 and 162 bp for  $Ca_v3.1$  and  $Ca_v3.2$ , respectively. E) Typical trace of L-VGCC current in the presence of TTA-A2 (30  $\mu$ M) and NNC550396 (NNC) (10  $\mu$ M). F) Compiled inhibitory effects of L-VGCC inhibitor (diltiazem) and T-VGCC inhibitors (Mibefradil, NNC550396 and TTA-A2) on L-VGCC current. Currents were recorded in the presence of 5 mM  $Ba^{2+}$  as charge carrier (step depolarization from  $-50$  mV to 0 mV).

**Figure 2:** TTA-A2 inhibits PH development in CH rat. TTA-A2 (infused with an osmotic pump during 3 weeks) prevented the increase of the mean PA pressure (A), right ventricle hypertrophy (Fulton index, B) and arterial remodeling of CH rats (C, D). C) Typical image of lung of Nx, CH and CH+TTA-A2 rats. The arrows indicate the vessel, D) histogram of wall thickness results. E) Infused TTA-A2 prevented vascular hyper-reactivity of IPA to vasoactive agents: 15 mM KCl and 1  $\mu$ M serotonin. Values are normalized to the amplitude of an 80 mM KCl-induced contraction obtained on Nx, CH and chronically infused TTA-A2 CH rats. Note that IPA were washed several

time before contraction experiments, allowing a high dilution of infused TTA-A2. \* indicate  $p < 0.05$ . ns: not significantly different.

**Figure 3:**  $Ca_v3.1$  channel is required for CH induced PH in mice. Wild-type (WT) and  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice were maintained in Nx condition or subject to CH for 3 weeks (CH). (A) Mean right ventricle pressure; (B) Right ventricle hypertrophy (Fulton index). In C, typical images of lungs from Nx WT, CH WT, Nx  $Ca_v3.1^{-/-}$  and CH  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice (the arrow indicates the vessel). D) Quantification of wall thickness/vessels size ratio of pulmonary arteries. Note that Nx  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice had the same parameters as Nx mice but CH  $Ca_v3.1^{-/-}$  mice did not develop a severe PH, compared to WT CH mice. \* indicate  $p < 0.05$ . ns: not significantly different.

**Figure 4:** T-VGCC blockers inhibit KCl-induced contraction in Nx-rat IPA. A, B, C) Effect of TTA-A2 (inset original trace), NNC550396 and Mibefradil at different concentration on non-cumulative concentration–response curve to KCl. D) Percentage of inhibition the T-VGCC blockers for each KCl concentration. TTA-A2 and NNC55-0396 inhibited mainly contraction induced by low KCl concentration whereas Mibefradil was similarly effective regardless to the concentrations used. Experiments were performed on rat IPA rings ( $n = 5$ ). Values were normalized to an initial 80 mM KCl contraction elicited before addition of blockers. For D, statistical analysis was performed by a one way ANOVA between the 4 KCl induced response for each concentration of T-VGCC antagonist.

**Figure 5:** T-VGCC blockers effect is dependent on the membrane potential value. A) In the presence of cromakalim (K-ATP opener), T-VGCC blocker effectiveness was

increased. B) Effect of 1  $\mu$ M TTA-A2 on cumulative concentration–response curve of KCl. Note the difference with the response in figure 2A (non cumulative curve). C) and D. TTA-A2 and NNC550396 still exert inhibitory effect on KCl-induced contraction in the presence of the L-VGCC blocker, diltiazem. Experiments were performed on rat IPA rings (n = 5). TTA-A2 + diltiazem experiments were performed on non-cumulative concentration–response curve to KCl. Values are normalized to an initial KCl contraction elicited before addition of blockers (40 mM KCl for NNC+ diltiazem or 15, 25, 30, 40 ,60, 80 mM for TTA-A2 + diltiazem) .

**Figure 6:** T-VGCC blockers inhibit KCl-induced contraction in IPA from CH rat. A) Effect of TTA-A2 at different concentration on non-cumulative concentration–response curve to KCl of CH pulmonary vessels. B) Comparison of the percentage of inhibition of 30 mM KCl-induced contraction of Nx and CH pulmonary vessels by the T-VGCC blockers. Note that T-VGCC blockers have quite same efficiency on CH arteries compared with Nx arteries C) T-VGCC blocker reduces PASMC proliferation. Cell proliferation was assessed by the BrdU colorimetric method. PASMC were incubated for 24 h in DMEM 10% fetal calf serum and blocker before BrdU incorporation. Data represent the mean  $\pm$  S.E.M. obtained in triplicate well, performed in three rats. \* indicate  $p < 0.05$ .

