



HAL
open science

Rôle de la sérotonine et de la connexine 43 dans la paroi artérielle pulmonaire : implications dans l'hypertension pulmonaire

Nafiisha Khoyarattee

► To cite this version:

Nafiisha Khoyarattee. Rôle de la sérotonine et de la connexine 43 dans la paroi artérielle pulmonaire : implications dans l'hypertension pulmonaire. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0338 . tel-01152626

HAL Id: tel-01152626

<https://theses.hal.science/tel-01152626>

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 DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

Soutenue le 12 Décembre 2014

Par

Nafiisha KHOYRATTEE

Née le 02 Avril 1985 à Ile Maurice

**RÔLE DE LA SÉROTONINE ET DE LA CONNEXINE 43 DANS LA
PAROI ARTÉRIELLE PULMONAIRE : IMPLICATIONS DANS
L'HYPERTENSION PULMONAIRE**

Sous la direction du : Dr. Christelle GUIBERT

(Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045)

Membres du Jury:

Mme AMÉDÉE Joëlle	Directeur de recherche, INSERM, Bordeaux	Président
M. GUIGNABERT Christophe	Chargé de recherche, INSERM, Paris Sud	Rapporteur
M. ANDRIANTSITOHAINA Ramaroson	Directeur de recherche, INSERM, Angers	Rapporteur
Mme GUIBERT Christelle	Chargé de recherche, INSERM, Bordeaux	Directeur de Thèse

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

**ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE
ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE**

**Soutenue le 12 Décembre 2014
Par
Nafiisha KHOYRATTEE
Née le 02 Avril 1985 à Ile Maurice**

**RÔLE DE LA SÉROTONINE ET DE LA
CONNEXINE 43 DANS LA PAROI ARTÉRIELLE
PULMONAIRE : IMPLICATIONS DANS
L'HYPERTENSION PULMONAIRE**

**Sous la direction du : Dr. Christelle GUIBERT
(Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045)**

Membres du Jury :

Mme AMÉDÉE Joëlle

M. GUIGNABERT Christophe

M. ANDRIANTSITOHAINA Ramaroson

Mme GUIBERT Christelle

Directeur de recherche, INSERM, Bordeaux Président

Chargé de recherche, INSERM, Paris Sud Rapporteur

Directeur de recherche, INSERM, Angers Rapporteur

Chargé de recherche, INSERM, Bordeaux Directeur de Thèse

Rôle de la sérotonine et de la connexine 43 dans la paroi artérielle pulmonaire : implications dans l'hypertension pulmonaire.

Au niveau des artères intrapulmonaires (AIP) de rats sains, la connexine 43 (Cx43) située au niveau de la jonction myoendothéliale (JME) intervient dans la réactivité à la 5-HT. La 5-HT produit de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) au niveau du muscle lisse et du monoxyde d'azote (NO) au niveau de l'endothélium des AIP. La Cx43 permet alors le passage de l' $O_2^{\cdot-}$ du muscle lisse vers l'endothélium de façon à diminuer la biodisponibilité du NO et maintenir une contraction physiologique de l'artère pulmonaire. Cependant, l'augmentation d' $O_2^{\cdot-}$ par d'autres agonistes vasoconstricteurs tels que l'endothéline-1 (ET-1) et la phényléphrine (PHE) et les mécanismes impliqués dans cette augmentation restent encore méconnus dans la circulation pulmonaire. Ainsi, ce travail vise à identifier les agonistes qui provoquent une augmentation de la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ et à mettre en évidence les voies de signalisation mises en jeu au niveau des AIP de rats. Par ailleurs, la Cx43 étant impliquée dans la réactivité des AIP de rats sains à la 5-HT, le rôle de la Cx43 dans la circulation pulmonaire pathologique a été étudié à l'aide d'un modèle de souris hétérozygote pour la Cx43 (souris Cx43^{+/-}) souffrant d'hypertension pulmonaire (HTP) hypoxique chronique (HC). Nous avons montré que l'augmentation d' $O_2^{\cdot-}$ au niveau des AIP est un mécanisme exclusif de la 5-HT. Cette augmentation provient uniquement d'une augmentation de production par la mitochondrie et les NADPH oxydases *via* un mécanisme de « ROS-induced ROS release » dépendant de la PKC ϵ . La 5-HT agit par le biais des récepteurs 5-HT_{2A}, induit un influx calcique extracellulaire qui augmente la concentration calcique mitochondriale provoquant une augmentation de production d' $O_2^{\cdot-}$ par le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. De plus, cette voie s'exerce au sein des microdomaines de signalisation, notamment les cavéoles. D'autre part, chez les souris Cx43^{+/-} HTP HC le remodelage des AIP est inhibé et l'hypertrophie ventriculaire droite est freinée. La vasoréactivité des AIP à la 5-HT, à l'ET-1 et à la PHE est modifiée chez les souris Cx43^{+/-} saines et HTP HC par rapport aux souris sauvages. Ces données apportent (1) des éléments de compréhension sur les voies de signalisation mises en jeu dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à la 5-HT dans la circulation pulmonaire de rats sains et (2) de connaissances nouvelles sur le rôle de la Cx43 dans les AIP de souris saines et souffrant d'HTP HC.

Mots clés : circulation pulmonaire, connexine 43, sérotonine, anion superoxyde, hypertension pulmonaire, hypoxie chronique

Role of serotonin and connexin 43 in the pulmonary arterial wall: implications in pulmonary hypertension.

Under physiological conditions, in rat intrapulmonary arteries (IPA), connexin 43 (Cx43) localised at the myoendothelial junctions is involved in the reactivity to serotonin (5-HT). 5-HT increases superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) in the smooth muscle and nitric oxide (a vasodilator) in the endothelium. $O_2^{\cdot-}$ will then rapidly pass through Cx43 to scavenge endothelial NO to decrease the bioavailability of the latter and hence maintain IPA contraction in physiological conditions. However, to date, the increase in $O_2^{\cdot-}$ level by other contractile agonists such as endothelin-1 (ET-1) and phenylephrine (PHE) and the mechanism involved in this increase are still unknown in the pulmonary circulation. The goal of this present work is to identify the contractile agonists involved in the increase of $O_2^{\cdot-}$ and to highlight the signaling pathways involved in the agonists-induced increase of $O_2^{\cdot-}$. As Cx43 plays an important role in IPA contractile reactivity to 5-HT in healthy rats, the role of Cx43 under pathological conditions of the pulmonary circulation has been studied with a mice model heterozygous for Cx43 (Cx43^{+/-}) suffering from hypoxic pulmonary hypertension (HPH). We have shown that $O_2^{\cdot-}$ increase in rat IPA is exclusive to 5-HT. 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase in rat IPA is only from an increase in production by the mitochondria and NADPH oxydase *via* a ROS-induced ROS release mechanism dependent on PKC ϵ . Upon binding to 5-HT_{2A} receptors, 5-HT induces an extracellular calcium influx which is responsible for an increase in mitochondrial calcium level and causes an upregulation in $O_2^{\cdot-}$ production by the complex I of the mitochondrial respiratory chain. Moreover, this signaling pathway takes place in specialized microdomains, namely caveolae. On the other hand, interestingly, in Cx43^{+/-} HPH mice, IPA remodeling is inhibited and right ventricular hypertrophy is less intense. IPA vasoreactivity to 5-HT, ET-1 and PHE is modified in Cx43^{+/-} healthy and HPH mice as compared to wild type mice. These data bring (1) new elements of comprehension in the signaling pathways involved in 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production in healthy rat pulmonary circulation and (2) new insights on the role of Cx43 in mice IPA under physiological and HPH conditions.

Keywords: pulmonary circulation, connexin 43, serotonin, superoxide anion, pulmonary hypertension, chronic hypoxia.

À mes parents,

À ma famille,

SOMMAIRE

SOMMAIRE	i
REMERCIEMENTS	vii
LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET FORMATIONS	xiii
LISTE DES FIGURES	xix
LISTE DES TABLEAUX	xxv
LISTE DES ABREVIATIONS	xxix
PREFACE	xxxv
INTRODUCTION	1
I. LA CIRCULATION PULMONAIRE : ORGANISATION ANATOMIQUE	1
I.1 Généralités : Physiologie	1
I.2 Architecture du système vasculaire pulmonaire	2
I.3 La vasoconstriction hypoxique pulmonaire	2
I.4 Organisation tissulaire de la paroi artérielle pulmonaire	4
I.4.1 L'intima	4
I.4.2 La média	5
I.4.3 L'adventice	5
I.5 Les cellules musculaires lisses (CML)	6
I.5.1 Mécanisme de contraction des CML	7
I.5.2 Les voies d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ dans les CML vasculaires pulmonaires	9
II. L'HYPERTENSION PULMONAIRE	12
II.1 Définition et classification clinique de l'hypertension pulmonaire	12
II.2 Hypertension pulmonaire de groupe 3 (Hypoxique Chronique)	15
II.2.1 Modèle expérimental : rat/souris hypoxique chronique (HC)	16
III. LES MEDIEURS VASOCONSTRICTEURS DE LA CIRCULATION PULMONAIRE	18
III.1 Sérotonine (5-HT)	18
III.1.1 Synthèse et sécrétion	18
III.1.2 Les récepteurs à la 5-HT	20
III.1.3 Rôles physiologiques de la 5-HT	23
III.1.3.1 Vasoconstriction	23
III.1.3.2 Vasorelaxation	24
III.1.4 Le transporteur de la 5-HT (le 5-HTT)	25
III.1.4.1 Rôle du 5-HTT au niveau des artères pulmonaires	26
III.1.5 5-HT et pathologie de la circulation pulmonaire	26
III.1.5.1 5-HT et Hypertension pulmonaire (HTP)	26
III.2 Endothéline-1	28
III.2.1 Synthèse et sécrétion de l'ET-1	28
III.2.2 Les récepteurs à l'ET-1	30
III.2.3 Rôles physiologiques de l'ET-1	30
III.2.3.1 Contraction cellulaire	30
III.2.3.2 Prolifération des CML vasculaires	31

III.2.4	ET-1 et hypertension pulmonaire (HTP) de groupe 3	32
III.3	Agonistes adrénergiques	33
III.3.1	Synthèse et sécrétion	33
III.3.2	Les récepteurs adrénergiques	34
III.3.2.1	Les récepteurs α -adrénergiques (α -AR)	34
III.3.3	Les récepteurs β -adrénergiques (β -AR)	38
IV.	LES ESPECES REACTIVES DERIVEES DE L'OXYGENE (ERO)	39
IV.1	Définition des ERO	39
IV.2	Rôles biologiques des ERO	40
IV.3	L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$)	40
IV.4	Les sources de production d' $O_2^{\bullet-}$	42
IV.4.1	Les NADPH Oxydases (NOX)	42
IV.4.1.1	Le devenir de l' $O_2^{\bullet-}$ produit par les NOX	45
IV.4.1.2	Les protéines candidates pour le transport des ERO à travers la membrane plasmique	45
IV.4.2	La chaîne respiratoire mitochondriale	46
IV.4.2.1	Mitochondrie, calcium et $O_2^{\bullet-}$	50
IV.4.2.2	Ca^{2+} mitochondrial et vasoconstriction	50
IV.4.2.3	La signalisation calcique mitochondriale	51
IV.4.3	La xanthine oxydase	52
IV.4.4	Expression de la XO dans la paroi vasculaire pulmonaire	53
IV.4.5	La NO synthase (NOS) et $O_2^{\bullet-}$: NOS découplée	54
IV.5	Dégradation des ERO	55
IV.6	Implications physiologiques et physiopathologiques de l' $O_2^{\bullet-}$ au niveau vasculaire systémique et pulmonaire	58
IV.6.1	Rôles physiologiques des ERO	58
IV.6.1.1	$O_2^{\bullet-}$ et la vasoconstriction des CML	58
IV.6.2	$O_2^{\bullet-}$ et pathologies vasculaires systémiques et pulmonaires	58
IV.6.2.1	Pathologies métaboliques de la circulation systémique : diabète et athérosclérose	59
IV.6.2.2	Hypertension pulmonaire (HTP) hypoxique chronique (de groupe 3)	59
V.	MICRODOMAINES DE SIGNALISATION : CAVEOLES	61
V.1	Définition d'un microdomaine de signalisation	61
V.1.1	Les cavéoles : structure	61
V.1.1.1	Les cavéolines	62
V.1.2	Rôle des Cav-1 dans la paroi artérielle	63
V.1.2.1	Le contrôle de la réactivité vasculaire	63
V.1.2.2	La signalisation redox	65
V.1.3	Rôle des cavéoles dans la physiopathologie cardiovasculaire	65
V.1.3.1	Athérosclérose	65
V.1.4	Hypertension pulmonaire	65
VI.	LES JONCTIONS COMMUNICANTES OU JONCTIONS GAP	67
VI.1	Jonctions communicantes	67
VI.1.1	Découverte	67

VI.1.2	Structure.....	67
VI.1.3	Nomenclature.....	69
VI.2	Composantes moléculaires des jonctions gap.....	69
VI.2.1	La famille multigénique des connexines.....	69
VI.2.2	La topologie des connexines.....	70
VI.2.3	Expression tissulaire des Cx.....	72
VI.2.4	Le cycle de vie des connexines.....	72
VI.2.4.1	Biosynthèse et oligomérisation des Cx.....	73
VI.2.4.2	Transport et adressage membranaire.....	74
VI.2.4.3	Dégradation des jonctions gap internalisées.....	75
VI.2.5	La régulation de la communication intercellulaire.....	77
VI.2.5.1	Phosphorylation des Cx.....	77
VI.2.5.2	Autres régulations des Cx.....	78
VI.2.6	Propriétés physiologiques des jonctions communicantes.....	80
VI.2.6.1	Couplage électrique.....	80
VI.2.6.2	Couplage métabolique.....	81
VI.2.6.3	Connexine et développement embryonnaire.....	81
VI.3	Les jonctions communicantes dans la paroi vasculaire.....	82
VI.3.1	Au niveau du système vasculaire.....	82
VI.3.1.1	Isoformes exprimées.....	82
VI.3.2	La jonction myoendothéliale (JME).....	82
VI.3.2.1	La jonction myoendothéliale et l'EDHF.....	84
VI.3.2.2	Cavéoles, JME et EDHF.....	86
VI.4	Jonctions communicantes et pathologies vasculaires.....	86
VI.4.1	Athérosclérose.....	86
VI.4.2	Hypertension pulmonaire.....	87
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....		89
I.	MATERIEL BIOLOGIQUE.....	91
I.1	Animaux.....	91
I.1.1	Groupes contrôles.....	91
I.1.2	Souris déficientes pour la Cx 43 (Cx 43 ^{+/-}).....	91
I.1.3	Modèles animaux d'hypertension pulmonaire de groupe 3 : hypoxique chronique (HC)....	91
I.2	Préparation du matériel biologique.....	92
I.2.1	Artères intrapulmonaires (AIP).....	93
I.2.2	Cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires de rat.....	94
I.2.3	Culture cellulaire.....	95
II.	MESURE SIMULTANEE DU CALCIUM MITOCHONDRIAL ET CYTOSOLIQUE.....	96
II.1	Protocole expérimental.....	96
II.1.1	Fluo-4.....	96
II.1.2	Rhod-2.....	97
II.1.3	TMRM.....	97
II.2	Dispositif expérimental : imagerie calcique par microscopie confocale.....	98
II.3	Analyse des résultats.....	98

III.	RESPIRATION MITOCHONDRIALE.....	100
III.1	Mise en suspension des CML d'AIP.....	100
III.2	Dispositif expérimental : Oxygraphie.....	100
III.3	Analyse des résultats.....	100
IV.	IMMUNOFLUORESCENCE.....	101
IV.1	Fixation.....	101
IV.2	Protocole expérimental.....	101
IV.2.1	Immunofluorescence sur coupes d'AIP.....	101
IV.2.1.1	Extinction de l'immunofluorescence des lames élastiques.....	101
IV.2.1.2	Perméabilisation membranaire et blocage.....	101
IV.2.1.3	Incubation avec les anticorps.....	101
IV.2.1.4	Montage.....	102
IV.2.2	Co-immunomarquage « en face » sur AIP entière.....	102
IV.3	Visualisation : microscope confocal.....	103
V.	MESURE DE LA CONTRACTION ISOMÉTRIQUE.....	104
V.1	Dispositif expérimental.....	104
V.2	Protocole expérimental.....	105
VI.	RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE DES ÉLECTRONS (RPE).....	106
VI.1	Principe.....	106
VI.2	Effet de Zeeman.....	106
VI.3	Effet de résonance.....	107
VI.4	Utilisation de piègeur de « spin » : « Spin trapping ».....	108
VI.5	«Spin probes ».....	108
VI.6	Dispositif expérimental.....	109
VI.7	Spectres d'absorption.....	110
VI.8	Mesure de l'O ₂ ^{•-}	111
VI.8.1	Préparation des échantillons.....	111
VI.8.2	Rôles du DETC et de la déféroxamine.....	112
VI.8.3	Dosage de protéines : protocole expérimental.....	112
VI.9	Analyse des résultats.....	112
VII.	MESURE DES PEROXYNITRITES (ONOO ⁻).....	113
VII.1	Principe du kit de Griess.....	113
VII.2	Préparation de l'homogénat de tissu.....	114
VII.3	Expression des résultats.....	114
VIII.	MESURE DE L'ACTIVITE DES SUPEROXYDE DISMUTASES (SOD).....	115
VIII.1	Principe du kit « SOD Assay Kit-WST ».....	115
VIII.2	Préparation de l'homogénat de tissu.....	115
VIII.3	Expression des résultats.....	115
IX.	DOSAGE DE PROTEINES : PRINCIPE DE LOWRY.....	117
IX.1	Méthode de dosage.....	117
X.	GÉNOTYPAGE.....	118

X.1	Extraction d'ADN	118
X.2	Polymerase Chain Reaction (PCR)	118
X.3	Analyse des résultats.....	119
XI.	MYOGRAPHE : ÉTUDE DE LA CONTRACTION ISOMETRIQUE CHEZ LA SOURIS	120
XI.1	Dispositif expérimental.....	120
XI.2	Protocole expérimental	120
XII.	IMMUNOHISTOLOGIE	122
XII.1	Fixation	122
XII.2	Inclusion et coupe au microtome.....	122
XII.3	Coloration hématoxyline – éosine	122
XII.4	Analyse des résultats.....	123
XIII.	WESTERN BLOT	124
XIII.1	Extraction des protéines	124
XIII.2	Électrophorèse.....	124
XIII.3	Analyse des résultats.....	125
XIV.	ANALYSE STATISTIQUE DES RÉSULTATS	126
	OBJECTIFS DE LA THESE.....	127
	RESULTATS ET DISCUSSION	130
I.	VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA PRODUCTION D'O ₂ ⁻ EN REPONSE A LA SEROTONINE ..	
	132
I.1	Objectifs.....	132
I.2	Résultats.....	132
I.3	Conclusion	167
II.	EFFETS DE L'ET-1 ET DE LA PHE SUR LA QUANTITE D'O ₂ ⁻ DANS LES AIP DE RAT	168
II.1	Résultats.....	168
II.2	Discussion	177
II.3	Conclusion	178
II.4	Perspectives	178
III.	ROLE DE LA Cx43 DANS LA PAROI ARTERIELLE PULMONAIRE DE SOURIS : IMPLICATIONS DANS L'HTP HYPOXIQUE CHRONIQUE	179
III.1	Résultats.....	179
III.2	Discussion	193
III.3	Conclusion	196
	CONCLUSION GENERALE	198
	BIBLIOGRAPHIE	202
	ANNEXE.....	240

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse représente l'accomplissement de trois années de travail mais aussi le travail final de ces dix années vécues en France loin de ma famille. Cette aventure de thèse a été une expérience enrichissante tant scientifiquement qu'humainement à travers toutes les rencontres que j'ai été amenée à faire. Ainsi, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont soutenue de près et de loin pour mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier, dans un premier temps, ma directrice de thèse le **Docteur Christelle Guibert** pour m'avoir initiée il y a quatre ans au monde de la recherche. Cette première expérience de deux mois en 2010 au sein du LPCR a été déterminante pour ma carrière scientifique parce qu'elle a confirmé mon désir de poursuivre une thèse en biologie. Je te remercie pour ta disponibilité, ta patience, tes conseils, tes encouragements et ton soutien qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Je te remercie également pour toute la liberté, l'autonomie et la confiance que tu m'as accordées pour les encadrements de stage des étudiants en Master 1. J'espère avoir été à la hauteur de tes exigences.

Je remercie profondément le **Professeur Roger Marthan** de m'avoir accueillie au sein du LPCR il y a quatre ans et de m'avoir permis de poursuivre en thèse au sein du CRCTB. Je vous remercie pour vos encouragements, votre soutien, votre bonne humeur et votre disponibilité. Je vous exprime toute ma reconnaissance pour avoir pris le temps de m'écouter lorsque je frappais à votre porte.

Je remercie également le **Professeur Jean-Pierre Savineau** de m'avoir accueillie au sein de l'équipe Physiopathologie vasculaire pulmonaire du laboratoire. Vos conseils, vos encouragements et votre soutien m'ont permis de mener à bien ce travail.

Je tiens à remercier les membres de mon Jury de thèse pour avoir accepté de juger mon travail :

Au **Docteur Joëlle Amédée**, je vous remercie d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. Je vous remercie également de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire pour l'utilisation de votre cryostat.

Au **Docteur Christophe Guignabert**, je vous remercie d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Je vous remercie également pour vos encouragements lors de notre dernière rencontre au congrès J2R de Bordeaux.

Au **Docteur Ramaroson Andriantsitohaina**, je vous suis reconnaissante d'avoir accepté d'être présent à ce jury de thèse.

Je tiens également à remercier tous les **membres du laboratoire** avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui ont partagé mon quotidien au laboratoire. Thomas Ducret, je te remercie pour ta bonne humeur, ton sourire et tes encouragements. Jean François

Quignard, je te remercie pour toutes nos discussions scientifiques et tous tes conseils. Merci surtout pour ta bonne humeur.

Je voudrais remercier Huguette Crevel qui m'a accueillie dès le premier jour de mon arrivée. Merci Huguette pour cette formation au pH mètre. Je vous remercie pour vos encouragements, vos conseils, votre bonne humeur et surtout pour votre aide pour l'entretien des rats. A Claude Vincendeau, vous êtes mon rayon de soleil au laboratoire. Je vous remercie pour toutes ces longues discussions, pour votre gentillesse, pour m'avoir nourrie lors de cette fin d'écriture de thèse avec de la nourriture saine. Malgré la fatigue, votre présence m'a beaucoup aidée pour tenir la fin de l'écriture. Je vous suis profondément reconnaissante d'avoir accepté de relire mon manuscrit et de corriger les coquilles.

A Armelle, merci d'avoir pris soin de moi et d'avoir été à l'écoute de mes soucis pendant ces quatre années passées au laboratoire. Je te suis profondément reconnaissante d'avoir trouvé la solution de ma fin de thèse. A Lebna, je te remercie pour ta gentillesse, ton sourire et surtout pour nos discussions spirituelles. Merci pour les bonbons☺ et les MM's.

A Jennifer (Super Jennnnnn ou MM's addict), merci d'être présente parmi nous. Comme on le dit, tu es une rescapée de l'ancien groupe de filles (Imane, Diana et Annaïg) et je suis vraiment contente de partager mon quotidien avec toi au laboratoire. Merci pour ces courses de chaises, pour ces fous rires lorsqu'on analysait nos images de microscopie confocale, merci de m'avoir nourrie lorsque je n'avais rien prévu pour le repas du midi. Un gros merci pour ta disponibilité, nos discussions et tes encouragements. Merci à Arthur et Dorian pour leurs dessins et leurs sourires.

A Paul (Polo), merci pour ton optimisme et ta bonne humeur. Cela fut un réel plaisir de travailler avec toi.

Merci à Delphine et Frédéric pour vos encouragements et vos bons conseils. Delphine, je te remercie de m'avoir amené ma copine Cléa le soir. Sa petite bouille me redonnait le sourire lorsque cela n'allait pas forcément.

Merci à tous les membres de l'équipe bronche : Olga, Elise (Madame propre☺), Thomas Trian (le surfeur blond), Isabelle (la pro Picard) pour votre bonne humeur et votre gentillesse. Je remercie également Marilynne (l'hybride des deux équipes). Je te remercie pour ton sourire et aussi pour ton aide pour l'entretien de mes petites souris.

Merci à toute l'équipe Pharma : Magalie, merci pour ton aide pour les souris. Mathilde merci pour ta bonne humeur et surtout pour toutes nos discussions scientifiques. Véro, ce fut un réel plaisir de collaborer avec toi pour l'écriture de la revue. Arnaud (alias Arno), merci pour ta gentillesse, ton sourire et ta bonne humeur. Isabelle et Bernard merci pour votre bonne humeur. A Martine, merci d'avoir pris soin de moi lorsque je suis arrivée en Master 1

et de m'avoir trouvé une blouse XS et recousu la poche abimée. Ce geste m'avait beaucoup touchée (je n'ai plus jamais quitté cette blouse).

Je remercie également tous les lofteurs : Thibaud, le bisounours du loft ou le roi des Warhammer ☺. Merci pour ta gentillesse, toutes nos discussions scientifiques et de nous avoir fait découvrir le restaurant tibétain. On attend encore une soirée bouzouki ☺. Je suis sûre que tu vas briller pour cette fin de thèse, tu as toutes les qualités requises pour réussir. Je te souhaite tout le meilleur pour la suite. Florence, notre pharmacienne - fan de Diego ou de Chaouat ☺. Je suis sûre qu'avec la Diego-attitude tu as toutes les qualités pour réussir ta thèse. Merci pour ces séances shopping : repérages de chaussures ou de sacs ☺. Guillaume, ou Dr Gilbert ☺, j'ai eu la chance de partager mon quotidien avec toi au laboratoire depuis notre Master 1. Je te remercie pour ton amitié et pour toutes les fois où tu m'as remonté le moral lorsque je doutais. Merci pour les beaux tableaux que tu m'as faits et qui ont embelli les murs blancs autour de mon bureau. Merci pour les sorties cinés/restaurants « after lab ». Je suis sûre que l'on restera en contact.

A tous les anciens, Andrea (our Nespresso addict), Imane (notre duchesse de Somewhere) et Diana (la Coca-Cola addict), je vous remercie de votre amitié. Merci d'être restées en contact. Je vous remercie pour TOUT, les amis. Je suis sûre que nos chemins vont se croiser à nouveau. A Marie B, merci pour tes encouragements et ton aide outre-Atlantique. Ton manuscrit m'a servi d'inspiration, merci pour cet excellent travail. Annaïg, merci pour ta gentillesse.

A tous les étudiants que j'ai encadrés lors de ma thèse, à Guillaume Cardouat et Antonin Bourdieu, ce fut un réel plaisir de partager cette aventure avec vous. Je vous remercie pour votre motivation et votre bonne humeur. Je vous souhaite une bonne continuation dans vos thèses respectives. A Marine M, et Marie M, merci d'avoir pris plaisir à travailler sur mon projet de thèse. Marie je te souhaite bon courage pour ta suite en master 2 parmi nous. Céline S, merci pour ta joie, ta bonne humeur et les séances de zumba à l'acropole ☺.

Marthe, je te remercie pour ta bonne humeur et peut-être dans quelques années je viendrai te voir pour mes dents ☺. Virginie, je te remercie pour ta gentillesse et tous tes encouragements. Je te souhaite bon courage pour ta 3^{ème} année de thèse et je suis sûre que tu vas faire une très belle thèse. Elodie B, je te remercie pour tes encouragements et de nous avoir fait découvrir cette belle crêperie à Tours. Je te remercie aussi pour ces chocolats délicieux que tu nous faisais avec Etienne à Noël. Je suis sûre que tu seras une excellente maman ☺. A Gabrielle (ma colocatrice de chambre lors du congrès à Tours), merci pour ton dynamisme et ta spontanéité.

A toutes les personnes que j'ai rencontrées lors des congrès.

A Gaël, nos chemins se sont croisés à Marseille au printemps de la cardiologie et je suis très heureuse de te connaître. Je te remercie pour ton soutien, ta gentillesse, tes encouragements et surtout pour ta patience lors de cette fin de thèse.

A tous **mes amis**, Jenna, Janie, Sandy, Jaimie, Claire, Catherine (Princess Kate), Elisabeth, Malik, je vous remercie pour tout et surtout pour vos amitiés. Vous avez rendu mon quotidien en France plus joyeux. Je vous remercie d'avoir été toujours présents pour moi lorsque le mal du pays se faisait ressentir.

A **mes parents**, je vous remercie de m'avoir fait confiance durant ces dix années d'études à Bordeaux. Je te remercie papa de m'avoir donné l'occasion de poursuivre mes études en France et surtout de m'avoir poussée à faire plus, tu as toujours dit « learning is never ending, knowledge is ever lasting ». Merci maman de m'avoir encouragée et cru en moi durant toutes ces années. Le fruit de ce travail est en partie grâce à vos encouragements et votre soutien. Je vous suis profondément reconnaissante et je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi. Merci à mes sœurs et à mon frère (Nazreen, Najaah, Rushaa et Ismaail) et mes beaux-frères (Naweed, Tariiq et Ismaël) pour vos encouragements et surtout de m'avoir soutenue tout au long de mes études. A Sarah et Yusef, merci de me permettre de voir la vie à travers les yeux des enfants. A mes grands-parents, je vous remercie pour vos encouragements. A mon grand-père maternel, je suis sûre que tu aurais été fier de ta petite fille.

**LISTE DES
PUBLICATIONS,
COMMUNICATIONS ET
FORMATIONS**

- **Article**

Signalling pathways linked to serotonin-induced superoxide anion production: a new physiological role for mitochondria.

Nafiisha Khoyarattee, Marie Billaud, Rodrigue Rossignol, Jennifer Gillibert-Duplantier, Brant E. Isakson, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Christelle Guibert

En revision au journal *Cardiovascular research*

- **Revue**

Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension. (2014).

Freund-Michel, V., N. Khoyarattee, J. P. Savineau, B. Muller and C. Guibert

Int J Biochem Cell Biol

- **Communications affichées et orales**

1. BillaudM., KhoyaratteeN., MarthanR., SavineauJ.P., GuibertC. (2010)

Sources of superoxide anion produced by serotonin in intrapulmonary arteries from rats.

Revue des maladies Respiratoires, 2, 052, 33. – (Journées de Recherche Respiratoire, Nantes, France). Poster

2. BillaudM., KhoyaratteeN., MarthanR., SavineauJ.P., GuibertC. (2011)

Production of superoxide anion by serotonin in the vascular wall: characterization of different sources in rat intrapulmonary arteries.

Fundamental and Clinical Pharmacology, 25 (suppl 1), 34.7. – (P2T, Grenoble, France) – présentation orale

3. BillaudM., KhoyaratteeN., MarthanR., SavineauJ.P., GuibertC. (2011)

Sources of superoxide anion produced by serotonin in smooth muscle from rat intrapulmonary arteries.

Archives of cardiovascular diseases, (Suppl 2) 3,0171– (Printemps de la cardiologie, Lyon, France – mai 2011) Poster

4. Khoyrattee N., Marthan R., Savineau J.P., C. Guibert

Superoxide anion and gap junctions in agonists-induced pulmonary arterial contraction. *Archives of cardiovascular diseases, Vol 3 Special issue No.1, 68–* (Printemps de la cardiologie, Bordeaux, France – avril 2012) Poster

5. Khoyrattee N., Bourdieu A., Cardouat G., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C.(2012)

Signalling pathways involved in serotonin-induced production of superoxide anion in rat intrapulmonary arteries: Implication of myoendothelial junctions – (Journée Jeunes Chercheurs SFR TransBioMed, Bordeaux – juin 2012) –Poster - **Prix Poster**

6. Khoyrattee N., Bourdieu A., Cardouat G., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C.(2012)

Signalling pathways involved in serotonin-induced production of superoxide anion in rat intrapulmonary arteries

Revue des maladies respiratoires numéro spécial, (vol 4), 56 (Journées de recherche respiratoire, Lille, France), - octobre 2012 –Poster - **Prix Poster thème circulation**

7. Khoyrattee N., Billaud M., Bourdieu A., Cardouat G., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C.(2013)

Role of caveolae in agonists-induced pulmonary arterial contraction.

Archives of cardiovascular diseases-Vol 5 Special issue No.1, 176– (Printemps de la cardiologie, Marseille, France – avril 2013) Poster

8. Khoyrattee N., Billaud M., Bourdieu A., Cardouat G., Marthan R., Savineau J.P., Guibert C.(2013)

Signalling pathways involved in 5-HT-induced contraction dependent on connexine 43 and superoxide anion production in rat pulmonary arteries.

(International Union of Physiological Sciences (IUPS), Birmingham – UK – juillet 2013) – Poster (**Bourse de voyage obtenue de la société de physiologie britannique**).

9. Khoyrattee N., Billaud M., Marthan R., Savineau J.P., C. Guibert

Serotonin-induced production of superoxide anion in rat intrapulmonary arteries: a new physiological role for mitochondria.

Revue des maladies respiratoires numéro spécial – sous presse - (Journées de recherche respiratoire, Bordeaux, France, - octobre 2012) –Poster

10. BillaudM., Khoyrattee N., Marthan R., SavineauJ.P., GuibertC. (2011)

Signalling pathways involved in the superoxide anion production in response to serotonin in rat intrapulmonary arteries.

The Journal of Physiology (London), (Proc Physiol Soc 23) - (British Physiological Society, Oxford – UK – juillet 2011) Présentation orale (anglais)

11. Khoyrattee N., Billaud M., Marthan R., SavineauJ.P., GuibertC. (2013)

Connexins in pulmonary circulation and pulmonary hypertension. (CPC-Munich/INSERM Summer Retreat, Tours, France – septembre 2013) – présentation orale (anglais)

12. Khoyrattee N., Billaud M., Marthan R., SavineauJ.P., GuibertC. (2014)

Connexin 43 in pulmonary circulation (Lungstorming, organise par “GSK laboratories”, Fortenay-Trésigny, Paris, France – juin 2014) – Présentation orale

- **Formations**

1. Image J (Module 1 et Module 2): Initier à Image J pour illustration scientifique et quantification d'image avec Image J. *Bordeaux Imaging Centre (BIC). Intervenants : Sébastien Marais (Ingénieure) et Fabrice Cordelières (Ph.D.).*
2. Developing scientific survival skills for young scientists. Focus on writing (quality) papers. *Laboratoire de Bioingénierie Tissulaire (BioTis). Intervenants: Diego Mantovani (Visiting professor IdEX, university of Bordeaux – University LAVAL, Canada, Ph.D.).*

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation anatomique de l'appareil cardio-vasculaire.	1
Figure 2 : Représentation de l'arbre artériel pulmonaire de l'homme (A) et de rat (B).	2
Figure 3 : Mécanisme de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP).	3
Figure 4 : Représentation schématique de la paroi artérielle.	4
Figure 5 : Illustration histologique de poumon humain (A) vs. rat (B).	6
Figure 6 : Représentation de l'appareil contractile des CML.	7
Figure 7 : Protéines constituant l'appareil contractile des CML.	8
Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la contraction des CML : régulation de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC20).	9
Figure 9 : Récapitulation des voies d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ dans les CML artérielles pulmonaires.	11
Figure 10 : Expression de l' α -actine du muscle lisse (SMA) et d'un marqueur des CE (MECA pour « mouse endothelial cell antigen ») pendant la muscularisation des artérioles pulmonaires induite par l'hypoxie.	16
Figure 11 : Histopathologie de l'HTP hypoxique chez le rat (A) et chez la souris (B).	17
Figure 12 : Synthèse de la sérotonine (5-HT).	19
Figure 13 : Résumé des différents récepteurs à la 5-HT présents au niveau de la CML et de la CE des artères pulmonaires et systémiques.	25
Figure 14 : Différentes étapes de la biosynthèse de l'ET-1 et expression des récepteurs à l'ET-1.	29
Figure 15 : Synthèse de la norépinéphrine/noradrénaline et de l'épinéphrine/adrénaline.	33
Figure 16 : Structures chimiques des agonistes α -AR.	35
Figure 17 : L'hypoxie augmente l'expression des α_1 -AR.	36
Figure 18 : Résumé des différentes espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) de nature radicalaire et non radicalaire.	40
Figure 19 : Schéma de la réduction complète de l' O_2 en H_2O : synthèse des ERO.	41
Figure 20 : Représentation schématique des composantes de NOX2, NOX1 et NOX4.	43
Figure 21 : Expression des différentes isoformes des NOX au niveau des trois types cellulaires des vaisseaux pulmonaires.	44

Figure 22: Production mitochondriale d'équivalents réduits (NADH et FADH ₂) à partir de l'acétyl-CoA pour l'alimentation de la CRM en électrons (e ⁻).....	47
Figure 23 : Représentation schématique du fonctionnement de la CRM.....	48
Figure 24 : Représentation schématique du devenir de l'O ₂ [•] suite à sa formation au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).....	49
Figure 25: Représentation schématique de la compartimentalisation calcique dans la mitochondrie.....	52
Figure 26 : Implication des XOR (XDH et XO) dans le métabolisme des purines.....	53
Figure 27: Représentation schématique illustrant le flux d'électrons au niveau de la eNOS couplée (A) vs la eNOS découplée (B).	55
Figure 28: Résumé des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques présents au sein des tissus vasculaires pulmonaires.	57
Figure 29: Structure de la cavéole et localisation de la cavéoline au sein de la cavéole.	63
Figure 30: Régulation de l'activité de la eNOS par la Cav-1.....	64
Figure 31: Structure des jonctions communicantes ou gap.....	68
Figure 32: La famille multigénique des connexines.....	70
Figure 33: Structure topologique d'une connexine (Cx).	71
Figure 34: Assemblage des connexines en jonction gap.	73
Figure 35: Cycle de vie des connexines.....	75
Figure 36: Voies de dégradation des connexosomes/jonctions annulaires.	76
Figure 37: Ultrastructure d'une JME.	84
Figure 38: Protéines localisées à la JME.	85
Figure 39: Représentation schématique de l'expression des Cx dans les vaisseaux sains et lors du développement de la plaque d'athérome.	87
Figure 40: Dispositif utilisé pour la mise en place de l'HTP de groupe 3 : caisson hypobare.	92
Figure 41: Arbre artériel intrapulmonaire de poumon gauche.	94
Figure 42: Structure du fluo-4.	96
Figure 43: Structure de la Rhod-2.....	97
Figure 44: Structure du TMRM.	98

Figure 45: Représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'artère pulmonaire de premier ordre.....	105
Figure 46: Principe de la RPE : Effet de Zeeman.....	107
Figure 47: Réaction spontanée entre la sonde CMH et l'O ₂ [·] donnant lieu à la formation du radical nitroxyde CM [·]	109
Figure 48: Dispositif utilisé pour la RPE : Miniscope MS200 (Magnettech).	109
Figure 49: Principe de la spectroscopie par RPE.....	110
Figure 50: Spectre d'absorption du radical nitroxyde (CM [·]) obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.	111
Figure 51: Mesure de l'amplitude des 3 pics correspondant au spectre d'absorption du radical nitroxyde CM [·]	112
Figure 52: Les différentes réactions de transformations du NO en nitrates (NO ₃ ⁻) et nitrites (NO ₂ ⁻).	113
Figure 53 : Réaction de transformation des NO ₃ ⁻ en NO ₂ ⁻ par l'enzyme nitrate réductase et le cofacteur.	113
Figure 54: Réaction chimique à la base du principe du kit « SOD Assay-WST ».	115
Figure 55: Courbe d'inhibition de la SOD.....	116
Figure 56: Gel d'agarose (2 %) montrant les bandes d'ADN pour la Cx43 et la NEO.....	119
Figure 57: Représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'AIP de 1 ^{er} ordre de souris.....	121
Figure 58: Effet de la 5-HT, de l'ET-1 et de la PHE sur la quantité d'O ₂ [·] mesurée par la RPE.	168
Figure 59: Effet de l'ET-1 (0,1 µM) sur la quantité d'ONOO ⁻	169
Figure 60: Respiration mitochondriale en réponse à la 5-HT, à l'ET-1 et à la PHE au niveau des cellules musculaires lisses d'AIP (CML-AIP).....	170
Figure 61: Comparaison de l'effet de la 5-HT et de l'ET-1 sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les CML-d'AIP.....	171
Figure 62: Effet de l'ET-1 comparé à celui de la 5-HT sur la quantité de Ca ²⁺ cytosolique et mitochondrial dans les CML d'AIP.....	172
Figure 63: Expression des récepteurs ET _B (R-ET _B) dans la paroi des AIP de rat.	173
Figure 64: Expression des récepteurs α _{1D} (R-α _{1D}) dans la paroi des AIP de rat.	174