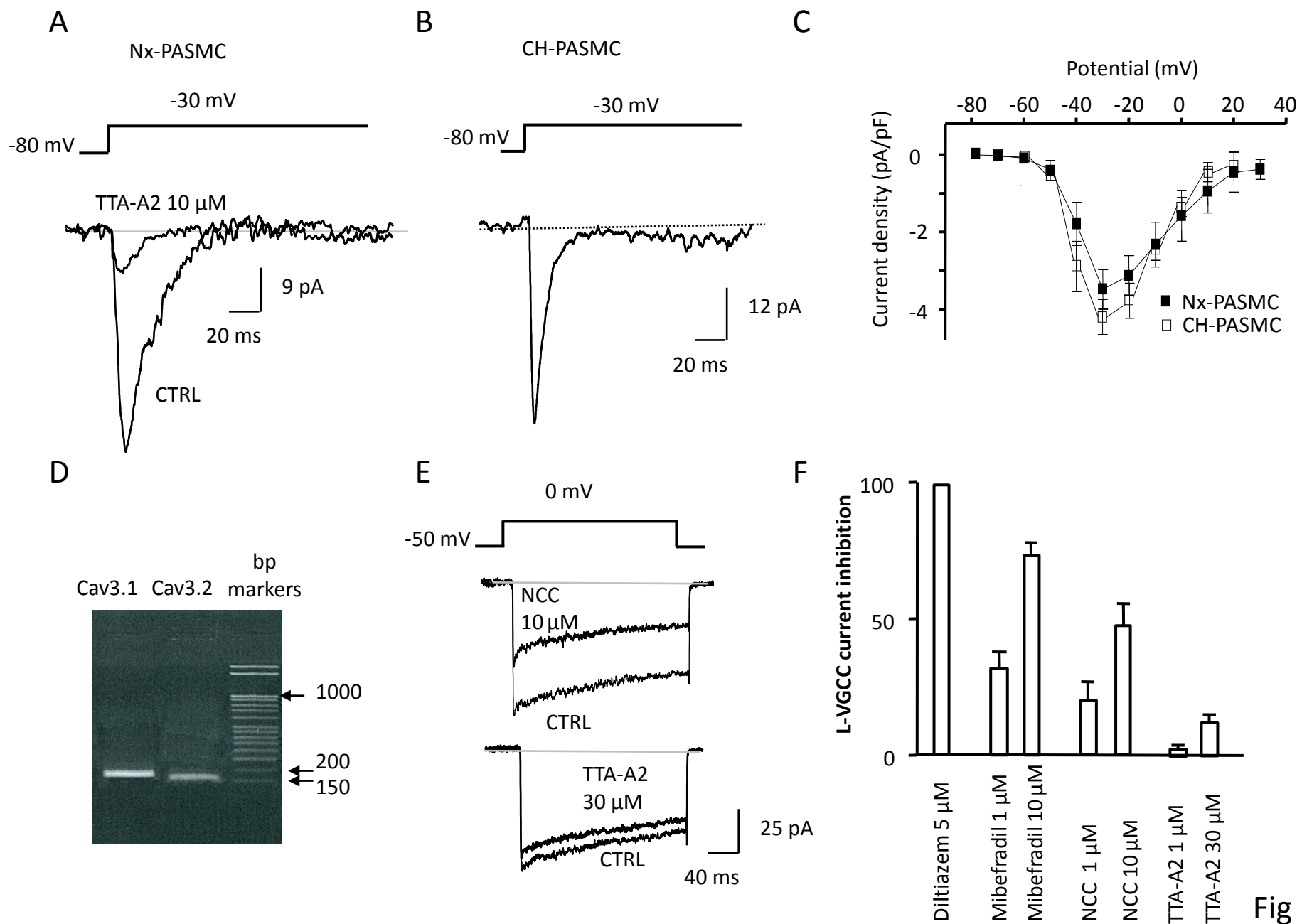
## 8. Bibliography.

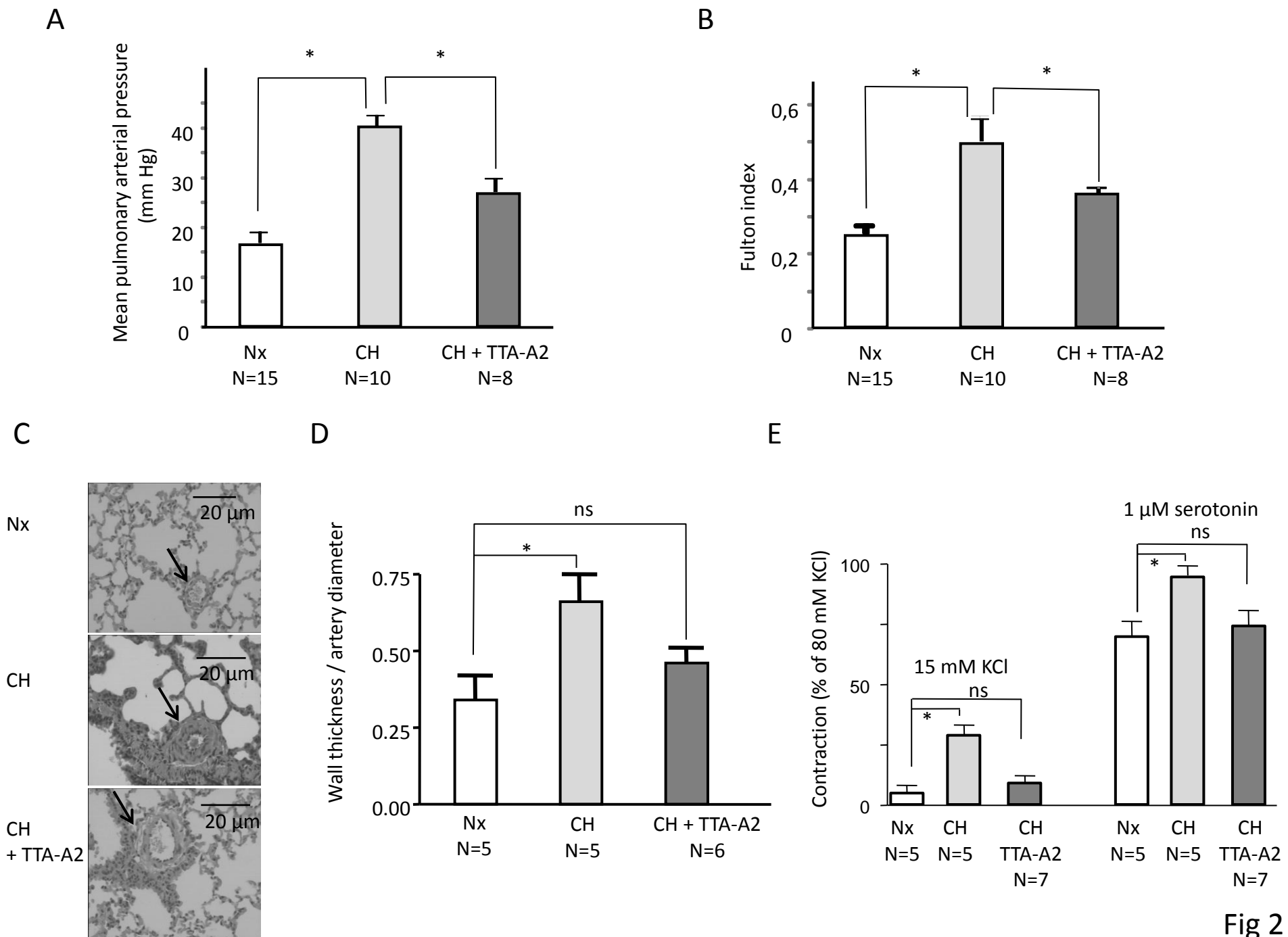
1. Hassoun PM, Adnot S. Update in pulmonary vascular diseases 2011. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**185**:1177-1182.
2. Billaud M, Dahan D, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension. *Respir Res* 2011;**12**:30.
3. Bonnet S, Dumas-de-La-Roque E, Begueret H, Marthan R, Fayon M, Dos Santos P, Savineau JP, Baulieu EE. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents and reverses chronic hypoxic pulmonary hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;**100**:9488-9493.
4. Berridge MJ. Smooth muscle cell calcium activation mechanisms. *J Physiol* 2008;**586**:5047-5061.
5. Guibert C, Ducret T, Savineau JP. Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 2011;**704**:687-706.
6. Kuhr FK, Smith KA, Song MY, Levitan I, Yuan JX. New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca(2)(+) signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;**302**:H1546-1562.
7. Firth AL, Remillard CV, Platoshyn O, Fantozzi I, Ko EA, Yuan JX. Functional ion channels in human pulmonary artery smooth muscle cells: Voltage-dependent cation channels. *Pulm Circ* 2011;**1**:48-71.
8. Lacinova L. Voltage-dependent calcium channels. *Gen Physiol Biophys* 2005;**24 Suppl 1**:1-78.
9. Perez-Reyes E. Molecular physiology of low-voltage-activated t-type calcium channels. *Physiol Rev* 2003;**83**:117-161.
10. O'Callaghan DS, Savale L, Montani D, Jais X, Sitbon O, Simonneau G, Humbert M. Treatment of pulmonary arterial hypertension with targeted therapies. *Nat Rev Cardiol* 2011;**8**:526-538.
11. Ball CJ, Wilson DP, Turner SP, Saint DA, Beltrame JF. Heterogeneity of L- and T-channels in the vasculature: rationale for the efficacy of combined L- and T-blockade. *Hypertension* 2009;**53**:654-660.
12. Wan J, Yamamura A, Zimnicka AM, Voiriot G, Smith KA, Tang H, Ayon RJ, Choudhury MS, Ko EA, Wang J, Wang C, Makino A, Yuan JX. Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;**305**:L154-164.
13. Chevalier M, Gilbert G, Lory P, Marthan R, Quignard JF, Savineau JP. Dehydroepiandrosterone (DHEA) inhibits voltage-gated T-type calcium channels. *Biochem Pharmacol* 2012;**83**:1530-1539.
14. Muramatsu M, Tyler RC, Rodman DM, McMurtry IF. Possible role of T-type Ca<sup>2+</sup> channels in L-NNA vasoconstriction of hypertensive rat lungs. *Am J Physiol* 1997;**272**:H2616-2621.
15. McKenzie C, Alapati VR, MacDonald A, Shaw AM. Mechanisms involved in the regulation of bovine pulmonary vascular tone by the 5-HT<sub>1B</sub> receptor. *Br J Pharmacol* 2010;**159**:188-200.
16. Pluteanu F, Cribbs LL. T-type calcium channels are regulated by hypoxia/reoxygenation in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H1304-1313.
17. Rodman DM, Reese K, Harral J, Fouty B, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Tada Y, Li KX, Cool C, Fagan K, Cribbs L. Low-voltage-activated (T-type) calcium channels control proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Circ Res* 2005;**96**:864-872.
18. Kuo IY, Wolfle SE, Hill CE. T-type calcium channels and vascular function: the new kid on the block? *J Physiol* 2011;**589**:783-795.
19. Huang L, Keyser BM, Tagmose TM, Hansen JB, Taylor JT, Zhuang H, Zhang M, Ragsdale DS, Li M. NNC 55-0396 [(1S,2S)-2-(2-(N-[(3-benzimidazol-2-yl)propyl]-N-methylamino)ethyl)-6-