Figure 65: Effet du destructeur des cavéoles, le méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) sur la contraction à l'ET-1 et à la PHE.....	176
Figure 66: Expression et localisation de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43 ^{+/+} vs les souris Cx43 ^{+/-}	180
Figure 67: Valeurs des pressions ventriculaires droites systoliques (A) et des rapports de Fulton (B) chez les différents groupes de souris étudiées.....	181
Figure 68: Valeurs des poids corporels (A) et des rythmes cardiaques (B) des différents groupes de souris étudiées.....	183
Figure 69: Expression protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43 ^{+/+} souffrant d'HTP hypoxique chronique.	185
Figure 70 : Remodelage de la paroi artérielle des AIP et du ventricule droit des souris Cx43 ^{+/+} par rapport aux souris Cx43 ^{+/-} en normoxie et hypoxie chronique.	186
Figure 71: Réactivité à la 5-HT des AIP de souris.....	187
Figure 72: Réactivité à l'ET-1 des AIP de souris.....	189
Figure 73: Réactivité à la PHE des AIP de souris.	191
Figure 74: Relaxation au carbachol des AIP de souris.....	192

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : 5 ^{ème} classification mondiale de l'HTP.....	13
Tableau 2 : Les différentes familles des R-5-HT et leurs couplages respectifs.....	20
Tableau 3 : Les sous-populations des familles des récepteurs à la 5-HT.....	23
Tableau 4 : Résumé de la distribution tissulaire des connexines chez l'humain et la souris. .	72
Tableau 5 : Composition de la solution Krebs-HEPES bicarbonate (KHB).	93
Tableau 6 : Composition de la solution d'HBSS.	95
Tableau 7 : Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescences.....	103
Tableau 8 : Composition de la solution de Kreb's-Henseleit dont le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.	104
Tableau 9 : Détails des amorces utilisées. Cx43 : connexine 43, NEO : néomycine	118
Tableau 10 : Récapitulatif des anticorps utilisés pour le Western Blot.....	125
Tableau 11 : Caractéristiques de la réactivité à la 5-HT des AIP de souris Cx43 ^{+/+} et Cx43 ^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.....	188
Tableau 12 : Caractéristiques de la réactivité à l'ET-1 des AIP de souris Cx43 ^{+/+} et Cx43 ^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.....	190
Tableau 13 : Caractéristiques de la réactivité à la PHE des AIP de souris Cx43 ^{+/+} et Cx43 ^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.....	192

LISTE DES ABRÉVIATIONS

5-HT : sérotonine
5HTT : transporteur de la sérotonine
AA : acide arachidonique
AFM : microscopie de force atomique
AIP : artère intrapulmonaire
AMPC : adénosine monophosphate cyclique
ATP : adénosine triphosphate
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive
[Ca²⁺]_c : concentration calcique cytosolique
[Ca²⁺]_m : concentration calcique mitochondriale
Ca²⁺ : calcium
CAM : Calcium/calmodulin-dependent protein
CAMK : Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II
CAV-1 : cavéoline de type 1
CE : cellule endothéliale
CICR : «calcium-induced calcium release»
CML : cellule musculaire lisse
CML-AP : cellules musculaires lisses des artères pulmonaires
CO₂ : dioxyde de carbone
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
CSD : «caveolin scaffold domain»
Cx : connexine
DAG : diacyl glycérol
ECE-1 : enzyme de conversion de l'endothéline-1
EGF : «epithelial growth factor»
eNOS : NO synthase endothéliale
ERO : espèces réactives dérivées de l'oxygène
ET-1 : endothéline de type 1
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide
FMN : flavine mononucléotide
GSSG : glutathion disulfite
GTP : guanosine tri-phosphate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
HC : hypoxie chronique
HIF-1 : «hypoxia inducible factor 1»
HMG-CoA : 3-hydroxy-3-méthylglutaryl-coenzyme A
HRE : «hypoxia response elements»

HTAP : hypertension artérielle pulmonaire
HTP : hypertension pulmonaire
HVD : hypertrophie ventriculaire droite
IMAC: «inner membrane anion channel»
IP₃ : inositol tri phosphate
JME : jonction myoendothéliale
KO: «knock out»
L-DOPA : dihydrophénylalanine
MβCD : méthyl-β-cyclodextrine
MAP: «mitogen activated protein»
MAPK: «mitogen activated protein kinase»
MCT : monocrotaline
MCU : «mitochondrial calcium uniporter»
MLC: «myosin light chain»
MLCK : kinase des chaînes légères de myosine
NAADP: «nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate»
NADPH: «nicotinamide adénine dinucléotide phosphate»
NGF: «nerve growth factor»
NO :monoxyde d'azote
NOS : NO synthase
NOX : NADPH oxydase
NVOC: «non-voltage operated channels»
O₂⁻ : anion superoxyde
PDGF: «platelet derived growth factor»
PGI₂ : prostaglandine I₂
PHE : phényléphrine
PIP₂ : phosphatidyl inositol biphosphate
PKA : protéine kinase A
PKC : protéine kinase C
PLCβ : phospholipase C β
PO₂ : pression partielle en oxygène
PVDs : pression ventriculaire droite systolique
RENOX : rénale oxydase
R-ET : récepteur à l'endothéline
ROC : receptor operated channel
RPE : résonance paramagnétique des électrons
RRy : récepteurs de la ryanodine

RS : réticulum sarcoplasmique
SERCA : Ca²⁺-ATPase du réticulum sarcoplasmique
SMA: «smooth muscle actin»
SNP : sodium nitroprussiate
SOC: «store operated channel»
TRPV: «transient receptor potential vanilloid»
VDAC : «potentiel dependent anion channels»
VEGF: vascular endothelial growth factor»
VHP: «vasoconstriction hypoxique pulmonaire.
VOC: «voltage-operated channels»
XO: xanthine oxydase
ZO: zonula occludens
 α -AR : récepteur α adrénergique
 β -AR : récepteur β adrénergique

PRÉFACE

La circulation pulmonaire est une circulation à basse pression sanguine, de 10 à 20 mmHg chez l'Homme au repos par rapport à la circulation systémique où la pression varie entre 80 et 120 mmHg. Contrairement à la circulation systémique, où l'hypoxie aiguë induit une vasodilatation, la circulation pulmonaire, répond par une vasoconstriction. Ce phénomène de vasoconstriction hypoxique pulmonaire (ou VHP) est une réponse adaptative physiologique qui a lieu au niveau des artérioles pulmonaires touchées par l'hypoxie aiguë et permet de rediriger le flux sanguin vers les alvéoles mieux ventilées. Ainsi, la VHP permet l'adéquation de la perfusion sanguine à la ventilation. Néanmoins, lorsque l'hypoxie se généralise et se maintient sur l'intégralité des poumons, elle devient chronique. La vasoconstriction touche alors l'ensemble des artérioles pulmonaires et l'hypertension pulmonaire (HTP) hypoxique chronique se développe. Cette HTP appartient au groupe 3 de la classification des HTP.

L'HTP de groupe 3 se caractérise par des changements structuraux et fonctionnels importants des artères de petit calibre appelées artérioles de résistance. On observe alors une hyperréactivité ainsi qu'un remodelage au sein de ces artérioles pulmonaires. Ces changements entraînent alors une augmentation progressive et persistante des résistances artérielles pulmonaires à l'écoulement sanguin et une augmentation de la pression artérielle pulmonaire moyenne. Ce ralentissement de l'écoulement sanguin au niveau du lit artériel pulmonaire induit une augmentation du travail du ventricule droit propulsant le sang de l'artère pulmonaire vers les poumons. Au cours du temps, le ventricule droit s'hypertrophie, menant à une insuffisance cardiaque droite et, à terme, au décès du patient.

En plus de l'hypoxie, il existe d'autres facteurs induisant le développement de l'HTP. Il s'agit d'une pathologie multifactorielle qui fait l'objet d'une classification selon son origine (Simonneau, Gatzoulis *et al.*, 2013). L'HTP est souvent sous-diagnostiquée car elle est cliniquement décelée à un stade avancé de la pathologie. Les traitements pharmacologiques actuels visent à (1) diminuer la pression artérielle pulmonaire par vasodilatation et (2) inhiber le remodelage des artérioles, mais ils présentent des efficacités cliniques modestes. En effet, ces traitements améliorent la qualité de vie des patients mais restent non curatifs. La mortalité survient dans 58 % des cas de patients souffrant d'une HTP idiopathique dans les 3 ans qui suivent le diagnostic initial de la maladie (Humbert, Sitbon *et al.*, 2010 ; McGoon, Benza *et al.*, 2013). Actuellement, la solution la plus efficace se résume à la greffe cœur/poumon, présentant un taux de survie de 80 % un an postopératoire et de 50 % cinq ans après (Montani, Jais *et al.*, 2004 ; Sitbon, Savale *et al.*, 2014). L'HTP constitue alors un réel problème de santé publique et la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires qui sous-tendent l'apparition de cette pathologie est indispensable pour le développement de thérapies innovantes et efficaces.

La voie de la sérotonine (5-HT) est l'une des voies qui a été explorée de manière intensive dans le développement de l'HTP. En effet, dans les années 1980, la prise de médicaments anorexigènes (fenfluramine et dexfenfluramine) inhibant le transport de 5-HT dans les plaquettes sanguines a provoqué une épidémie d'HTP de groupe 1 en France et en Belgique. Depuis, de nombreuses études ont montré que le taux plasmatique de 5-HT est augmentée dans l'HTP. La 5-HT exerce un rôle majeur dans l'augmentation de la vasocontraction des artères pulmonaires et la prolifération des cellules musculaires lisses. D'autre part, en plus de ses effets puissants d'agent contractile et prolifératif, la 5-HT est capable d'augmenter la quantité d'anions superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) au niveau du muscle lisse de rat (Billaud, Marthan *et al.*, 2009). Au niveau de l'endothélium, l'activation des récepteur à la 5-HT induit la production du monoxyde d'azote (NO). L' $O_2^{\cdot-}$ du muscle lisse piège alors le NO vasorelaxant au niveau de l'endothélium et maintient une contraction physiologique de l'artère pulmonaire (Billaud, Marthan *et al.*, 2009). L' $O_2^{\cdot-}$ étant une petite molécule chargée d'une taille inférieure à 1 kDa ne peut diffuser librement à travers les membranes plasmiques. Il passerait alors à travers les jonctions communicantes de type myoendothéliales, et notamment la connexine 43, pour piéger le NO. Néanmoins, l'étude réalisée par Billaud et collaborateurs n'a pas mis en évidence le lien entre la 5-HT et l'augmentation d' $O_2^{\cdot-}$. Par conséquent, l'objectif principal de mon travail de thèse a consisté à mettre en évidence les voies de signalisation impliquées dans ce phénomène au sein des artères intrapulmonaires de rat. Cette voie de signalisation apportera des éléments de compréhension, entre autres, sur le lien entre l' $O_2^{\cdot-}$, le calcium, la mitochondrie, les NADPH oxydases et les microdomaines de signalisation dans la circulation pulmonaire de rat.

De plus, les études réalisées par Billaud et collaborateurs ont montré le rôle de la connexine 43 (Cx43) dans la vasoréactivité des AIP de rats sains et souffrant d'HTP, via des expériences d'inhibitions pharmacologiques (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Nous avons donc jugé important d'étudier le rôle de la Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et HTP hypoxique chronique de souris à l'aide de la souris hétérozygote déficiente pour la Cx43. D'autant plus, qu'actuellement, aucune étude n'a encore décrit le profil d'expression et le rôle fonctionnel de la Cx43 dans la circulation pulmonaire de souris saine et HTP hypoxique chronique. Une meilleure compréhension du rôle de la Cx43 au sein des artères pulmonaires pourrait éventuellement permettre l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les jonctions communicantes dans l'HTP.

INTRODUCTION

I. La circulation pulmonaire : Organisation anatomique

I.1 Généralités : Physiologie

Le système cardiovasculaire est composé du compartiment sanguin, de la circulation artério-veineuse (système circulatoire) et de la pompe cardiaque. Il a pour fonction principale l'approvisionnement des organes en dioxygène et nutriments, en fonction de la demande énergétique de l'organisme. Le système circulatoire comprend la circulation systémique, ou grande circulation, qui achemine le sang riche en dioxygène et nutriments du cœur vers les tissus et la circulation pulmonaire, ou petite circulation, qui apporte le sang appauvri en dioxygène vers les poumons.

La fonction principale de la circulation pulmonaire est de ré-oxygéner le sang par élimination du dioxyde de carbone (CO_2). En effet, dans les poumons, le sang pauvre en dioxygène (O_2) provenant du ventricule droit, circule dans les artères, artérioles puis dans les capillaires pulmonaires. Ces capillaires étant directement au contact des alvéoles pulmonaires (contenant l'air inspiré) permettent les échanges gazeux entre le sang et l'air. Chez l'Homme, la barrière alvéolo-capillaire représente une surface de 50-70 m^2 . A ce niveau, l' O_2 diffuse des alvéoles vers les capillaires et le CO_2 des capillaires vers les alvéoles. Le sang alors enrichi en O_2 est redirigé, via les veines pulmonaires, vers le cœur au niveau du ventricule gauche, où il est réinjecté via l'aorte dans la circulation systémique (Figure 1).

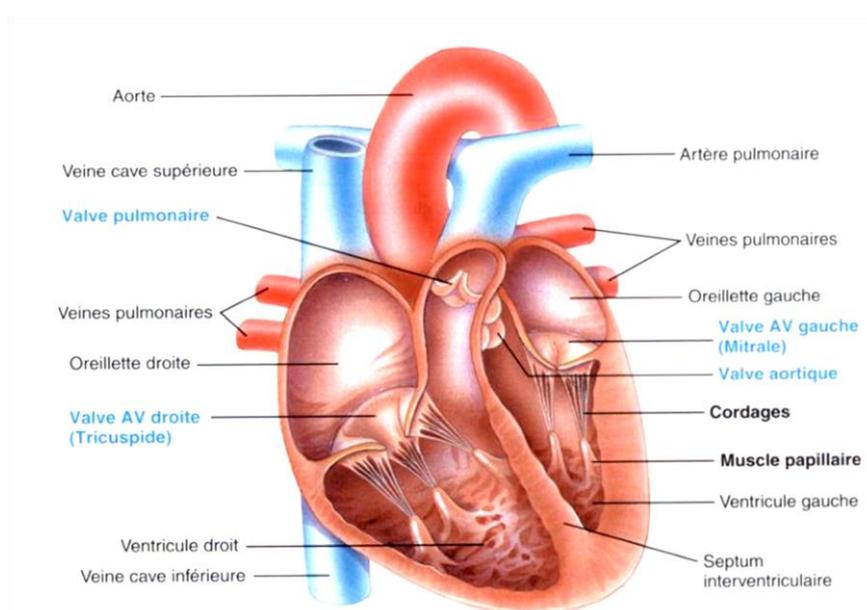


Figure 1 : Représentation anatomique de l'appareil cardio-vasculaire.

Physiologie humaine, Sherwood, de Boeck.

I.2 Architecture du système vasculaire pulmonaire

Le système vasculaire pulmonaire comprend trois compartiments anatomiques connectés en série : l'arbre artériel, un vaste réseau de capillaires et l'arbre veineux. Lors de leur entrée dans les lobes du poumon droit et gauche, les artères extra-pulmonaires (provenant du ventricule droit) donnent naissance aux artères intrapulmonaires (AIP) principales (1^{er} ordre). Les AIP de 1^{er} ordre se ramifient pour aboutir aux artères de résistance.

Chez le rat et la souris, le poumon droit est composé de quatre lobes et le poumon gauche n'en compte qu'un seul. Chez l'Homme, le poumon droit est composé de trois lobes et le poumon gauche de deux lobes. De plus, le nombre de branchements distaux au niveau de l'arbre artériel pulmonaire varie en fonction du poids du mammifère, par exemple : chez l'Homme, on observe des branchements de 15 à 17 ordres ([Figure 2A](#)) tandis que chez le rat on distingue seulement 11 à 12 ordres ([Figure 2B](#)).

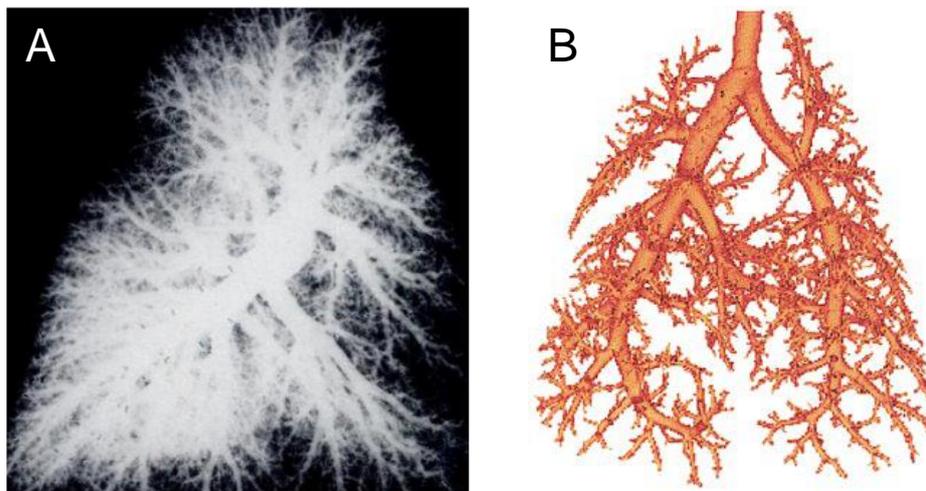


Figure 2 : Représentation de l'arbre artériel pulmonaire de l'homme (A) et de rat (B).

(A) Image d'artériographie d'un poumon adulte humain. (B) Reconstruction tridimensionnelle du réseau artériel d'un poumon de rat par tomographie aux rayons X. D'après ([Karau, Molthen et al., 2001](#) ; [Townasley 2012](#)).

I.3 La vasoconstriction hypoxique pulmonaire

La circulation pulmonaire est une circulation à faible pression sanguine (10 à 20 mm Hg chez l'Homme au repos) par rapport à la circulation systémique (80 à 120 mm Hg). Une autre particularité physiologique qui la caractérise est la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP) qui se met en place pour une diminution de la pression partielle en dioxygène (PO_2) en dessous de 60 mm Hg (hypoxie aiguë), par exemple lors d'une obstruction bronchique ou lors d'un séjour en altitude ([Zaiman, Fijalkowska et al., 2005](#)). Par

contre, en périphérie, une diminution de la PO_2 induit une vasodilatation au niveau des vaisseaux de la circulation systémique. La VHP est une réponse physiologique adaptative qui a lieu au niveau des artérioles pulmonaires au contact des alvéoles touchées par l'hypoxie aiguë et permet la redirection du flux sanguin vers les alvéoles mieux ventilées (Gupte and Wolin 2008) (Figure 3). Ainsi, la VHP permet d'assurer une hématoxose correcte du sang en maintenant un bon rapport ventilation/perfusion. Mais, si l'hypoxie touche l'intégralité des poumons, la vasoconstriction se généralise sur l'ensemble des artérioles pulmonaires. On observe alors une augmentation de la pression artérielle pulmonaire conduisant à une hypertension pulmonaire (HTP) de type hypoxique chronique (HTP de groupe 3, voir chapitre II.2).

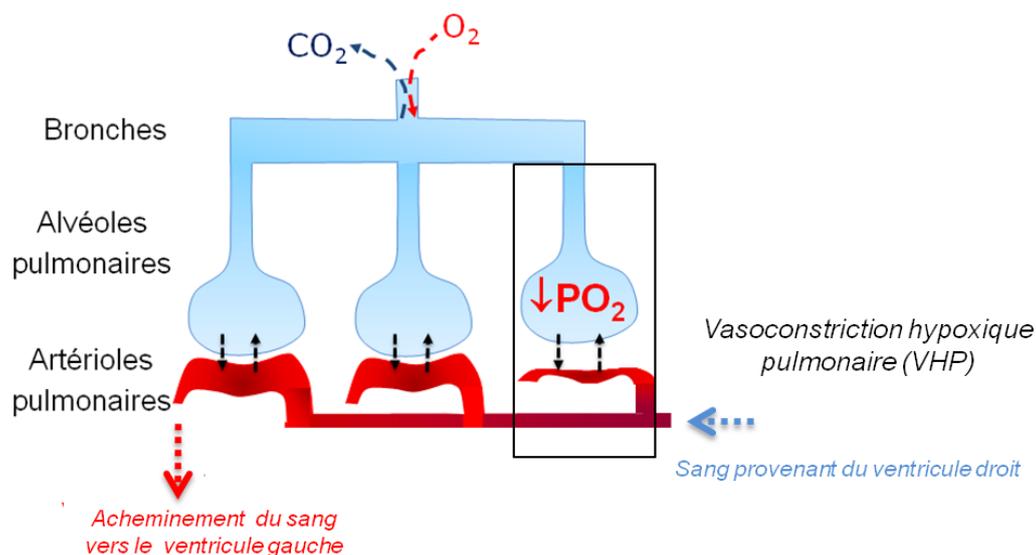


Figure 3 : Mécanisme de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP).

Une diminution aiguë de la pression partielle en dioxygène ($\downarrow PO_2$) au niveau des alvéoles pulmonaires induit la vasoconstriction des artérioles pulmonaires de la zone touchée par l'hypoxie (partie encadrée). La flèche bleue représente le sang appauvri en O_2 provenant du ventricule droit et la flèche rouge le sang riche en O_2 à la sortie des poumons.

Chez le fœtus, cette réponse physiologique de la circulation pulmonaire joue un rôle fondamental. En effet, chez le fœtus, les poumons ne sont pas ventilés et le placenta représente le lieu des échanges gazeux via la circulation fœtale. On observe alors chez le fœtus une forte réactivité du lit vasculaire pulmonaire, due à une VHP permanente qui permet de détourner le flux sanguin du poumon fœtal vers la circulation fœtale. Les résistances vasculaires pulmonaires étant très élevées chez le fœtus, le flux sanguin des poumons fœtaux non ventilés reste très faible. À la naissance, suite à la première inspiration, le poumon se dilate en réponse à l'entrée d'air. Cet événement augmente le débit sanguin

pulmonaire en quelques minutes, ce qui permet au poumon d'assurer sa fonction d'échanges gazeux. Même si le phénomène de VHP est bien établi, les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ce processus ne sont pas complètement élucidés.

I.4 Organisation tissulaire de la paroi artérielle pulmonaire

La paroi artérielle est organisée en 3 couches concentriques comprenant de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média et l'adventice (Figure 4).

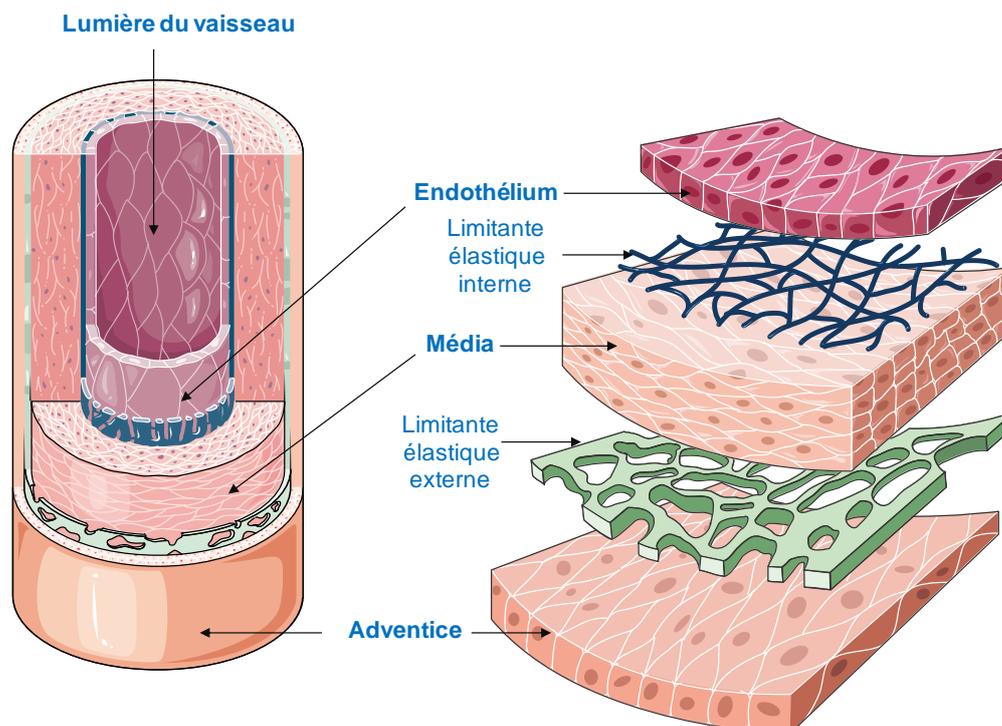


Figure 4: Représentation schématique de la paroi artérielle.

L'endothélium est séparé de la média par la limitante élastique interne. La limitante élastique externe sépare la média de l'adventice. (D'après Servier Medical Art).

I.4.1 L'intima

L'**intima** est une monocouche de cellules endothéliales (endothélium) qui borde la lumière du vaisseau. Elle est en contact direct avec le compartiment sanguin, les hormones circulantes et les neuromédiateurs. L'intima est séparée de la média par une limitante élastique interne.

L'endothélium assure un rôle clé dans la régulation du tonus vasculaire, en libérant des médiateurs à pouvoir vasoconstricteur (ex : le thromboxane A₂, l'endothéline-1 (ET-1) ou la sérotonine (5-HT)) ou à pouvoir vasodilatateur (ex : la prostaglandine (PGI₂) ou le monoxyde d'azote (NO)).

I.4.2 La média

La **média** est composée de cellules musculaires lisses (CML) disposées de manière hélicoïdale dans la paroi. Entre les couches de CML on retrouve les fibres de collagène et d'élastine. Les CML possèdent des myofibrilles qui sont fixées à la membrane plasmique via des corps denses formés d'actines globulaires. La lame élastique externe sépare la média de l'adventice. Dotées d'une capacité contractile, les CML régulent l'état vasoactif des artères. Ainsi, selon leur état : contracté ou relâché, elles contrôlent le diamètre du vaisseau et adaptent la distribution du débit sanguin en fonction des demandes physiologiques de l'organisme.

Au niveau du système circulatoire pulmonaire, l'artère pulmonaire est classée selon deux caractéristiques concernant la couche médiane : la présence de lames élastiques et le degré de muscularisation. Chez le rat, au niveau des AIP de 1^{er} ordre (artères dites élastiques), on distingue plusieurs lames élastiques interposées entre les couches de CML de la paroi. En revanche, les AIP de 3^{ème} ordre sont composées d'une seule limitante élastique, interne et externe (artères partiellement muscularisées). Les capillaires pulmonaires, quant à eux, ne sont pas constitués de CML mais de péricytes (Seidelmann, Lighthouse *et al.*, 2014).

Par ailleurs, sur l'ensemble de l'arbre artériel pulmonaire, la lame élastique interne présente des fenêtres qui permettent la projection des cellules endothéliales vers les CML.

I.4.3 L'adventice

La **surface adventitielle** correspond à la partie la plus externe de la paroi. Elle est apposée soit aux bronches (Figure 5A) soit au réseau des alvéoles (Figure 5B). L'adventice est composée d'une matrice extracellulaire, de fibroblastes, de vasa vasorum et d'un réseau neuronal. Les vasa vasorum sont de très petits vaisseaux (de l'ordre 100 µm de diamètre chez le rat) qui permettent l'irrigation de l'adventice ainsi que de la partie externe de la média. On observe également, au niveau de l'adventice des faisceaux de fibres de collagène et d'élastine. Les fibroblastes contribuent à la synthèse des molécules des matrices extracellulaires telles que le collagène, la fibronectine et les protéoglycanes. Enfin, l'adventice est innervée par des terminaisons nerveuses (fibres adrénergiques, cholinergiques et sensorielles) provenant du système nerveux autonome (Townsend 2012).

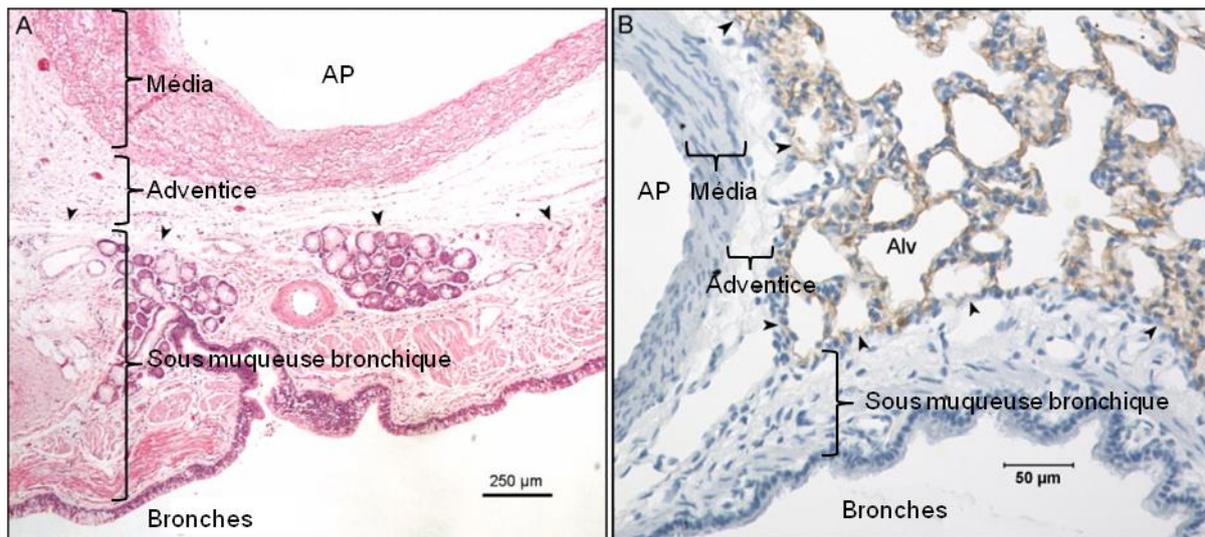


Figure 5: Illustration histologique de poumon humain (A) vs. rat (B).

(A) : Coloration à hématoxyline – éosine d'une section de poumon humain montrant l'adventice de l'artère pulmonaire apposée à la sous-muqueuse des bronches sous-jacentes. (B) : Coloration à l'hématoxyline d'une section de poumon de rat montrant l'apposition de l'adventice à la paroi des alvéoles. Les têtes de flèches indiquent la bordure de l'adventice. AP : Artère Pulmonaire ; Alv : Alvéoles. *D'après (Townsend 2012).*

I.5 Les cellules musculaires lisses (CML)

D'un point de vue morphologique, les CML sont de forme allongée (en fuseau) et ont un diamètre qui varie de 2 à 5 μm . Au niveau des vaisseaux sanguins, elles sont orientées de manière parallèle les unes aux autres. Les CML sont constituées d'un cytosquelette formé de trois types de filaments : (1) les myofilaments, (2) les filaments intermédiaires et (3) les microtubules. Ces filaments sont reliés entre eux via des corps denses formés de protéines et possèdent des points d'ancrage à la membrane cellulaire, conférant ainsi à cette chape cellulaire une flexibilité lors de la contraction/relaxation ([Figure 6](#)).

On distingue deux types de myofilaments : les filaments fins d'actine et les filaments épais de myosine. Les filaments intermédiaires formés de desmine et de vimentine jouent un rôle essentiel dans : (1) le maintien de la morphologie cellulaire, (2) la résistance aux contraintes mécaniques et (3) le maintien de la cohésion entre les CML via leur ancrage aux desmosomes et aux plaques d'adhérence. Les microtubules sont constitués de protéines globulaires de tubuline α et β . L'association en dimères des tubulines forme un protofilament et l'association de 13 protofilaments donne un microtubule de 25 nm de diamètre. Les microtubules sont polarisés et interviennent dans le transport de molécules, de vésicules et d'organites.

Les CML vasculaires communiquent entre elles via des jonctions intercellulaires de type gap composées de protéines appelées connexines. Le rôle des connexines dans la circulation pulmonaire artérielle sera détaillé dans la deuxième partie introductive de ce manuscrit. D'autre part, la membrane plasmique des CML présente des invaginations appelées cavéoles. De nos jours, ces cavéoles sont considérées comme des microdomaines de signalisation intervenant dans la régulation de la signalisation cellulaire et leurs rôles seront détaillés dans la partie IV du chapitre I.

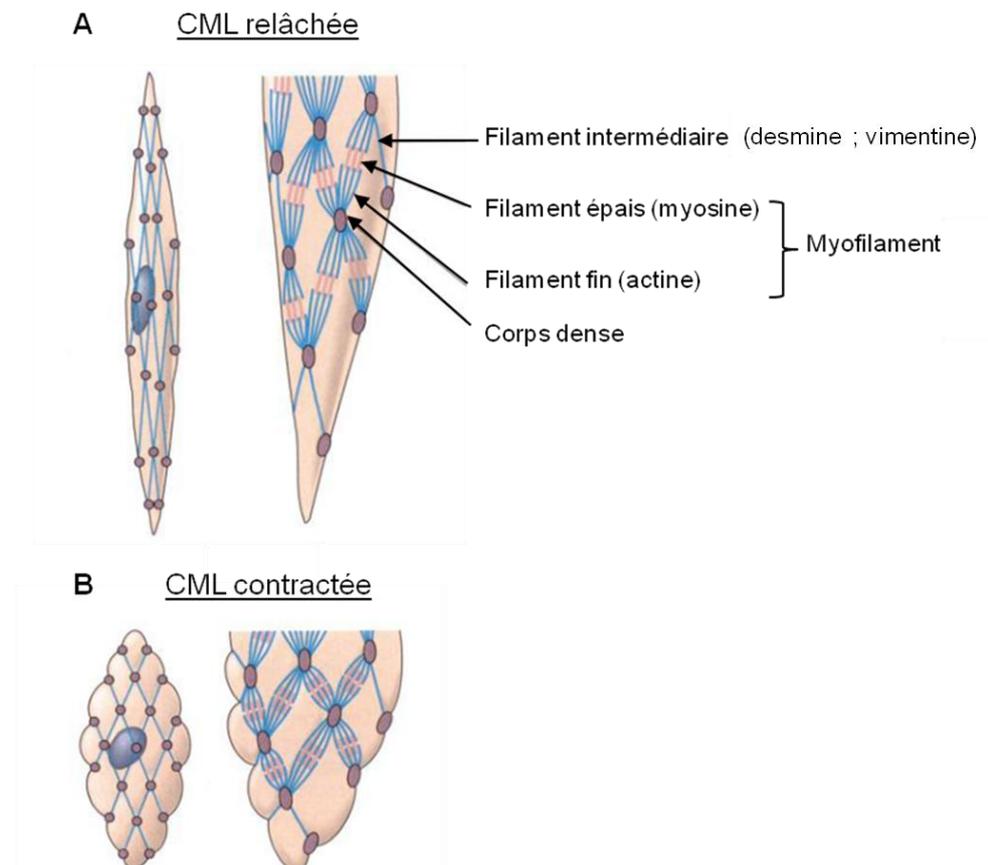


Figure 6: Représentation de l'appareil contractile des CML.

(A) CML relâchée, (B) CML contractée. *Adapté de Physiologie humaine, Sherwood, de Boeck.*

I.5.1 Mécanisme de contraction des CML

Les CML se contractent suite au glissement des filaments fins d'actine entre les filaments épais de myosine, créant ainsi un raccourcissement des myofilaments d'actine-myosine. Les filaments fins sont des polymères formés de monomères d'actine G, de tropomyosine et de deux protéines spécifiques du muscle lisse : la caldesmone et la calponine. Les filaments épais sont des assemblages en polymères de molécules de chaîne lourde de myosine et de deux chaînes légères de myosine de 20 kDa (MLC20 ou myosin

light chain) (Figure 7). Les têtes globulaires sont composées de deux MLC20. Le pivot des têtes globulaires sur le filament fin induit la formation de ponts acto-myosiques. De plus, la formation des ponts acto-myosiques est dépendante de la phosphorylation des MLC20 par la kinase des chaînes légères de myosine (MLCK). Cette étape de phosphorylation nécessite l'hydrolyse d'une molécule d'ATP et utilise l'activité ATPasique intrinsèque des têtes globulaires.

D'autre part, l'activité de la MLCK est sous la dépendance de la formation du complexe Ca^{2+} /calmoduline. Lorsque la concentration calcique cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_c$) augmente, la calmoduline se fixe à quatre ions Ca^{2+} et elle subit un changement de conformation (calmoduline activée) ce qui va lui permettre d'interagir avec la MLCK (Means, VanBerkum *et al.*, 1991). Suite à son interaction avec le complexe Ca^{2+} /calmoduline, la MLCK change de conformation (MLCK activée) exposant ainsi son site catalytique. La MLCK activée se lie alors aux MLC et les phosphoryle. L'activité de la MLCK est régulée négativement par des protéines kinases telles que la protéine kinase A (PKA) et la protéine kinase II dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline (CaMKII)(Somlyo and Somlyo 2003 ; Hirano 2007). La phosphorylation de la MLCK réduit son affinité pour le complexe Ca^{2+} /calmoduline, inhibant ainsi son activité.

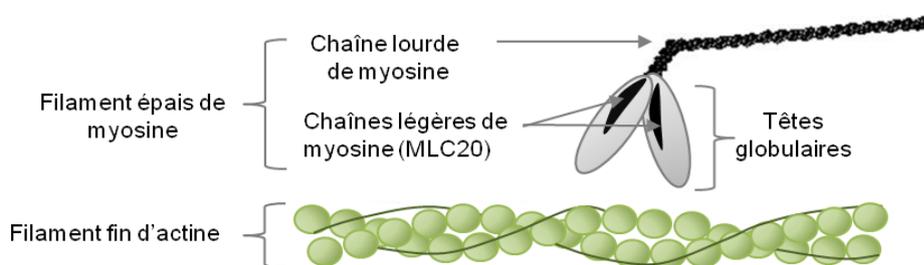


Figure 7: Protéines constituant l'appareil contractile des CML.

Les filaments épais sont composés de chaîne lourde de myosine et de chaîne légère de myosine (MLC). Le glissement des filaments épais sur les filaments fins d'actine induit la contraction des CML.