- fluoro-1,2, 3,4-tetrahydro-1-isopropyl-2-naphthyl cyclopropanecarboxylate dihydrochloride]: a new selective inhibitor of T-type calcium channels. *J Pharmacol Exp Ther* 2004;**309**:193-199.
20. Uebele VN, Gotter AL, Nuss CE, Kraus RL, Doran SM, Garson SL, Reiss DR, Li Y, Barrow JC, Reger TS, Yang ZQ, Ballard JE, Tang C, Metzger JM, Wang SP, Koblan KS, Renger JJ. Antagonism of T-type calcium channels inhibits high-fat diet-induced weight gain in mice. *J Clin Invest* 2009;**119**:1659-1667.
  21. Chen CC, Lamping KG, Nuno DW, Barresi R, Prouty SJ, Lavoie JL, Cribbs LL, England SK, Sigmund CD, Weiss RM, Williamson RA, Hill JA, Campbell KP. Abnormal coronary function in mice deficient in alpha1H T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Science* 2003;**302**:1416-1418.
  22. Leblais V, Delannoy E, Fresquet F, Begueret H, Bellance N, Banquet S, Allieres C, Leroux L, Desgranges C, Gadeau A, Muller B. beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension. *Cardiovasc Res* 2008;**77**:202-210.
  23. Casteels R, Kitamura K, Kuriyama H, Suzuki H. Excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J Physiol* 1977;**271**:63-79.
  24. Braunstein TH, Inoue R, Cribbs L, Oike M, Ito Y, Holstein-Rathlou NH, Jensen LJ. The role of L- and T-type calcium channels in local and remote calcium responses in rat mesenteric terminal arterioles. *J Vasc Res* 2009;**46**:138-151.
  25. Harraz OF, Brett SE, Welsh DG. Nitric oxide suppresses vascular voltage-gated T-type Ca<sup>2+</sup> channels through cGMP/PKG signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013;**306**:H279-285.
  26. Abd El-Rahman RR, Brett SE, Harraz OF, Mufti RE, Goldman D, Welsh DG. Identification of L- and T-Type Ca<sup>2+</sup> Channels in Rat Cerebral Arteries: Role in Myogenic Tone Development. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2013.
  27. Howitt L, Kuo IY, Ellis A, Chaston DJ, Shin HS, Hansen PB, Hill CE. Chronic deficit in nitric oxide elicits oxidative stress and augments T-type calcium channel contribution to vascular tone of rodent arteries and arterioles. *Cardiovasc Res* 2013.
  28. Cribbs LL. T-type Ca<sup>2+</sup> channels in vascular smooth muscle: multiple functions. *Cell Calcium* 2006;**40**:221-230.
  29. Autret L, Mechaly I, Scamps F, Valmier J, Lory P, Desmadryl G. The involvement of Cav3.2/alpha1H T-type calcium channels in excitability of mouse embryonic primary vestibular neurones. *J Physiol* 2005;**567**:67-78.
  30. Tzeng BH, Chen YH, Huang CH, Lin SS, Lee KR, Chen CC. The Cav3.1 T-type calcium channel is required for neointimal formation in response to vascular injury in mice. *Cardiovasc Res* 2012.
  31. Sugano N, Wakino S, Kanda T, Tatematsu S, Homma K, Yoshioka K, Hasegawa K, Hara Y, Suetsugu Y, Yoshizawa T, Hara Y, Utsunomiya Y, Tokudome G, Hosoya T, Saruta T, Hayashi K. T-type calcium channel blockade as a therapeutic strategy against renal injury in rats with subtotal nephrectomy. *Kidney Int* 2008;**73**:826-834.
  32. Bonnet S, Dubuis E, Vandier C, Martin S, Marthan R, Savineau JP. Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing. *Cardiovasc Res* 2002;**53**:1019-1028.
  33. Mangoni ME, Traboulsie A, Leoni AL, Couette B, Marger L, Le Quang K, Kupfer E, Cohen-Solal A, Vilar J, Shin HS, Escande D, Charpentier F, Nargeot J, Lory P. Bradycardia and slowing of the atrioventricular conduction in mice lacking CaV3.1/alpha1G T-type calcium channels. *Circ Res* 2006;**98**:1422-1430.
  34. Rodman DM, Harral J, Wu S, West J, Hoedt-Miller M, Reese KA, Fagan K. The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes. *Chest* 2005;**128**:581S-582S.
  35. Stevens T. Functional and molecular heterogeneity of pulmonary endothelial cells. *Proc Am Thorac Soc* 2011;**8**:453-457.

36. Cribbs L. T-type calcium channel expression and function in the diseased heart. *Channels (Austin)* 2010;**4**:447-452.
37. Cazade M, Bidaud I, Hansen PB, Lory P, Chemin J. 5,6-EET potently inhibits T-type calcium channels: implication in the regulation of the vascular tone. *Pflugers Arch* 2014.
38. Sommer N, Dietrich A, Schermuly RT, Ghofrani HA, Gudermann T, Schulz R, Seeger W, Grimminger F, Weissmann N. Regulation of hypoxic pulmonary vasoconstriction: basic mechanisms. *Eur Respir J* 2008;**32**:1639-1651.
39. Kraus RL, Li Y, Gregan Y, Gotter AL, Uebele VN, Fox SV, Doran SM, Barrow JC, Yang ZQ, Reger TS, Koblan KS, Renger JJ. In vitro characterization of T-type calcium channel antagonist TTA-A2 and in vivo effects on arousal in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 2010;**335**:409-417.
40. Francois A, Kerckhove N, Meleine M, Alloui A, Barrere C, Gelot A, Uebele VN, Renger JJ, Eschaliere A, Ardid D, Bourinet E. State-dependent properties of a new T-type calcium channel blocker enhance Ca(V)3.2 selectivity and support analgesic effects. *Pain* 2013;**154**:283-293.
41. Bjorling K, Morita H, Olsen MF, Prodan A, Hansen PB, Lory P, Holstein-Rathlou NH, Jensen LJ. Myogenic tone is impaired at low arterial pressure in mice deficient in the low-voltage-activated CaV 3.1 T-type Ca(2+) channel. *Acta Physiol (Oxf)* 2013;**207**:709-720.
42. Heady TN, Gomora JC, Macdonald TL, Perez-Reyes E. Molecular pharmacology of T-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Jpn J Pharmacol* 2001;**85**:339-350.
43. Gackiere F, Bidaux G, Lory P, Prevarskaya N, Mariot P. A role for voltage gated T-type calcium channels in mediating "capacitative" calcium entry? *Cell Calcium* 2006;**39**:357-366.
44. Chevalier M, Mironneau C, Macrez N, Quignard JF. Intracellular Ca(2+) oscillations induced by over-expressed Ca(V)3.1 T-type Ca(2+) channels in NG108-15 cells. *Cell Calcium* 2008;**44**:592-603.
45. Kuo IY, Howitt L, Sandow SL, McFarlane A, Hansen PB, Hill CE. Role of T-type channels in vasomotor function: team player or chameleon? *Pflugers Arch* 2014;**466**:767-779.