Cependant, il existe un autre mécanisme de contraction qui se fait indépendamment de l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$. Ce mécanisme dépend de la sensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} suite à une inhibition de la phosphatase des chaînes légères de myosine (MLCP), enzyme dont l'activité est indépendante du Ca^{2+} (Savineau and Marthan 1997). L'inhibition de la MLCP maintient la MLC20 sous sa forme phosphorylée et la CML reste dans un état contracté. La MLCP est inhibée soit par phosphorylation de sa sous-unité

régulatrice MYPT-1, soit par l'activation de protéines partenaires inhibitrices de la MLCP : CPI-17 pour «PKC-activated protein phosphataseinhibitorof17 kDa». Divers agonistes peuvent sensibiliser l'appareil contractile via l'activation de la protéine kinase Rho (Rho kinase). La Rho kinase phosphoryle alors le MYPT-1 mais peut également activer par phosphorylation le CPI-17 (Hirano 2007), aboutissant à l'inhibition de l'activité de la MLCP (Figure 8). Par ailleurs, la protéine kinase C est aussi connue pour phosphoryler et donc activer CPI-17 (Hirano 2007).

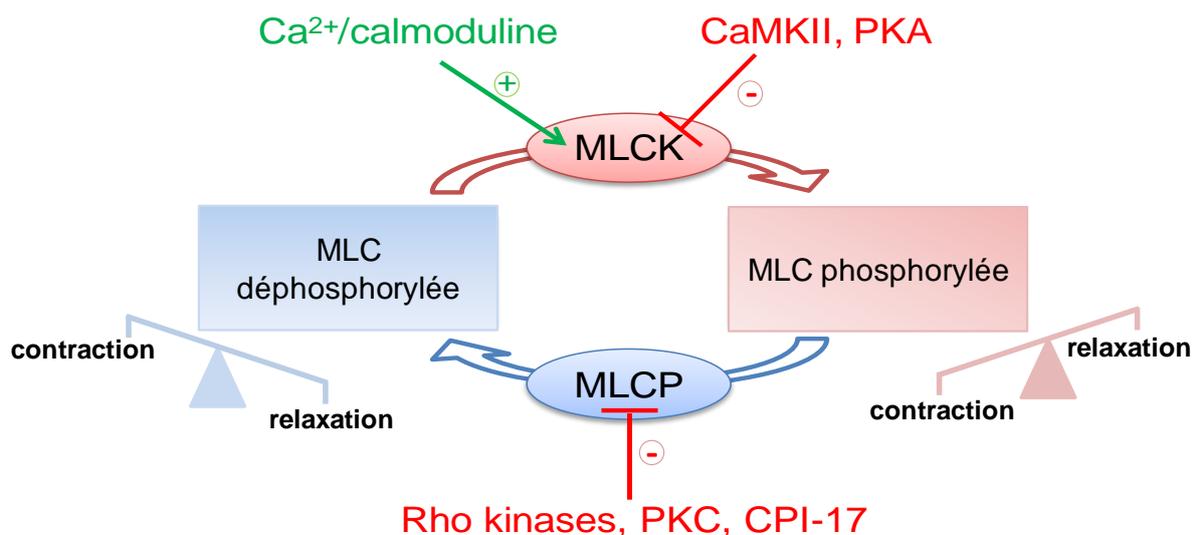


Figure 8 : Mécanisme moléculaire de la contraction des CML : régulation de la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC20).

La MLCK est activée par le complexe Ca^{2+} /calmoduline et inhibée par la CaMKII et la PKA. Lorsque la MLCK est active, elle phosphoryle la MLC et induit la contraction des CML. La déphosphorylation de la MLC par la MLCP induit alors la relaxation. L'activité de la MLCP est indépendante du Ca^{2+} et son activité est inhibée par les Rho kinases, la PKC et le CPI-17. MLCK : kinase des chaînes légères de myosine, MLCP : phosphatase des chaînes légères de myosine, CaMKII: protéine kinase II dépendante du complexe Ca^{2+} /calmoduline, PKC : protéine kinase C, PKA : protéine kinase A, CPI-17 : inhibiteur de la phosphatase de la PKC-activée de 17 kDa.

1.5.2 Les voies d'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ dans les CML vasculaires pulmonaires

L'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ peut se faire soit par un couplage électromécanique soit par un couplage pharmacomécanique.

Le couplage électromécanique correspond à une modification du potentiel membranaire qui provoque l'ouverture des canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel et induit ainsi un influx de

Ca^{2+} extracellulaire dans le cytosol. Le couplage pharmacomécanique a lieu lorsqu'un agoniste se lie sur son récepteur.

Au niveau des CML des artères pulmonaires, la majorité des agonistes vasoconstricteurs induit la contraction des CML via leurs liaisons à des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G_q . En réponse à cette activation, l'activité de la PLC_β est induite. La PLC_β va alors cliver le phosphatidyl inositol biphosphate (PIP_2) en inositol-1,4,5-triphosphate (IP_3) et diacylglycérol (DAG). L' IP_3 se fixe au niveau des récepteurs à l' IP_3 présents sur la membrane du réticulum sarcoplasmique (RS) et provoque une libération du Ca^{2+} réticulaire. Le Ca^{2+} provenant du RS est libéré dans le cytosol et peut activer par la suite les récepteurs à la ryanodine (RRy) sensibles aux ions Ca^{2+} . Cette libération de Ca^{2+} du RS via les RRy induit le phénomène de « calcium induced calcium release » (CICR) (Guibert, Marthan *et al.*, 1996 ; Guibert, Pacaud *et al.*, 1996). Le CICR induit alors la vidange du Ca^{2+} réticulaire (Figure 9).

Parallèlement à la voie de l' IP_3 , il peut y avoir une modification du potentiel de la membrane plasmique des CML, activant ainsi un influx calcique extracellulaire. Cette entrée de Ca^{2+} se fait via l'ouverture de canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel ou VOC ». Les VOC sont très sélectifs du Ca^{2+} et on en retrouve deux grands types dans le muscle lisse : les VOC de type L qui sont activés pour de fortes dépolarisations de la membrane plasmique (Liao, Yong *et al.*, 2005 ; Sonkusare, Palade *et al.*, 2006) et les VOC de type T activés en réponse à une faible dépolarisation membranaire (Cribbs 2006 ; Fry, Sui *et al.*, 2006).

En ce qui concerne le DAG, il est clivé par la DAG lipase pour produire de l'acide arachidonique (AA). L'AA active des canaux calciques de type « receptor operated channel ou ROC ». Les ROC font alors rentrer du calcium dans le cytosol (Guibert, Ducret *et al.* 2008). D'autre part, la vidange du Ca^{2+} réticulaire active des canaux de type « store-operated channels » ou SOC (Putney 1990 ; Parekh and Penner 1997). Les ROC et SOC appartiennent à la famille des récepteurs indépendants du potentiel ou non-VOC (NVOC).

Suite aux différentes voies d'augmentation du Ca^{2+} cytosolique, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ peut atteindre des valeurs de l'ordre du μM contre une concentration de 100 nM au repos.

A la fin de la contraction, la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ retourne à sa valeur de repos. Le Ca^{2+} est alors repompé dans le RS via la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) et/ou tamponné par les mitochondries. La Figure 9 résume les voies d'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ au sein des CML des artères pulmonaires.

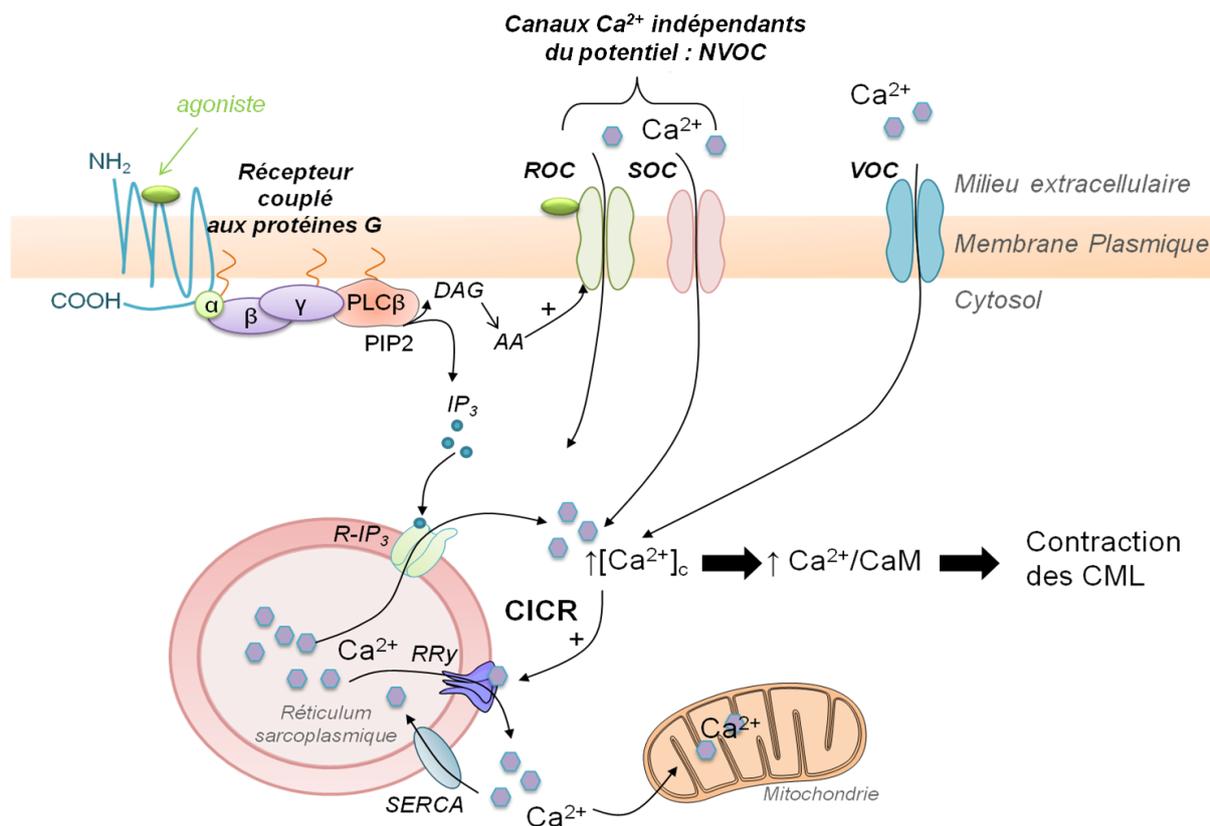


Figure 9: Récapitulation des voies d'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ dans les CML artérielles pulmonaires.

L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ se fait : (1) via une libération du Ca^{2+} provenant du RS via les récepteurs à l' IP_3 (R- IP_3) et/ou le RRY via le CICR, et (2) par un influx calcique extracellulaire médié par des canaux dépendants du potentiel (VOC pour « voltage-operated channels ») et/ou indépendants du potentiel (NVOC pour « non-voltage operated channels ») de type ROC/SOC (pour receptor-operated channels et store-operated channels respectivement). Pour le retour à la $[Ca^{2+}]_c$ de repos, le Ca^{2+} est pompé par les SERCA dans le RS et/ou par la mitochondrie. Abréviations : R- IP_3 : récepteur à l' IP_3 , RRY : récepteur à la ryanodine, CaM : calmoduline, CICR : Calcium-Induced Calcium Release, DAG : diacylglycérol, AA : acide arachidonique, SERCA : pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique, PLCβ : phospholipase C β, PIP₂ : phosphatidyl inositol bi phosphate. *Adapté de (Guibert, Ducret et al., 2008).*

II. L'Hypertension Pulmonaire

II.1 Définition et classification clinique de l'hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire (HTP) est une maladie dévastatrice de mauvais pronostic. Elle se caractérise par une élévation progressive et persistante des résistances artérielles pulmonaires au niveau des artères de petit calibre (diamètre < 500 µm). Pour assurer la perfusion adéquate en dioxygène des organes, le travail cardiaque (débit) droit augmente, conduisant à une hypertrophie ventriculaire droite compensatrice. Au cours du temps, cette adaptation conduit à une décompensation cardiaque qui mène à une insuffisance cardiaque droite et, à terme, au décès du patient. L'échocardiographie cardiaque permet le dépistage de l'HTP mais le diagnostic formel nécessite une procédure invasive : le cathétérisme cardiaque droit qui met en évidence une pression artérielle pulmonaire moyenne supérieure à 25 mmHg ($PAP_m > 25$ mmHg) au repos (Simonneau 2009). Par ailleurs, l'échocardiographie couplée au test de marche de 6 minutes permet un dépistage non invasif de l'HTP (Miyamoto, Nagaya *et al.*, 2000 ; Zafzir, Zingerman *et al.*, 2007).

La classification clinique des HTP a pour but de regrouper les différentes manifestations pathologiques présentant des similitudes physiopathologiques, cliniques et de prise en charge thérapeutique. Cette classification des HTP a été proposée pour la première fois en 1973 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), puis revue et modifiée en 1988 à Evian, en 2003 à Venise et révisée en 2008 à Dana Point en Californie (Simonneau 2009). Enfin, la classification de 2008 a été revue en 2013 lors du 5^{ème} congrès mondial de l'hypertension pulmonaire à Nice (Tableau 1). La classification de 2013 maintient la disposition générale des classifications cliniques précédentes. Cependant, quelques modifications concernant le Groupe 1 ont été proposées en se basant sur les nouvelles données publiées au cours des dernières années. Ainsi, en accord avec les pédiatres, des éléments spécifiques à l'HTP pédiatrique ont été rajoutés ce qui permet d'avoir une classification commune pour les adultes et les enfants (Simonneau, Gatzoulis *et al.*, 2013).

Lors de cette thèse, nous nous intéresserons au troisième groupe de cette classification (HTP secondaire à une pathologie pulmonaire chronique ou à une hypoxie chronique).

1 : HYPERTENSION ARTERIELLE PULMONAIRE
1.1 HTAP idiopathique 1.2 HTAP héritable 1.2.1 BMPR2 1.2.2 ALK1, endogline, SMAD9, CAV1, KCNK3 1.2.3 Inconnue 1.3 HTAP associée à la prise de toxiques ou de drogues (anorexigène...) 1.4 HTAP associée à 1.4.1 Connectivite 1.4.2 Infection par le VIH 1.4.3 Hypertension portale 1.4.4 Cardiopathies congénitales 1.4.5 Schistosomiase
1' : MALADIE VEINO-OCCLUSIVE PULMONAIRE ET/OU HEMANGIOMATOSE CAPILLAIRE PULMONAIRE
1'' : HYPERTENSION PULMONAIRE PERSISTANTE DU NOUVEAU-NÉ
2 : HYPERTENSION PULMONAIRE ASSOCIEE A UNE CARDIOPATHIE GAUCHE
2.1 Dysfonction systolique 2.2 Dysfonction diastolique 2.3 Maladie valvulaire 2.4 Obstruction congénitale/acquise des flux entrant/sortant du cœur gauche et les cardiomyopathies congénitales
3 : HYPERTENSION PULMONAIRE SECONDAIRE AUX PATHOLOGIES RESPIRATOIRES CHRONIQUES ET/OU À L'HYPOXIE
3.1 Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 3.2 Pneumopathies interstitielles 3.3 Autres pneumopathies avec des profils mixtes (restrictifs et obstructifs) 3.4 Syndrome d'apnée du sommeil 3.5 Hypoventilation alvéolaire 3.6 Exposition prolongée à de hautes altitudes 3.7 Anomalie du développement des poumons
4 : HYPERTENSION PULMONAIRE LIEE A UNE MALADIE THROMBO-EMBOLIQUE CHRONIQUE
5 : HYPERTENSION PULMONAIRE DUE A UN OU PLUSIEURS MECANISMES
5.1 Troubles hématologiques : anémie chronique hémolytique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie 5.2 Troubles systémiques : sarcoïdose, histiocytose, lymphangiomatose, neurofibromatose 5.3 Troubles métaboliques : maladie de stockage du glycogène, maladie de Gaucher, problèmes thyroïdiens 5.4 Autres : obstruction tumorale, fibrose médiastinale, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire

Tableau 1: 5^{ème} classification mondiale de l'HTP (Simonneau, Gatzoulis *et al.*, 2013).

Modifications majeures de la classification de 2008 à Dana Point. BMPR: bone morphogenic protein receptor type II, CAV1: caveolin-1, HIV: human immunodeficiency virus.

Le **premier groupe** est l'unique groupe regroupant les maladies appelées **hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)**, les autres concernent les différentes formes d'HTP. Les maladies regroupées sous le terme HTAP sont séparées en cinq principaux sous groupes : (1) *HTAP idiopathiques* (anciennement connue sous HTAP primitives), qui correspond à la forme sporadique de la maladie dont le facteur de risque n'est pas identifié (sans cause connue), (2) *HTAP héritables* (anciennement connue sous HTAP familiale), qui survient dans un contexte familial et/ou présence chez le patient d'une mutation au niveau d'un des gènes identifiés comme étant à prédisposition HTAP, (3) *HTAP associées aux anorexigènes* (voir chapitre III section 1.5.1) *ou aux substances toxiques*, (4) *HTAP associées à diverses maladies* telles que les connectivites, l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'hypertension portale, les cardiopathies congénitales avec un shunt gauche-droit, la schistosomiase.

Le **deuxième groupe** concerne des *HTP post-capillaires associées à des cardiopathies gauches*. Les cardiopathies gauches représentent la cause la plus fréquente d'HTP.

Le **troisième groupe** regroupe les *HTP associées aux pathologies pulmonaires chroniques et/ou à l'hypoxie*. L'HTP hypoxique apparaît suite à une hypoxie alvéolaire maintenue (chronique). Cette situation peut être physiologique comme chez les Tibétains qui présentent une adaptation à l'hypoxie de haute altitude (vie à une altitude supérieure à 3000 m) (Beall, Laskowski *et al.*, 2012), ou bien pathologique. L'HTP peut apparaître suite à diverses pathologies obstructives touchant les voies aériennes telles que la broncho pneumopathie chronique obstructive (BPCO). Une fibrose pulmonaire ou un emphysème (maladie touchant le parenchyme pulmonaire) peuvent également induire l'apparition d'une HTP (Rich and Rabinovitch 2008). L'apnée obstructive du sommeil provoque également la survenue de l'HTP. Les HTP du groupe 3 sont en règle générale des HTP modérées car la PAP_m n'excède pas 35 mmHg. En revanche, les HTP du groupe 1 sont beaucoup plus sévères avec la PAP_m supérieure à 40 mmHg (Weitzenblum and Chaouat 2005).

En ce qui concerne l'aspect épidémiologique du Groupe 3, seulement 5 à 13,5 % de patients BPCO développent une HTP sévère comme celle observée dans 10 à 84% des cas de patients souffrant d'HTP idiopathique en se basant sur une PAP_m ≥ 35 mmHg (Chaouat, Naeije *et al.*, 2008 ; Nathan 2008). Par ailleurs, l'impact global de l'HTP de groupe 3 est significatif: des données de surveillance basées sur les hospitalisations aux Etats-Unis suggèrent un taux de mortalité de 26 % chez les patients atteints d'HTP secondaires aux maladies respiratoires (Hyduk, Croft *et al.*, 2005).

Le **quatrième groupe** concerne les hypertensions secondaires à des obstructions des artères pulmonaires, telles que les obstructions thromboemboliques, tumorales ou par des corps étrangers.

Le **cinquième et dernier groupe**, regroupe des pathologies variées constituant des causes rares d'HTP. Ce groupe inclut les troubles hématologiques, des troubles systémiques ainsi que des troubles métaboliques.