**Fig 2**

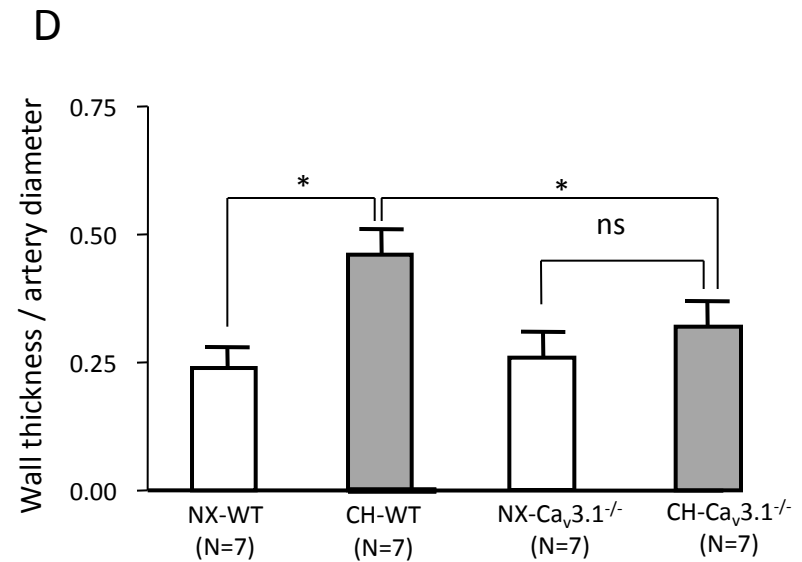
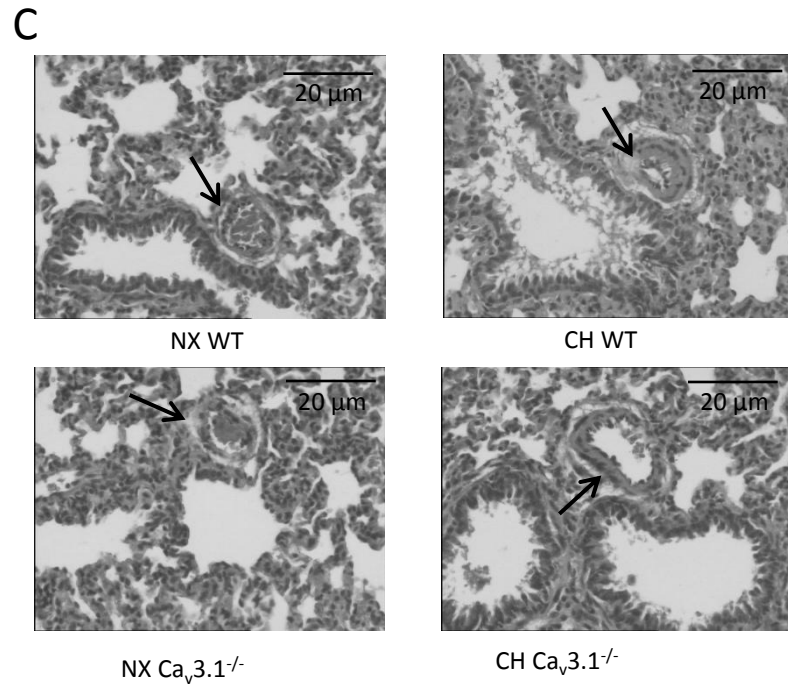
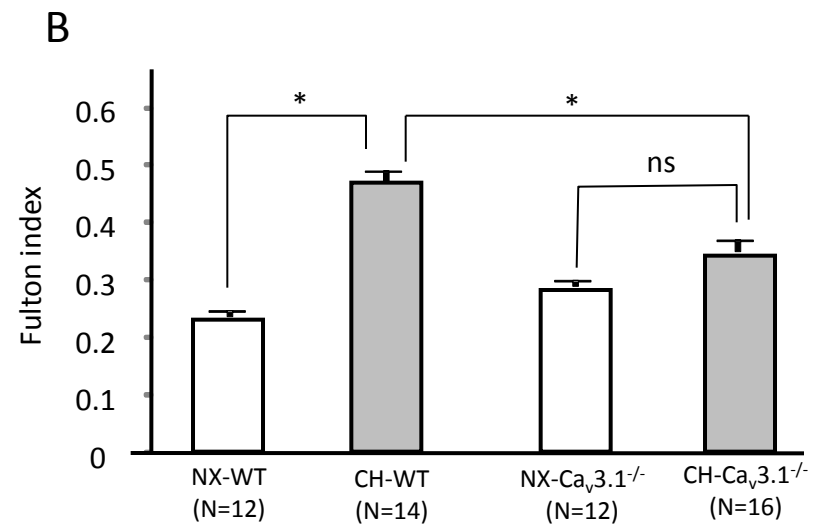
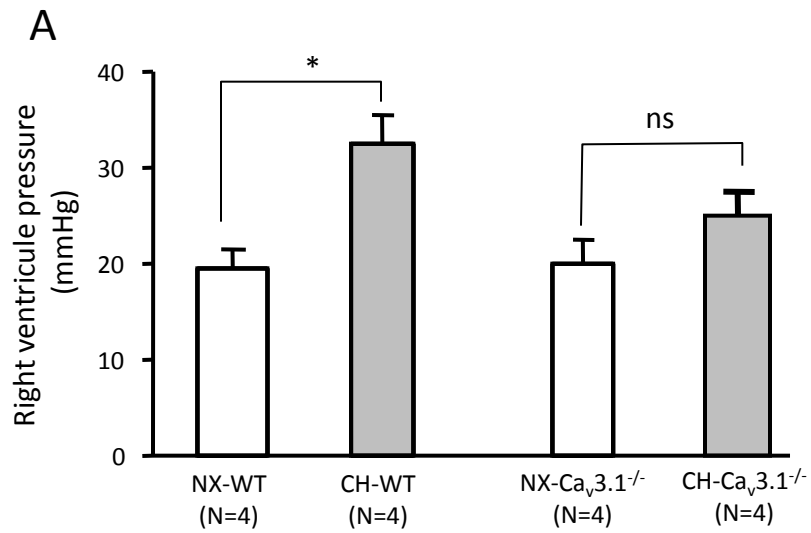