II.2 Hypertension pulmonaire de groupe 3 (Hypoxique Chronique)

L'étiologie de l'HTP de groupe 3 est multifactorielle, même si l'hypothèse de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP) semble jouer un rôle central. Comme décrit dans le chapitre I, la VHP est un mécanisme intrinsèque à la circulation pulmonaire saine et correspond à un mécanisme d'adaptation qui redistribue le flux sanguin aux alvéoles mieux ventilées. Cependant, si l'hypoxie atteint tout le poumon et devenant chronique, la VHP se généralise sur l'ensemble de l'arbre vasculaire pulmonaire et une HTP de groupe 3 se développe. Parallèlement à ce **changement fonctionnel** (vasoconstriction), on observe également des **changements structuraux** qui incluent le remodelage vasculaire, une réduction du nombre total de vaisseaux pulmonaires et une thrombose vasculaire pulmonaire (Kuhr, Smith *et al.*, 2012 ; Poor, Girgis *et al.*, 2012). Le remodelage vasculaire correspond à un épaississement de la média des artères pulmonaires, par croissance (hypertrophie) et prolifération (hyperplasie) des CML. D'autre part, on observe également une muscularisation (prolifération de CML) au niveau des artérioles pulmonaires normalement non muscularisées. Les CE des artérioles deviennent hyper-prolifératives et positives pour l' α -actine du muscle lisse (Stenmark, Fagan *et al.*, 2006 ; Zhu, Huang *et al.*, 2006 ; Sakao, Tatsumi *et al.*, 2009 ; Sakao, Tatsumi *et al.*, 2010 ; Sheikh, Lighthouse *et al.*, 2014) (Figure 10). On observe également une augmentation d'épaisseur de la matrice extracellulaire qui s'accompagne de l'activation des fibroblastes (Mecham, Whitehouse *et al.*, 1987 ; Stenmark, Gerasimovskaya *et al.*, 2002).

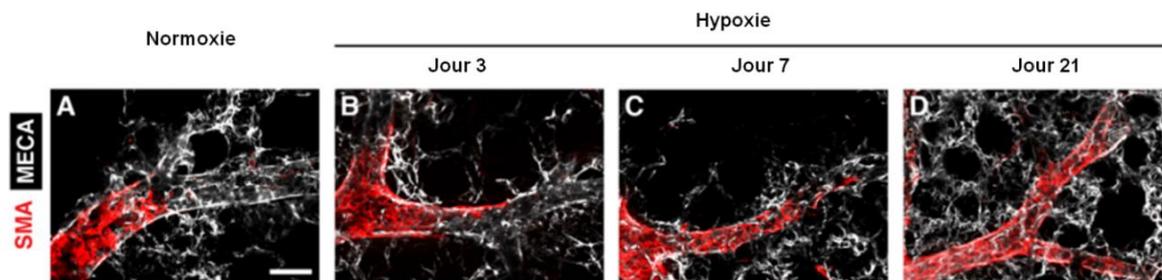


Figure 10: Expression de l' α -actine du muscle lisse (SMA) et d'un marqueur des CE (MECA pour « mouse endothelial cell antigen ») pendant la muscularisation des artérioles pulmonaires induite par l'hypoxie.

Immunofluorescence sur coupes de poumon de souris. Les poumons sont gonflés avec de l'agarose et fixés avec du méthanol. Les marquages rouge et blanc correspondent à la SMA et aux CE respectivement. L'échelle représente 25 μ m. D'après (Sheikh, Lighthouse *et al.*, 2014).

Parallèlement, on observe une réduction de la production de facteurs à pouvoir vasodilatateur comme une réduction de la synthèse et/ou de la libération de NO et une réduction de la transcription du gène codant pour la prostacycline synthase, enzyme à l'origine de la prostacycline. Cette diminution de facteurs vasodilatateurs est accompagnée d'une augmentation de divers médiateurs vasoconstricteurs et pro-prolifératifs tels que la sérotonine (5-HT) et l'endothéline (ET-1) (Shujaat, Minkin *et al.*, 2007). Ces diverses modifications pourraient être à l'origine du remodelage vasculaire ainsi que de la vasoconstriction maintenue, observée chez les patients atteints d'HTP de groupe 3.

II.2.1 Modèle expérimental : rat/souris hypoxique chronique (HC)

Le modèle animal expérimental souffrant d'une HTP hypoxique a été introduit en 1970 par Barer et collaborateurs (Barer, Cook *et al.*, 1970). Il est maintenant largement utilisé chez les rongeurs pour l'étude des changements fonctionnels et biologiques au niveau de l'arbre artériel pulmonaire, lors de la progression de l'HTP.

Expérimentalement, les rats/souris sont soumis à un environnement hypoxique pendant 3 semaines. Celui-ci peut être réalisé de deux façons, soit en diminuant le contenu en dioxygène de l'air inspiré par de l'azote dilué (hypoxie normobare), soit en diminuant la pression atmosphérique ambiante (hypoxie hypobare). Au laboratoire, nous avons recours à un caisson hypobare qui simule une altitude de 5500 m, équivalente à une pression atmosphérique de 380 mmHg et une PO_2 égale à une $\frac{1}{2}$ atm. Sur le plan hémodynamique, chez le rat hypoxique chronique la PAP_m est augmentée (elle est de l'ordre de 25 à 30 mmHg) par rapport à celle du rat sain (10 mmHg) (Bonnet, Dubuis *et al.*, 2002). Chez la

souris, la pression passe de 10 mmHg chez la souris saine à environ 35 mmHg chez la souris hypoxique chronique (Liu, Zelko *et al.*, 2006).

Au bout des 3 semaines d'hypoxie, les animaux présentent au niveau des artères pulmonaires proximales, une hypertrophie de la média, un léger remodelage adventitial mais pas d'épaississement de l'endothélium. Les artères distales présentent une muscularisation importante (Figure 11). Les conséquences histologiques induites par ce modèle chez les rongeurs sont similaires à celles observées chez les patients du groupe 3. Par ailleurs, l'infiltration macrophagique observée après 8 heures d'hypoxie chez le rat disparaît complètement au bout des 3 semaines. Cette étape d'inflammation en réponse à la vasoconstriction initiale, déclenche la mise en place du processus de remodelage de la média. Par ailleurs, chez la souris, la réaction inflammatoire déclenche une infiltration de polynucléaires neutrophiles et une surexpression de cytokines et de chémokines pro-inflammatoires telles que MCP-1, ICAM-1, Il-6, TNF α et endothéline-1 (Naeije and Dewachter 2007).

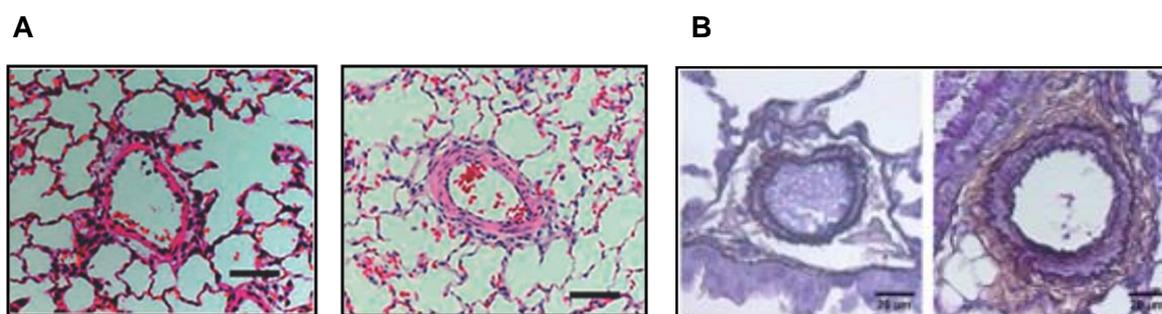


Figure 11: Histopathologie de l'HTP hypoxique chez le rat (A) et chez la souris (B).

(A) Coupes transversales d'artérioles pulmonaires (\varnothing 50-100 μ m) de rat contrôle (à gauche) et de rat exposé à trois semaines d'hypoxie chronique (à droite) (Morimatsu, Sakashita *et al.*, 2012). L'échelle correspond à 50 μ m. (B) Coupes transversales d'artérioles pulmonaires (\varnothing < 100 μ m) de souris contrôles (à gauche) et de souris soumises à trois semaines d'hypoxie chronique (à droite). L'échelle correspond à 20 μ m (Dubois, Delannoy *et al.*, 2013).

III. Les médiateurs vasoconstricteurs de la circulation pulmonaire

La sérotonine (5-HT), l'endothéline-1 (ET-1) et la phényléphrine sont des agonistes vasoconstricteurs de la circulation pulmonaire. Leurs récepteurs appartiennent à la grande famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux petites protéines G hétérotrimériques.

III.1 Sérotonine (5-HT)

La sérotonine (5-HT) est une petite molécule hydrophile de 176 Da qui a été découverte il y a plus de 60 ans comme étant une molécule contenue dans le sérum du sang (-séro) capable de modifier le tonus du muscle lisse (-tonine) (Rapport, Green *et al.*, 1948 ; Erspamer and Asero 1952). Bien que la 5-HT ait été découverte pour son rôle vasoconstricteur au niveau du système cardiovasculaire, son action est principalement connue dans le système nerveux central (SNC), où elle joue un rôle clé dans la régulation de l'appétit, du sommeil, de la mémoire, de l'apprentissage, de la thermorégulation, des comportements et des régulations endocrines.

Des dérégulations de la sécrétion de 5-HT sont impliquées dans de nombreuses pathologies touchant le SNC telles que la dépression, la migraine et la maladie de Parkinson. Au niveau vasculaire, la 5-HT exerce un rôle important dans le maintien de l'homéostasie plaquettaire (pro-agrégant), les fonctions cardiovasculaires et notamment la régulation de la pression artérielle et la motilité du tractus gastrointestinal. Ainsi, le rôle de la 5-HT est de plus en plus étudié dans les maladies cardiovasculaires, telles que l'insuffisance cardiaque, l'athérosclérose, l'hypertension systémique et pulmonaire.

III.1.1 Synthèse et sécrétion

La 5-HT est une amine biogène synthétisée en deux étapes à partir de l'acide aminé L-tryptophane, qui est d'origine alimentaire. Le L-tryptophane subit une première transformation (intermédiaire) (étape limitante de la réaction) en L-5-hydroxytryptophane par l'enzyme tryptophane hydroxylase. Le L-tryptophane est ensuite décarboxylé en 5-hydroxytryptamine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques de type L ([Figure 12](#)) (Mohammad-Zadeh, Moses *et al.*, 2008).

Au niveau du SNC, la 5-HT exerce le rôle essentiel de neuromédiateur et elle est synthétisée par les neurones du raphé présents au niveau du bulbe rachidien. En périphérie, la 5-HT circulante est produite majoritairement par les cellules entérochromaffines de l'intestin. Elle est aussi sécrétée localement par les cellules neuroendocrines pulmonaires et les corps neuroépithéliaux distribués sur les voies aériennes supérieures (MacLean, Herve *et*

al., 2000). De plus, les cellules endothéliales des artères pulmonaires humaines et de rat qui expriment l'enzyme tryptophane hydroxylase de type 1 (tph1) synthétisent la 5-HT (Eddahibi, Guignabert *et al.*, 2006 ; Gairhe, Bauer *et al.*, 2012)

Le taux plasmatique de 5-HT circulante est relativement bas (de l'ordre de 10 nM)(Da Prada and Picotti 1979) car dès sa synthèse, elle subit une internalisation rapide par le transporteur (le 5-HTT) dans les granules denses des plaquettes sanguines. La 5-HT circulante résiduelle atteint le poumon où elle est captée par les cellules endothéliales pulmonaires via les 5-HTT. Enfin, les monoamines oxydases (MAO) hépatiques et pulmonaires (enzymes présentes au niveau de la membrane mitochondriale externe) assurent la dégradation enzymatique de la 5-HT. Ainsi, en conditions physiologiques, le lit vasculaire pulmonaire est exposé à de faibles concentrations de 5-HT. Par contre, lors de l'HTP, le taux circulant de 5-HT est augmenté. En réponse à une hypoxie aiguë des voies aériennes, on observe une augmentation de sécrétion de 5-HT par les cellules pulmonaires neuroendocrines et par les corps neuroépithéliaux des voies aériennes (Johnson and Georgieff 1989). D'autre part, chez les rats hypoxiques chroniques, il existe un dysfonctionnement de l'internalisation de la 5-HT par les 5-HTT au niveau des CE pulmonaires (Jeffery, Bryan-Lluka *et al.*, 2000). Chez les patients HTAP, le taux plasmatique de 5-HT est de l'ordre de 30 nM (Kereveur, Callebert *et al.*, 2000).

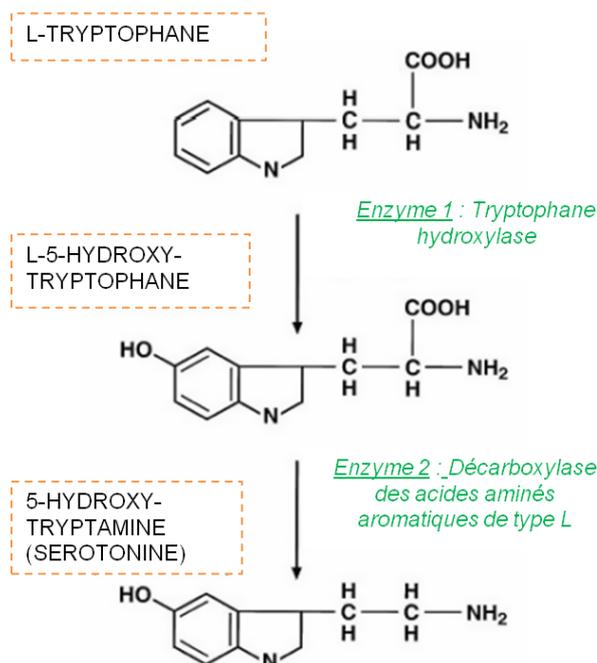


Figure 12: Synthèse de la sérotonine (5-HT).

La 5-HT est synthétisée en deux étapes à partir du L-tryptophane. *D'après (Mohammad-Zadeh, Moses et al., 2008).*

III.1.2 Les récepteurs à la 5-HT

A l'heure actuelle, 14 récepteurs à la 5-HT (R-5-HT) ont été décrits et classés en 7 familles (R-5-HT₁ à R-5-HT₇) au sein desquels il existe différents sous-types. Leur classification est basée sur leur structure moléculaire, leur signalisation intracellulaire associée et leurs propriétés pharmacologiques (Hoyer, Clarke *et al.*, 1994 ; Hoyer, Hannon *et al.*, 2002 ; Pytliak, Vargova *et al.*, 2011). Ils appartiennent tous à la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques (récepteurs métabotropiques) à l'exception des R-5HT₃ qui sont des récepteurs couplés à un canal ionique (échangeur Na⁺/K⁺) et dont l'activation induit une dépolarisation membranaire. Le Tableau 2 résume les différents couplages et modes d'actions des récepteurs à la 5-HT.

Famille	Type	Mécanisme d'action
R-5-HT ₁	Couplés aux protéines G _{i/o}	↓ [AMP _c] _i
R-5-HT ₂	Couplés aux protéines G _{q/11}	↑ [IP ₃] _i et [DAG] _i
R-5-HT ₃	canal ionique Na ⁺ /K ⁺	Dépolarisation
R-5-HT ₄	Couplés aux protéines G _s	↑ [AMP _c] _i
R-5-HT ₅	Couplés aux protéines G _{i/o}	↓ [AMP _c] _i
R-5-HT ₆	Couplés aux protéines G _s	↑ [AMP _c] _i
R-5-HT ₇	Couplés aux protéines G _s	↑ [AMP _c] _i

Tableau 2: Les différentes familles des R-5-HT et leurs couplages respectifs.

↓ [AMP_c]_i: diminution de la concentration intracellulaire d'AMP_c, ↑ [AMP_c]_i: augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP_c, ↑ [IP₃]_i et [DAG]_i: augmentation de la concentration intracellulaire d'IP₃ et de DAG. Abréviations : AMP_c: adénosine monophosphate cyclique, IP₃ : inositol triphosphate, DAG : diacylglycérol. D'après (Pytliak, Vargova *et al.*, 2011).

Au niveau des vaisseaux pulmonaires et systémiques, on retrouve l'expression des ARN_m des récepteurs à la 5-HT de type R-5-HT₁, R-5-HT₂ et R-5-HT₇ (Ullmer, Schmuck *et al.*, 1995). Les R-5-HT₅ et R-5-HT₆ sont exprimés au niveau du système nerveux. Les sous-

populations des familles des récepteurs à la 5-HT ainsi que leurs rôles, leurs agonistes et antagonistes sélectifs sont résumés dans le Tableau 3.

Récepteur	Localisations et rôles	Agonistes	Antagonistes
R-5-HT _{1A}	<p>SNC : agression, anxiété, addiction, appétit, mémoire, impulsivité, humeur, respiration, thermorégulation, comportement sexuel.</p> <p>Système cardiovasculaire : pression sanguine, rythme cardiaque, vasoconstriction</p>	urapidil, yohimbine, ziprasidone, ipsapirone, buspiron, flibanserin, méthysergide	spiperone, alprenolol, asenapine, cyanopindolol, iodocyanopindolol, lecozotan, methiothepin, oxprenolol, pindolol, propranolol
R-5-HT _{1B}	<p>SNC: agression, anxiété, apprentissage, addiction, locomotion, mémoire, humeur, comportement sexuel</p> <p>Vaisseaux : vasoconstriction pulmonaire, vasodilatation systémique</p>	dihydroergotamine, élétriptan, eltoprazine, ergotamine, méthysergide, sumatriptan, zolmitriptan	yohimbine, alprenolol, cyanopindolol, iodocyanopindolol, pindolol, propranolol, GR-127935
R-5-HT _{1D}	<p>SNC : locomotion, anxiété</p> <p>Vaisseaux : vasoconstriction cérébrale</p>	sumatriptan, almotriptan, dihydroergotamine, élétriptan, ergotamine, frovatriptan, méthysergide, naratriptan, rizatriptan, yohimbine, zolmitriptan	ketanserin, metergoline, methiothepin, rauwolscine, ritanserin
R-5-HT _{1E}	SNC : mémoire	élétriptan, méthysergide, tryptamine	méthiothépine
R-5-HT _{1F}	<p>Vaisseaux sanguins : vasoconstriction</p> <p>SNC : locomotion ? Anxiété ?</p>	élétriptan, naratriptan, sumatriptan	méthiothépine
R-5-HT _{2A}	<p>SNC : anxiété, appétit, addiction, cognition, imagination, apprentissage, mémoire, humeur, comportement sexuel, sommeil</p> <p>Vaisseaux : vasoconstriction pulmonaire et systémique</p> <p>Plaquettes : pro-aggrégant</p>	bufotenin, ergonovine, lisuride, mescaline, myristicin, psilocin, psilocybin, yohimbine	aripiprazole, clozapine, cyproheptadine, eplivanserin, etoperidone, iloperidone, kétanserin, méthysergide, mirtazapine, nefazodone, olanzapine, quetiapine, risperidone, ritanserin, trazodone, ziprasidone

R-5-HT _{2B}	<p>SNC : anxiété, appétit, sommeil</p> <p>Tractus gastrointestinal : motilité</p> <p>Vaisseaux : vasodilatation pulmonaire</p>	<p>α-méthyl-5-HT, fenfluramine, LSD (in CNS), norfenfluramine</p>	<p>agomélatine, asénapine, ketansérine, LSD (PNS), méthysergide, ritansérine, tegaserod, yohimbine</p>
R-5-HT _{2C}	<p>SNC : anxiété, appétit, addiction, locomotion, humeur, comportement sexuel, sommeil, thermorégulation</p> <p>Tractus gastrointestinal : motilité</p>	<p>α-méthyl-5-HT, aripiprazole, ergonovine, lorcaserine</p>	<p>eltoprazine, étopéridone, fluoxétine, ketansérine, lisuride, méthysergide, miansérine, mirtazapine, nefazodone, olanzapine, rispéridone, ritansérine, trazodone, ziprasidone</p>
R-5-HT ₃ (R-5-HT _{3A} , R-5-HT _{3B})	<p>SNC, SNP : anxiété, addiction, nausée</p> <p>Tractus gastrointestinal : motilité, nausée</p>	<p>α-méthyl-5-HT, quipazine</p>	<p>alosétron, clozapine, dolasétron, granisétron, mémantine, métoclopramide, miansérine, mirtazapine, olanzapine, ondansétron, quetiapine, tropisétron</p>
R-5-HT ₄ (R-5-HT _{4A-H})	<p>SNC : anxiété, appétit, apprentissage, mémoire, humeur, respiration</p> <p>Tractus gastrointestinal : motilité</p> <p>Système cardiovasculaire : contraction auriculaire et ventriculaire (effet inotrope positif)</p>	<p>cisapride, métoclopramide, mosapride, prucalopride, renzapride, tégaséron, zacopride</p>	<p>L-lysine piboséron</p>
R-5-HT ₅	<p>SNC : Locomotion, sommeil</p>	<p>ergotamine, acide valénérique</p>	<p>asénapine, diméboline, méthiothépine, ritansérine</p>
R-5-HT ₆	<p>SNC : anxiété, cognition, apprentissage, mémoire, humeur</p>	<p>EMD-386.088, EMDT</p>	<p>aripiprazole, asénapine, clozapine, diméboline, ilopéridone, olanzapine</p>

R-5-HT₇	<p>SNC : anxiété, mémoire, humeur, respiration, sommeil, thermorégulation</p> <p>Vaisseaux : vasodilatation</p>	5-carboxytryptamine	<p>aripiprazole, asenapine, clozapine, iloperidone, ketanserin, méthiothepine, olanzapine, ritanserin</p>
---------------------------	---	---------------------	---

Tableau 3: Les sous-populations des familles des récepteurs à la 5-HT.

Résumé de leurs localisations, rôles, agonistes et antagonistes sélectifs. Les R-5-HT en bleu sont exprimés au niveau des vaisseaux artériels pulmonaires et systémiques. *D'après (Pytliak, Vargova et al., 2011).*

III.1.3 Rôles physiologiques de la 5-HT

Les effets physiologiques exercés par la 5-HT dépendent des types de récepteurs activés, des signaux intracellulaires induits en aval via l'activation des récepteurs et leurs localisations cellulaires.

Au niveau des vaisseaux artériels pulmonaires et systémiques, la 5-HT exerce ses effets par son rôle de neuromédiateur au niveau du système nerveux central mais aussi par le biais d'interactions directes avec ses différents récepteurs membranaires. Les récepteurs de la 5-HT (R-5-HT) sont impliqués dans la régulation du tonus vasculaire via la vasoconstriction et la vasorelaxation. De plus, au niveau du muscle lisse des artères pulmonaires, la 5-HT est internalisée via le transporteur de la 5-HT (5-HTT) pour induire la prolifération des CML.

III.1.3.1 Vasoconstriction

Des études de biologie moléculaire ont permis de confirmer l'expression des ARN_m des R-5-HT_{1B} et R-5-HT_{2A} au niveau des CML d'artères pulmonaires humaines (Ullmer, Schmuck *et al.*, 1995). Les travaux utilisant des antagonistes sélectifs de chaque sous-type de récepteurs à la 5-HT ont permis de mettre en évidence l'implication des récepteurs R-5-HT_{1B/D} et 5-HT_{2A} dans la contraction des artères pulmonaires (AP) humaines (MacLean, Clayton *et al.*, 1996 ; Cortijo, Marti-Cabrera *et al.*, 1997 ; Morecroft, Heeley *et al.*, 1999). D'autre part, la 5-HT exerce son action contractile majoritairement via l'activation des R-5-HT_{2A} et, dans une moindre mesure, via les R-5-HT_{1B/D} au niveau des artères intrapulmonaires (AIP) de rats (Rodat-Despoix, Crevel *et al.*, 2008).

Au laboratoire, l'équipe a également décrit le mécanisme cellulaire de la contraction en réponse à la 5-HT dans les AIP de rat. Suite à sa liaison aux R-5-HT_{2A}, la 5-HT induit une augmentation biphasique de la $[Ca^{2+}]_c$ au niveau des CML d'AIP : (1) la phase transitoire est due à une mobilisation calcique suite à l'activation des récepteurs à l'IP₃ du réticulum sarcoplasmique et (2) la phase soutenue est due à un influx calcique provenant des canaux

cationiques non spécifiques, indépendants du potentiel, mais sensibles à la production d'acide arachidonique (Guibert, Marthan *et al.*, 2004 ; Guibert, Ducret *et al.*, 2008).

Au niveau des vaisseaux systémiques, la 5-HT induit une vasoconstriction dépendante de l'activation des R-5-HT_{2A} (Machida, Iizuka *et al.*, 2013).

III.1.3.2 Vasorelaxation

Les R-5-HT_{2B} présents au niveau des cellules endothéliales (CE) sont majoritairement responsables de la relaxation vasculaire. Au niveau des CE pulmonaires humaines, l'activation des R-5-HT_{2B} par la 5-HT induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$. Le calcium active la NO synthase endothéliale (eNOS) afin d'induire une libération du facteur vasorelaxant, le monoxyde d'azote (NO) (Ullmer, Boddeke *et al.*, 1996).

La vasorelaxation des artères pulmonaires porcines est médiée par l'activation des R-5-HT_{2B} des CE et des R-5-HT₇ présents au niveau des CML (Glusa and Pertz 2000 ; Jahnichen, Glusa *et al.*, 2005). Les R-5-HT₇ vasorelaxants sont également présents au niveau du muscle lisse des artères pulmonaires de lapin (Morecroft and MacLean 1998).

Au niveau des vaisseaux systémiques, la vasorelaxation est médiée par les R-5-HT_{1B}.

La Figure 13 résume les différents récepteurs à la 5-HT présents au sein du muscle lisse et de l'endothélium des artères pulmonaires et systémiques.

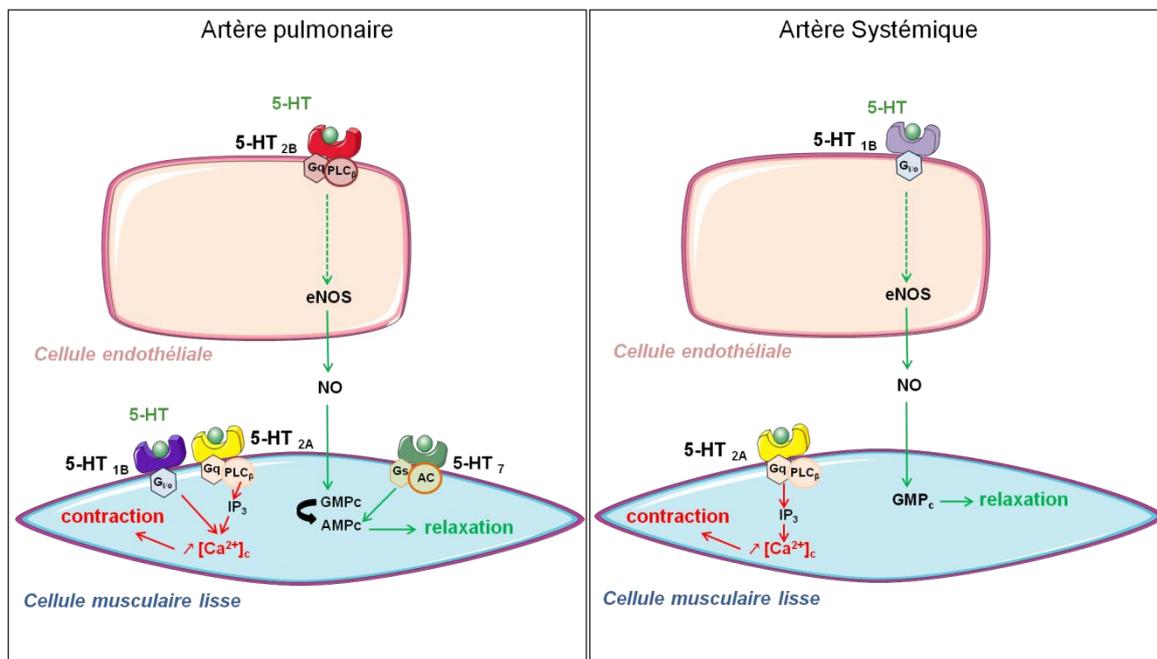


Figure 13: Résumé des différents récepteurs à la 5-HT présents au niveau de la CML et de la CE des artères pulmonaires et systémiques.

Dans l'artère pulmonaire, le R-5-HT_{2B} présent au niveau de la CE médie la relaxation de la CML via la production de NO. Les R-5-HT_{1B} et R-5-HT_{2A} induisent la contraction de la CML suite à une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Le R-5-HT₇ présent au niveau de la CML induit la vasorelaxation via une action directe sur le muscle lisse. Au niveau des vaisseaux systémiques, les R-5-HT_{1B} induisent la relaxation des CML via la voie du NO. Les R-5-HT_{2A} induisent la contraction via une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$.

III.1.4 Le transporteur de la 5-HT (le 5-HTT)

Le transporteur de la 5-HT ou (5-HTT) permet le passage de la 5-HT de l'espace extracellulaire vers le cytoplasme. Le 5-HTT est une protéine à 12 domaines transmembranaires appartenant à la superfamille des transporteurs membranaires Na^+/Cl^- dépendants (Rudnick 2006). Son rôle est particulièrement connu au niveau du système nerveux central où il participe au contrôle du taux de 5-HT dans la fente synaptique. Les 5-HTT sont présents au niveau de la membrane plasmique des corps cellulaires et des terminaisons des neurones sérotoninergiques et assurent la recapture de la 5-HT dans le neurone pré-synaptique. En périphérie, le 5-HTT assure l'internalisation de la 5-HT dans les plaquettes sanguines et participe ainsi au maintien du faible taux de 5-HT circulante (10 nM). L'internalisation plaquettaire de la 5-HT permet de protéger l'organisme de ses effets vasoactifs très puissants. On retrouve l'expression du 5-HTT au niveau du poumon (Murphy, Lerner *et al.*, 2004 ; Adnot, Houssaini *et al.*, 2013).

III.1.4.1 Rôle du 5-HTT au niveau des artères pulmonaires

L'internalisation de la 5-HT via le 5-HTT induit la prolifération des CML d'artères pulmonaires (CML-AP). Ainsi, l'action mitogénique de la 5-HT dans les CML-AP est dépendante de son accumulation intracellulaire et donc de l'activité et/ou de l'expression du 5-HTT (Eddahibi and Adnot 2006). Les voies de signalisation mises en jeu par la 5-HT pour induire ses effets prolifératifs impliquent, entre autres, la voie des MAP kinases via la production d'espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) et l'activation de la voie RhoA/Rho kinase (MacLean, Herve *et al.*, 2000 ; Hyvelin, Howell *et al.*, 2005). La production d'ERO, notamment de l'anion superoxyde par les NADPH oxydases, active les MAP kinases qui induisent en aval la transcription de facteurs nucléaires de croissance tels que c-Fos et GATA-4 menant à l'hyperplasie et à l'hypertrophie des CML-AP (MacLean and Dempsie 2009).

III.1.5 5-HT et pathologie de la circulation pulmonaire

Les effets néfastes de la 5-HT sont essentiellement dus à une libération plaquettaire de 5-HT dans la circulation sanguine, ce qui induit : la thrombogénèse, des spasmes vasculaires et la prolifération des CML. La 5-HT joue un rôle clé dans le développement de l'hypertension pulmonaire, principale pathologie de la circulation pulmonaire.

III.1.5.1 5-HT et Hypertension pulmonaire (HTP)

○ 5-HT et HTP de type idiopathique (Groupe 1)

Dans les années 1980, la prise de médicaments anorexigènes (fenfluramine et dexfenfluramine) inhibant le transport de la 5-HT dans les plaquettes sanguines a provoqué une épidémie d'HTP de type idiopathique (groupe 1) en France et en Belgique. L'inhibition de la capture de la 5-HT par les plaquettes entraîne alors une augmentation de la concentration plasmatique de 5-HT. Ainsi, une étude épidémiologique réalisée aux États-Unis a démontré que la prise de ces anorexigènes pendant plus de trois mois consécutifs augmente le risque de développer une HTP de groupe 1 (Abenhaim, Moride *et al.*, 1996).

Depuis, de nombreuses études réalisées à la fois sur des AP humaines provenant de patients atteints d'HTP de groupe 1 ainsi que sur des modèles expérimentaux de rats souffrant d'HTP de groupe 1 (modèle monocrotaline) ont permis de mieux comprendre le rôle de la 5-HT dans le développement de l'HTP du 1^{er} groupe. Il a notamment été mis en évidence chez l'Homme : une augmentation du taux circulant de 5-HT (Herve, Launay *et al.*, 1995), un polymorphisme du 5-HTT chez ces patients (Eddahibi, Humbert *et al.*, 2001) et une augmentation de l'expression protéique du 5-HTT au niveau du muscle lisse induisant la prolifération des CML (Marcos, Fadel *et al.*, 2004).

Pour le polymorphisme du 5-HTT, l'analyse de la séquence promotrice du gène codant pour le 5-HTT a montré la présence de deux génotypes qui diffèrent par le nombre de répétitions d'un motif en tandem (« L » pour répétition en grand nombre et « S » pour répétition en petit nombre). Les patients atteints d'HTP de groupe 1 présentent une augmentation du génotype LL (Eddahibi, Humbert *et al.*, 2001). De plus, une étude a démontré chez des patients en insuffisance cardiaque gauche, que les patients présentant le génotype LL ont des pressions artérielles pulmonaires systoliques plus élevées que les patients SL. Ainsi, le polymorphisme du 5-HTT influence le degré d'augmentation de la pression artérielle systolique des patients atteints d'insuffisance cardiaque gauche (Haddad, Kudelko *et al.*, 2011).

D'autre part, chez les rats atteints d'une HTP induite par la monocrotaline (MCT), le taux de 5-HT est plus élevé que celui des rats contrôles (Kanai, Hori *et al.*, 1993). Les R-5-HT₂ sont impliqués dans le développement de l'HTP induite par la MCT car le traitement des rats par des inhibiteurs non sélectifs des R-5-HT₂ (MCI-9042 et le DV-7028) diminue le remodelage de la paroi vasculaire, phénomène associé à une diminution de prolifération des CML (Kanai, Hori *et al.*, 1993 ; Miyata, Ito *et al.*, 2000). L'inhibition sélective des R-5-HT_{2A} à l'aide du sarpogrelate hydrochloride en traitement préventif juste après l'injection de la monocrotaline, prévient le développement de l'HTP. En revanche, le traitement curatif par le sarpogrelate hydrochloride n'améliore pas l'HTP induite par la MCT (Hironaka, Hongo *et al.*, 2003). De plus, l'inhibition des 5-HTT par la fluoxétine permet à la fois de prévenir et d'améliorer l'HTP induite par la MCT (Guignabert, Raffestin *et al.*, 2005).

- 5-HT et HTP hypoxique chronique (Groupe 3)

Des données expérimentales de l'équipe d'Eddahibi montrent que dans les CML-AP de rats hypoxiques chroniques, l'expression génique du 5-HTT ainsi que son activité de capture sérotoninergique sont augmentées, potentialisant ainsi l'effet mitogène de la 5-HT (Eddahibi, Fabre *et al.*, 1999). Le rôle du 5-HTT a été élucidé grâce à l'utilisation de souris soit déficientes pour le 5-HTT soit surexprimant le 5-HTT au niveau du muscle lisse (SM22-5HTT⁺). Les souris déficientes en 5-HTT sont protégées contre l'HTP induite par l'hypoxie chronique (Eddahibi, Hanoun *et al.*, 2000). En revanche, les souris SM22-5HTT⁺ développent une HTP spontanée sans aucune stimulation. De plus, chez les souris SM22-5HTT⁺, l'HTP évolue au cours du temps. Les souris SM22-5HTT⁺ âgées de 55 semaines présentent alors une pression systolique ventriculaire droite significativement plus élevée par rapport à celles âgées de 20 semaines (Guignabert, Izikki *et al.*, 2006).

De plus, une hyperréactivité à la 5-HT est observée dans les AP de rats atteints d'HTP hypoxique chronique (MacLean, Sweeney *et al.*, 1996 ; Rodat, Savineau *et al.*, 2007). D'autre part, l'utilisation de souris homozygotes déficientes pour les R-5HT_{2B} (5-HT_{2B}^{-/-}) a

permis de souligner le rôle de la 5-HT dans le développement de l'HTP. Les souris 5-HT_{2B}^{-/-} sont protégées contre les altérations induites par l'hypoxie chronique telles que le remodelage vasculaire pulmonaire et l'augmentation de la pression artérielle pulmonaire. Ce résultat montre l'implication des R-5-HT_{2B} dans le développement de l'HTP hypoxique chronique (Launay, Herve *et al.*, 2002). Il a été par la suite montré que le contrôle du taux de 5-HT par les R-5-HT_{2B} est dépendant de l'activité du 5-HTT. Le mécanisme proposé serait que l'activation des R-5-HT_{2B} par la 5-HT induit une phosphorylation inhibitrice de l'activité du 5-HTT, ce qui diminue la capture sérotoninergique par les CE, induisant ainsi une augmentation du taux circulant de 5-HT (Callebert, Esteve *et al.*, 2006). Par ailleurs, suite à l'hypoxie chronique, les souris déficientes pour les R-5-HT_{1B} (5-HT_{1B}^{-/-}) développent une HTP et un remodelage de la paroi vasculaire moins sévère par rapport aux souris sauvages (Keegan, Morecroft *et al.*, 2001).

D'autre part, il a été démontré expérimentalement que le rat Fawn-Hooded (caractérisé par un défaut héréditaire du stockage sérotoninergique au niveau des plaquettes) développe spontanément une HTP et la sévérité de la pathologie augmente lorsque ces rats sont exposés à de l'hypoxie modérée (PO₂ = 120 mmHg par rapport à 150 mmHg en condition contrôle). En revanche, le rat Tester Moriyama qui possède également un pool déficient de 5-HT au niveau des plaquettes ne développe pas d'HTP suite à une exposition à l'hypoxie modérée (Muramatsu 2001 ; Nagaoka, Muramatsu *et al.*, 2001).

III.2 Endothéline-1

La famille des endothélines humaines comprend 3 peptides endothéline-1, endothéline-2 et endothéline-3 (ET-1, ET-2 et ET-3) qui sont codés par des gènes différents. L'ET-1 correspond à la forme la plus étudiée et c'est également celle qui a un rôle majeur dans le système cardiovasculaire. Il s'agit d'un puissant vasoconstricteur produit par les CE des vaisseaux sanguins. Les 3 peptides diffèrent par leur localisation tissulaire et par leur affinité pour les récepteurs à l'endothéline. L'ET-2 a une expression prédominante dans l'intestin, les ovaires et l'utérus, quant à l'ET-3, elle est exprimée de manière importante au niveau du cerveau, du poumon et de l'intestin.

III.2.1 Synthèse et sécrétion de l'ET-1

L'ET-1 est synthétisée à partir de la pré-pro-endothéline qui a une taille de 203 acides aminés, à partir du gène codant pour l'ET-1. La pré-pro-endothéline est ensuite clivée par une endopeptidase de type furine («furin-like peptidase») en pro-endothéline inactive de 39 acides aminés. La pro-endothéline est enfin clivée par l'enzyme de conversion de l'endothéline-1 (ECE-1) en un peptide de 21 acides aminés biologiquement actif (Levin 1995) (Figure 14).

L'ET-1 est majoritairement produite par les CE vasculaires mais elle est également produite par d'autres types cellulaires, notamment le rein au niveau du canal médullaire interne et d'autres segments du néphron, par les neurones du système nerveux central, les neurones sympathiques post-ganglionnaires et par les monocytes/macrophages (Schneider, Boesen *et al.*, 2007).

Dans les CE, la synthèse de l'ET-1 est soumise à une régulation transcriptionnelle. Elle peut être induite par l'ET-1 elle-même, l'angiotensine II, les catécholamines, la thrombine, les facteurs de croissance, des cytokines, les radicaux libres, l'insuline, l'hypoxie et les forces d'étirement. La synthèse d'ET-1 est inhibée par le NO, les peptides natriurétiques, l'héparine et les prostacyclines (Levin 1995).