Fig 3

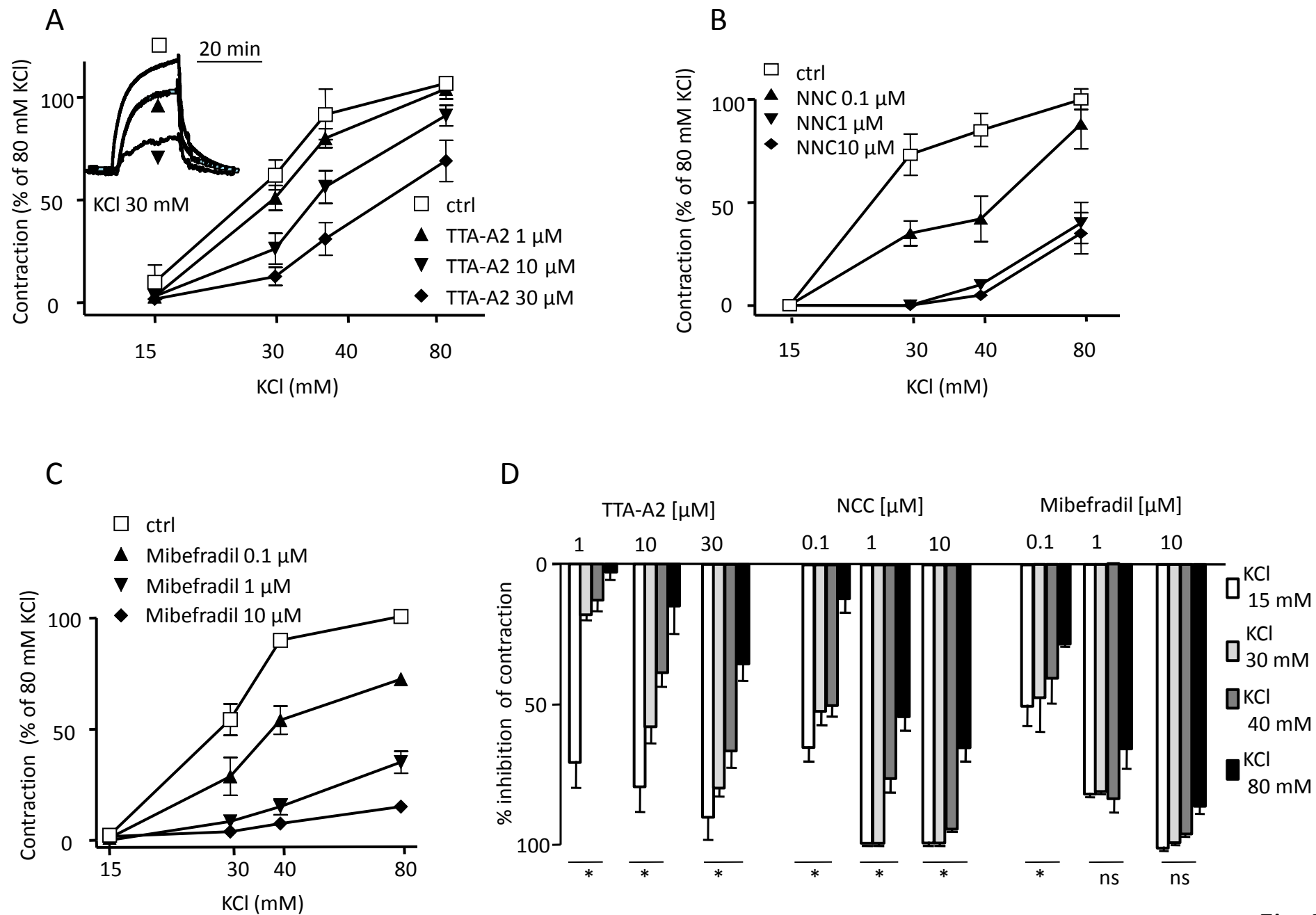


Fig 4

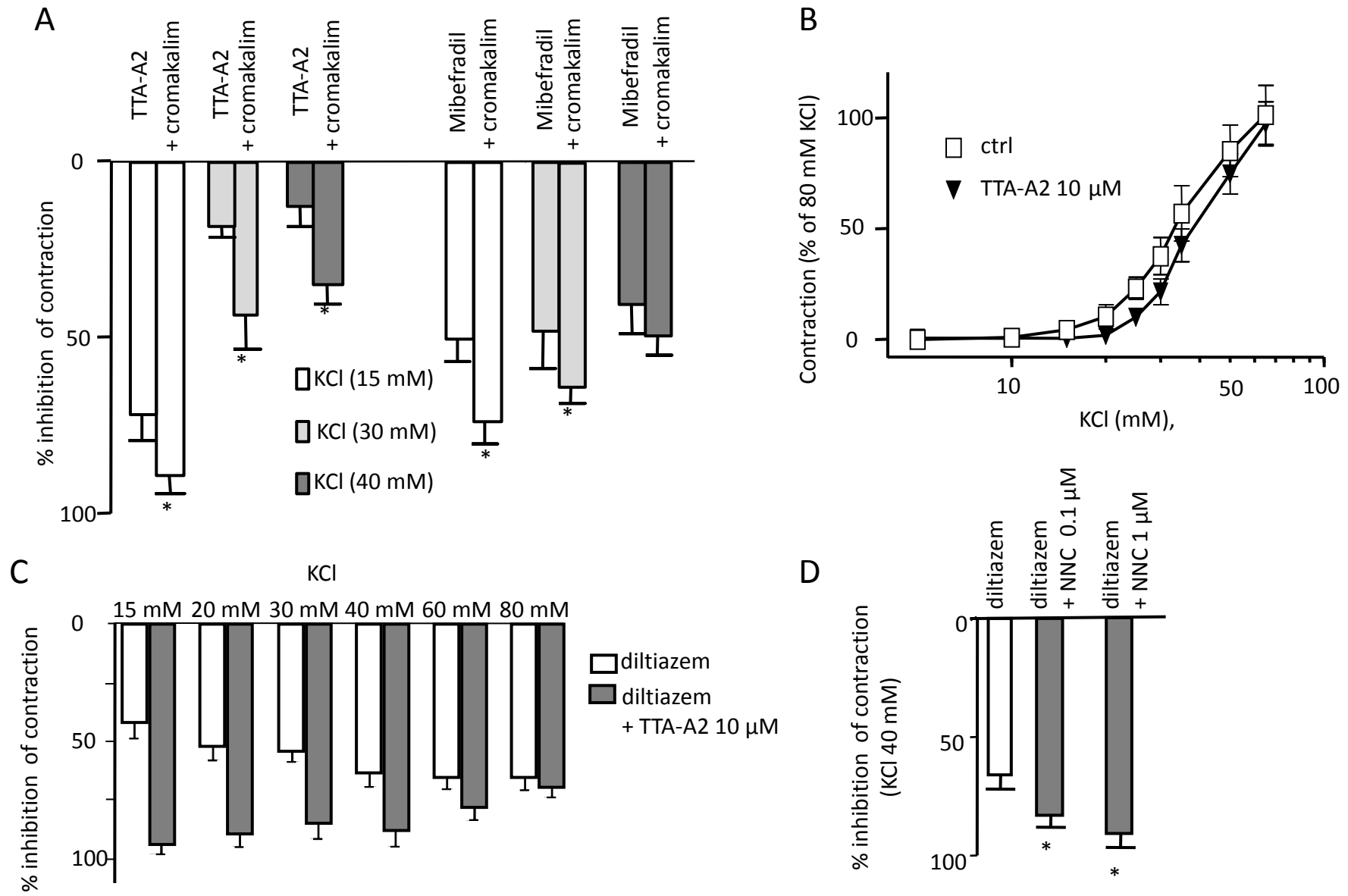
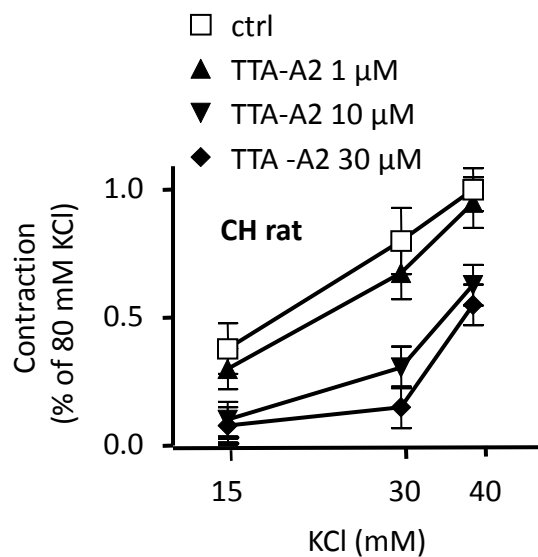
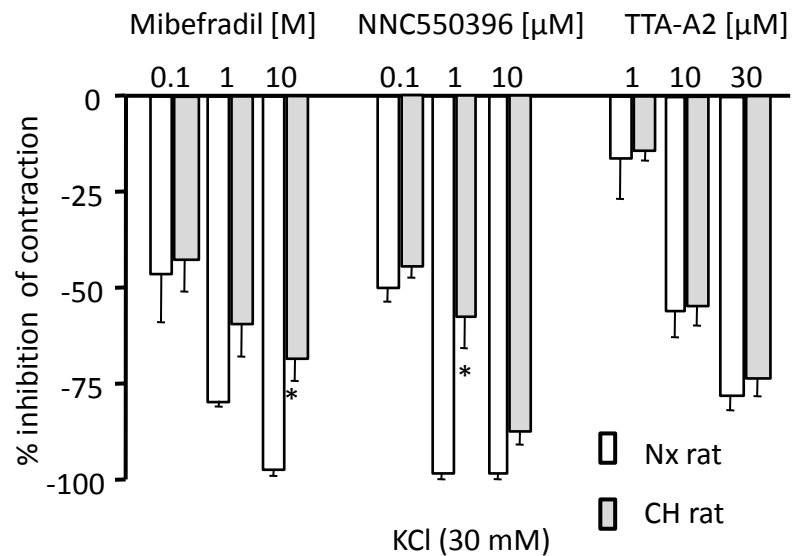


Fig 5

A



B



C

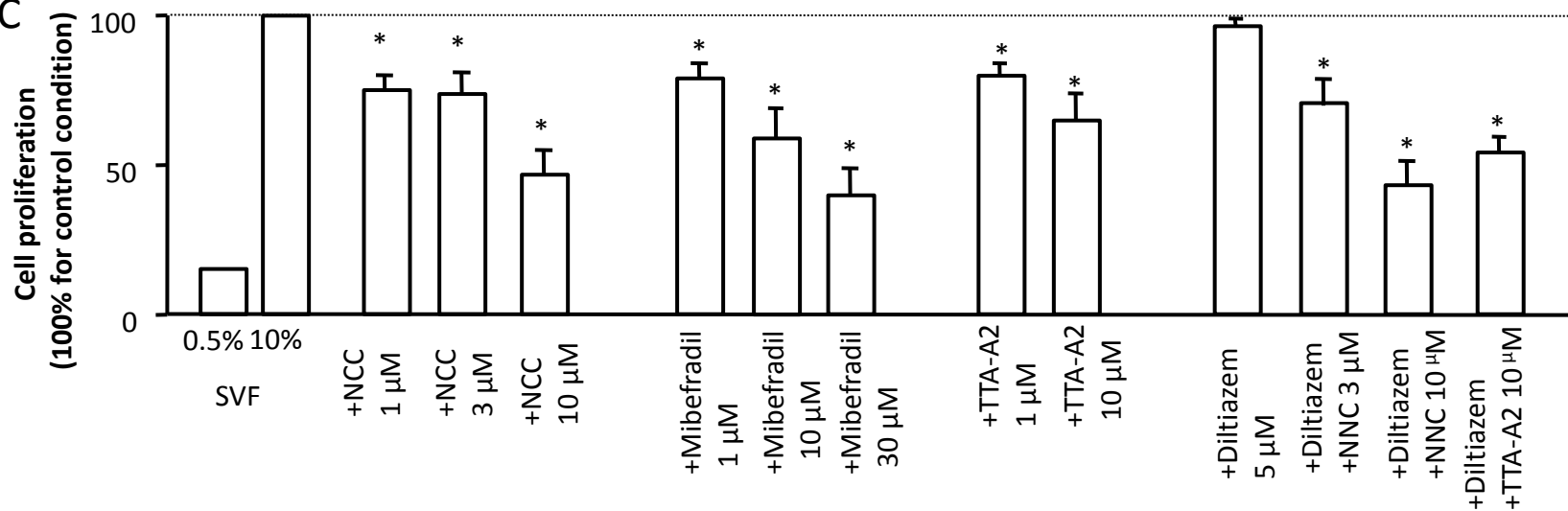


Fig 6

## **Les voies de signalisations calciques impliquées dans la réponse à l'étirement au niveau des artères intrapulmonaires. Implication dans l'hypertension pulmonaire.**

**Résumé :** L'hypertension pulmonaire (HTP) est la principale pathologie de la circulation pulmonaire. Elle se caractérise par une augmentation maintenue de la pression dans les artères intrapulmonaires (AIP) (> à 25 mmHg au repos). Cette pression exerce des forces d'étirement au niveau des cellules musculaires lisses des artères intrapulmonaires (CML d'AIP). Au niveau des CML, des canaux mécanosensibles appelés des SAC (« stretch-activated channels ») permettent de transformer un stimulus mécanique d'étirement en une réponse biologique de contraction : c'est le tonus myogénique. Le  $\text{Ca}^{2+}$  est un second messager cellulaire qui peut être aussi bien mobilisé depuis le milieu extracellulaire que depuis les réserves calciques intracellulaires. Une augmentation de sa concentration cytoplasmique induit la contraction des CML. Grâce à des techniques de patch-clamp, de microspectrofluorimétrie, d'immunomarquages et à une approche pharmacologique, nous avons mis en évidence les voies de signalisations calciques qui sont mises en place à la suite d'un étirement des CML d'AIP. Les expériences ont été réalisées à la fois chez des rats normaux et sur deux modèles de rats présentant une HTP (rats hypoxique chroniques et rats monocrotalines). Les résultats montrent que chez les rats normaux un étirement induit un influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les SAC. Cet influx calcique est amplifié par (1) une hyperpolarisation de la membrane plasmique via l'activation de canaux  $\text{BK}_{\text{Ca}}$ , (2) une sortie de  $\text{Ca}^{2+}$  par les récepteurs à la ryanodine de type 1 (RyR1) du réticulum sarcoplasmique (RS) sous-membranaire. Afin de rétablir l'homéostasie calcique, les mitochondries tamponnent le  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique. Chez les rats souffrant d'HTP, l'influx de  $\text{Ca}^{2+}$  par les SAC et l'amplification calcique par les RyR sont plus importants. Cette amplification est due à une réorganisation des réserves calciques intracellulaires, notamment chez les rats monocrotalines. De plus, une association fonctionnelle entre les réserves calciques du RS et les cavéoles conduit à des réponses calciques plus importantes après un étirement chez les rats HTP. Enfin, nous avons mis en évidence la présence de canaux mécanosensibles Piezo1 dans les AIP de rats. En conclusion, l'organisation spatiale des partenaires calciques au sein des CML d'AIP est importante pour la signalisation cellulaire et joue un rôle majeur dans l'HTP.

**Mots clés :** Hypertension pulmonaire, stretch,  $\text{Ca}^{2+}$ , récepteur à la ryanodine, caveolae.

---

## **$\text{Ca}^{2+}$ signaling pathways involved in response to stretch in pulmonary arteries. Implication in pulmonary hypertension.**

**Abstract:** Pulmonary hypertension (PH) is the main disease of the pulmonary circulation. This pathology is characterized by an increase of the intrapulmonary arterial (PA) pressure at rest (> 25 mmHg). This pressure exerts stretch forces on pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). Stretch-activated channels (SAC) are present in PASMC and are able to transform a mechanical stimulus of stretch into a biological response of contraction, a phenomenon called myogenic tone.  $\text{Ca}^{2+}$  is a second messenger that can be mobilized from both the extracellular medium and intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. An increase of the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) leads to PASMC contraction. Using patch-clamp, microspectrofluorimetry, immunostainings and a pharmacological approach, we highlight  $\text{Ca}^{2+}$  signaling pathways induced by stretch in PASMC. Experiments were performed in normal rats and in two models of PH (chronically hypoxic rats and monocrotaline rats). We showed that in normal rats a stretch induces a  $\text{Ca}^{2+}$  influx through SAC which is amplified by (1) a plasma membrane hyperpolarization by  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  channels and (2) a  $\text{Ca}^{2+}$  amplification by subplasmalemmal ryanodine receptor 1 (RyR) of the sarcoplasmic reticulum (SR). Besides, mitochondria are involved in buffering cytoplasmic  $\text{Ca}^{2+}$ . In PH rats, the  $\text{Ca}^{2+}$  influx by SAC and the  $\text{Ca}^{2+}$  release by RyR are enhanced due to a reorganization of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  stores. Furthermore, a functional association between SR and caveolae conduce to a much greater amplification of the stretch-induced  $\text{Ca}^{2+}$  increase in PH rats. Finally, we showed that the mechanosensitive channel Piezo1 is expressed in PA. To conclude, the spatial organization of  $\text{Ca}^{2+}$  stores in PASMC is important for cell signaling and plays a casual role in PH.

**Key words:** pulmonary hypertension, stretch,  $\text{Ca}^{2+}$ , ryanodine receptor, caveolae.