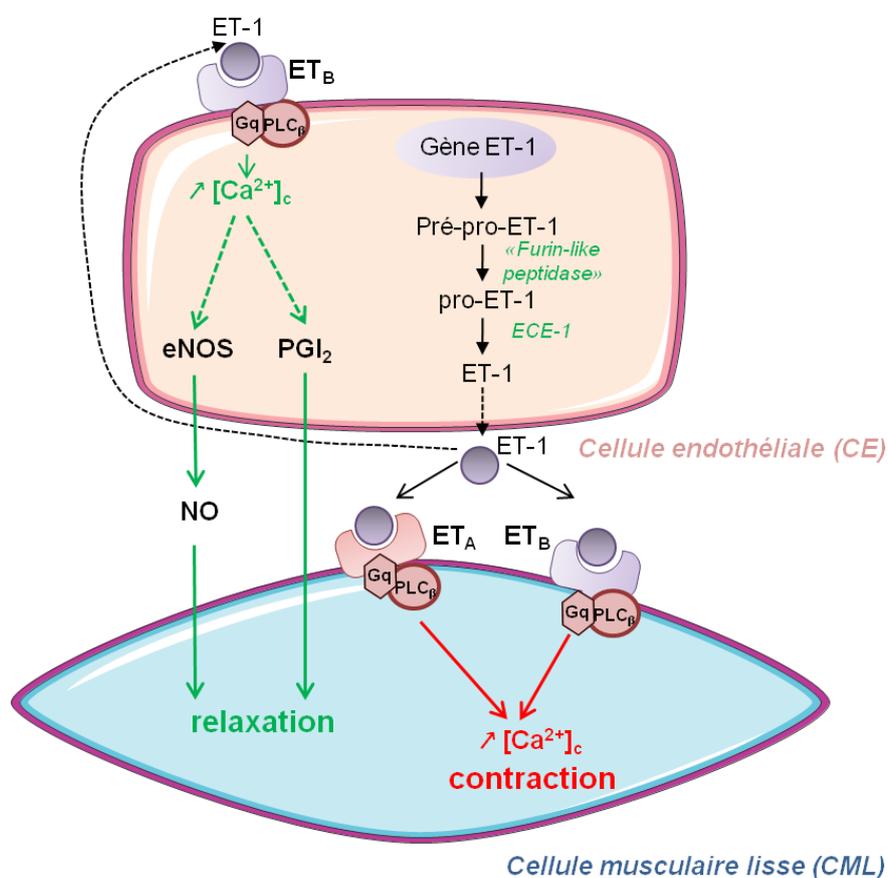


Figure 14: Différentes étapes de la biosynthèse de l'ET-1 et expression des récepteurs à l'ET-1.

L'ET-1 est synthétisée en deux étapes à partir de la pré-pro-endothéline. Les CML vasculaires expriment les ET_A et ET_B et les CE expriment uniquement les ET_B. Au niveau des CE, les ET_B médient une vasorelaxation. L'activation ET_A et ET_B des CML induit une vasoconstriction (Levin 1995 ; Mazzuca and Khalil 2012).

III.2.2 Les récepteurs à l'ET-1

Au niveau des vaisseaux artériels systémiques et pulmonaires, il existe deux types de récepteurs à l'ET-1, les récepteurs de type ET_A et les ET_B. Ils appartiennent à la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G_q (pour revue : Horinouchi, Terada *et al.*, 2013). Les CML vasculaires expriment les récepteurs ET_A et ET_B. En revanche, les CE expriment uniquement les ET_B (Figure 14). Les fibroblastes vasculaires expriment à la fois les ET_A et les ET_B (pour revue : Mazzuca and Khalil 2012).

L'élimination de l'ET-1 de la circulation est très rapide. Une grande partie de l'ET-1 circulante est retenue par le poumon. Les récepteurs ET_B pulmonaires présents au niveau des CE sont fortement impliqués dans la clairance de l'ET-1 circulante (Mazzuca and Khalil 2012). En effet, après un seul passage dans la circulation pulmonaire, la concentration d'ET-1 circulante diminue de 50%. Une étude réalisée par Dupuis et collaborateurs montre que l'inhibition des récepteurs ET_B par leur antagoniste sélectif, le BQ-788, produit une forte diminution de la clairance de l'ET-1 au niveau des vaisseaux pulmonaires. (Dupuis, Stewart *et al.*, 1996). En éliminant l'ET-1 de la circulation, les ET_B présents au niveau des CML et des CE exercent ainsi un rôle protecteur contre les effets vasocontractants et prolifératifs puissants induits par l'activation des ET_A. En effet, la vasoconstriction induite par l'ET-1, suite à l'activation des ET_A, est maintenue dans le temps (Sirvio, Metsarinne *et al.*, 1990 ; Vierhapper, Wagner *et al.*, 1990). Elle est due à la liaison de forte affinité de l'ET-1 pour les ET_A : le complexe ET-1/ET_A possède une durée de vie qui varie entre 7 et 77 heures (Compeer, Meens *et al.*, 2012).

III.2.3 Rôles physiologiques de l'ET-1

Au niveau de la paroi vasculaire, l'ET-1 agit de manière paracrine sur les CML et de façon autocrine sur les CE. Ainsi, en activant les récepteurs ET_B présents au niveau des CE, l'ET-1 induit la production de NO et de prostacyclines (PGI₂) qui possèdent des propriétés vasodilatatrices (Figure 14) (Hirata, Emori *et al.*, 1993).

Au niveau des CML, l'activation des ET_A et ET_B augmente la [Ca²⁺]_c. L'augmentation de la [Ca²⁺]_c induit la vasoconstriction ainsi que la prolifération des CML (Bouallegue, Daou *et al.*, 2007 ; Mazzuca and Khalil 2012 ; Horinouchi, Terada *et al.*, 2013).

III.2.3.1 Contraction cellulaire

Plusieurs études ont élucidé la signalisation calcique mise en jeu par l'ET-1 dans les CML d'AIP de rat en étudiant le type de récepteur activé, les sources de Ca²⁺ et les mécanismes cellulaires impliqués.

L'une des études indique que le signal calcique activé par l'ET-1 se caractérise par un pic suivi de 4 à 6 signaux oscillatoires d'amplitude décroissante. L'utilisation d'antagonistes

spécifiques de chaque sous-type de récepteurs tels que le BQ-123 et le BQ-788, deux antagonistes des R-ET_A et R-ET_B respectivement, a permis d'identifier le sous-type de récepteur impliqué dans la réponse calcique. Les résultats montrent que les R-ET_B sont majoritairement impliqués dans la réponse calcique induite par l'ET-1 dans les CML d'AIP de rat. L'ET-1 induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ essentiellement via l'activation des récepteurs à l'IP₃ du réticulum sarcoplasmique (RS). Le profil oscillatoire correspond à une libération calcique qui se fait de manière cyclique, suite à l'activation et à la régulation biphasique des récepteurs à l'IP₃ du RS. L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ provenant du RS intervient dans la réponse contractile mais contribue aussi à l'activation d'un courant chlore oscillant qui dépolarise la cellule au seuil d'activation des canaux calciques dépendants du potentiel de type L. Cet influx calcique est une composante additionnelle dans la réponse contractile induite par l'ET-1 (Hyvelin, Guibert *et al.*, 1998).

D'autres travaux effectués sur des CML-AP de rat ont montré qu'en plus de la voie de l'IP₃, l'ET-1 peut également activer une voie de signalisation calcique dépendante du NAADP pour « Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate » (Kinneer, Boittin *et al.*, 2004). Ces auteurs montrent que l'exposition des CML-AP à l'ET-1 induit une augmentation de la synthèse de NAADP. Le NAADP se fixe au niveau de ses récepteurs de type « Two Pores Channels » TPC1 et/ou TPC2, présents au niveau de la membrane plasmique des lysosomes (Tugba Durlu-Kandilci, Ruas *et al.*, 2010). Cette fixation active la libération calcique lysosomale et étant donné que les lysosomes sont proches des récepteurs à la ryanodine (RRy) du RS, la faible quantité de calcium provenant du lysosome suffit pour activer les RRy. Par le mécanisme de CICR pour « calcium-induced calcium release », les RRy induisent une amplification de la libération calcique par le RS qui se traduit par des vagues calciques (Kinneer, Boittin *et al.*, 2004).

III.2.3.2 Prolifération des CML vasculaires

En plus de son effet de puissant peptide vasoconstricteur, l'ET-1 possède également des propriétés prolifératives et de croissance cellulaire via l'activation de la voie des MAPK (mitogen activated protein kinase).

L'activation des récepteurs ET_A induit en aval une production de DAG ainsi qu'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$. Le DAG et le Ca^{2+} activent par la suite la protéine kinase C (PKC) qui appartient à la famille des sérine/thréonine kinases. La PKC active la pyk2 qui est une protéine cytoplasmique riche en proline, appartenant à la famille des tyrosines kinases. L'activation de la pyk2 active en aval la voie des MAPK qui stimule ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1 and 2). Les ERK 1/2 activées sont ensuite transloquées dans le noyau où elles induisent l'activation des facteurs de transcriptions tels que le NF- κ B, CREB, C-myc et C-jun. L'activation de la voie MAPK induit alors la prolifération, la croissance ainsi

que la différenciation des CML vasculaires (Bouallegue, Daou *et al.*, 2007 ; Kapakos, Bouallegue *et al.*, 2010).

III.2.4 ET-1 et hypertension pulmonaire (HTP) de groupe 3

Les rats souffrant d'une HTP hypoxique chronique (groupe 3) présentent un taux plasmatique élevé d'ET-1 ainsi qu'une augmentation de l'expression des récepteurs ET_A et ET_B au niveau du poumon entier (Goto 2001). De plus, chez ces rats, le nombre de récepteurs ET_A est augmenté au niveau de la média des artères pulmonaires distales (Pullamsetti and Schermuly 2009).

Par ailleurs, dans le modèle de rat hypoxique chronique, la signalisation mise en jeu dans la réponse vasocontractile est modifiée. En normoxie, la vasoconstriction des artères pulmonaires (AP) induite par l'ET-1 est largement dépendante d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$. Cependant, la vasoconstriction à l'ET-1 des AP hypoxiques chroniques se fait suite à l'activation des R-ET_A via la sensibilisation de l'appareil contractile au Ca^{2+} par la voie RhoA/Rho kinase (Weigand, Sylvester *et al.*, 2006 ; Jernigan, Walker *et al.*, 2008 ; Luke, Maylor *et al.*, 2012). L'activation de la voie RhoA/Rho kinase entraîne l'activation des canaux calciques dépendants du potentiel, induisant un influx calcique (Shimoda, Sham *et al.*, 2000). De plus, chez les rats HTP hypoxiques chroniques, l'activation des R-ET_A entraîne l'inhibition des canaux K^+ dépendants du potentiel, induisant une dépolarisation de la membrane plasmique des CML. Cette dépolarisation membranaire entraîne alors l'ouverture des canaux Ca^{2+} dépendants du potentiel (Li, Fouty *et al.*, 1999 ; Luke, Maylor *et al.*, 2012). Ainsi, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ en condition hypoxique chronique ne présente pas d'oscillations calciques (Bonnet, Belus *et al.*, 2001) comme observé chez les rats normoxiques (Hyvelin, Guibert *et al.*, 1998).

D'autre part, une étude réalisée sur des CML pulmonaires néonatales de rat montre que l'utilisation de sodium nitroprussiate (SNP), un donneur de NO, inhibe la phosphorylation de ERK 1/2 induite par l'ET-1. En revanche, le traitement des CML avec du L-NAME (un inhibiteur de la eNOS) induit la phosphorylation d'ERK 1/2 induite par l'ET-1 ce qui suggère que des altérations du taux de NO peuvent modifier la prolifération induite par l'ET-1. Ainsi, le NO peut contrer l'hyperprolifération des CML induite par l'augmentation du taux d'ET-1 observée lors de l'HTP (Barman 2005).

Enfin, plusieurs essais cliniques sur l'HTP ont montré que le traitement des patients avec l'antagoniste non sélectif des récepteurs ET_A/ET_B (le bosentan) améliore significativement les performances à l'effort, notamment le test de marche de 6 minutes. D'autres études ont bloqué sélectivement les ET_A avec l'ambrisentan et laissé libres les ET_B pour la clairance et la production de NO et de PGI₂. Cependant, ces études n'ont pas montré d'efficacité clinique plus importante que les différents essais thérapeutiques bloquant

les ET_A/ET_B (Rubin, Badesch *et al.*, 2002 ; Barst, Langleben *et al.*, 2004 ; Galie, Badesch *et al.*, 2005). Actuellement, le macitentan (Opsumit®), un antagoniste des ET_A/ET_B est utilisé dans le traitement de l'HTAP (Dhillon 2014). Chez le rat, le macitentan réverse les effets de l'HTAP sévère (Kunita-Takanezawa, Abe *et al.*, 2014).

III.3 Agonistes adrénergiques

Les agonistes adrénergiques regroupent deux catécholamines : l'adrénaline et la noradrénaline. L'adrénaline, aussi appelée épinéphrine, est une hormone libérée dans le sang par les cellules chromaffines de la médullo-surrénale. En revanche, la noradrénaline, également appelée norépinéphrine, est un neurotransmetteur sécrété par les fibres post ganglionnaires du système nerveux orthosympathique. Au niveau cellulaire, l'adrénaline et la noradrénaline agissent au niveau des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G pour réguler de nombreuses fonctions physiologiques de l'organisme (Westcott and Segal 2013). Ces récepteurs sont classés en trois grandes familles que sont les récepteurs α_1 , α_2 et β adrénergiques (voir section 3.2).

III.3.1 Synthèse et sécrétion

Au niveau des fibres nerveuses et de la médullo-surrénale, la noradrénaline est synthétisée à partir de l'acide aminé tyrosine. La tyrosine est hydroxylée en dihydrophénylalanine (L-DOPA) par l'enzyme tyrosine hydroxylase, étape limitante de cette biosynthèse. Ensuite, la L-DOPA est transformée en dopamine par la décarboxylase des acides aminés aromatiques de type L. Enfin, la dopamine est hydroxylée en noradrénaline par la dopamine- β -hydroxylase (Flierl, Rittirsch *et al.*, 2008) (Figure 15).

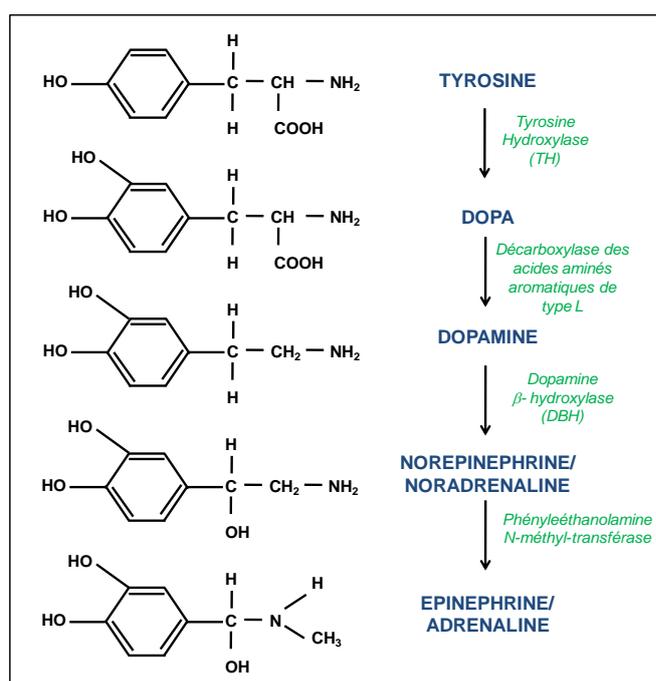


Figure 15: Synthèse de la norépinéphrine/noradrénaline et de l'épinéphrine/adrénaline.

D'après (Flierl, Rittirsch *et al.*, 2008).

Dans la glande médullo-surrénale et uniquement à ce niveau, la noradrénaline est transformée en adrénaline suite à l'action enzymatique de la phényléthanolamine N-méthyl-transférase, qui est une enzyme essentiellement localisée au niveau des cellules chromaffines de la médullo-surrénale (Pohorecky, Zigmond *et al.*, 1969). L'adrénaline libérée est alors véhiculée par la circulation sanguine et agit au niveau des récepteurs membranaires présents au niveau des tissus périphériques.

Au niveau du système nerveux, la noradrénaline synthétisée est stockée dans des granules de stockage ancrés à la membrane plasmique des terminaisons nerveuses pré-synaptiques. Ce stockage lui confère une protection contre la dégradation enzymatique. Suite à une stimulation de ces fibres nerveuses, une sécrétion rapide de noradrénaline a lieu dans la fente synaptique. Le pool de noradrénaline libéré est en majeure partie éliminé par recapture au niveau du neurone pré-synaptique. Seulement une faible partie de la noradrénaline est dégradée en métabolites inactifs (catécholamines) par l'action des monoamines oxydases (MAO) mitochondriales et des catéchol-O-méthyl-transférases cytosoliques présentes au niveau hépatique. Ces métabolites sont ensuite excrétés dans l'urine. Enfin, une partie agit au niveau des récepteurs neuronaux post synaptiques.

III.3.2 Les récepteurs adrénérgiques

Il existe neuf sous-types de récepteurs adrénérgiques classés en trois familles : les récepteurs α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) et β (β_1 , β_2 et β_3) (Ahlquist 1948 ; Bylund, Eikenberg *et al.*, 1994). Ce sont tous des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérotrimériques, liant le GTP. Chaque famille de récepteurs adrénérgiques induit une voie de signalisation spécifique qui est dépendante du type de protéine G avec laquelle le récepteur interagit.

III.3.2.1 Les récepteurs α -adrénérgiques (α -AR)

○ Les agonistes α_1 -AR

Les agonistes α_1 -AR appartiennent à deux grandes familles : les phénéthylamines et les imidazolines (Figure 16). Les phénéthylamines regroupent la norépinéphrine/épinéphrine et la phényléphrine. Dans la famille des imidazolines on retrouve la cirazoline et l'oxymétazoline (Perez 2007). Etant donné que les agonistes endogènes (épinéphrine et norépinéphrine) ne sont pas sélectifs d'un type de récepteur spécifique, de nombreux agonistes présentant une meilleure sélectivité pour les α_1 -AR ont été synthétisés, notamment la phényléphrine.

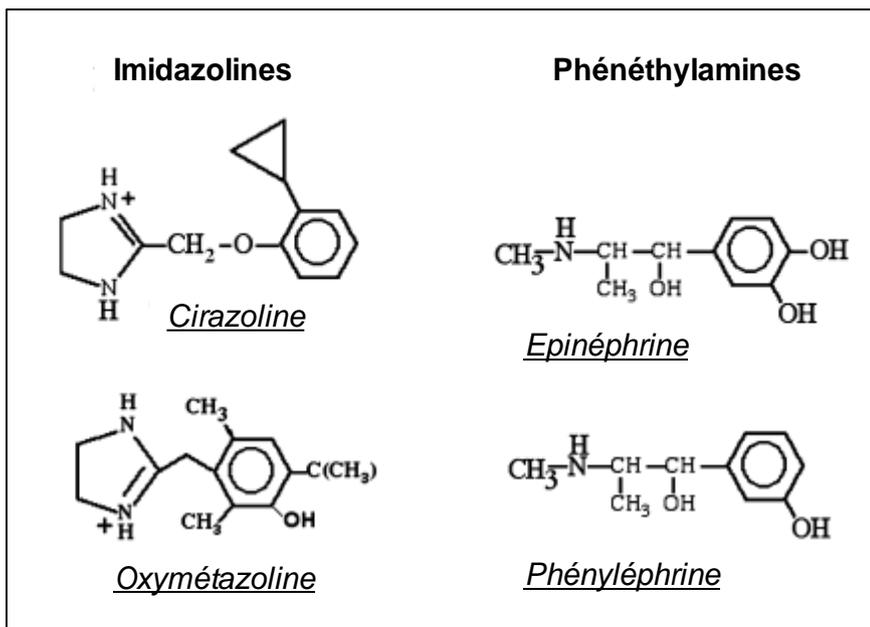


Figure 16: Structures chimiques des agonistes α -AR.

La famille des imidazolines regroupe la cirazoline et l'oxymétazoline et la famille des phénéthylamines regroupe l'épinéphrine et la phényléphrine *D'après (Perez 2007).*

○ Rôles physiologiques des α_1 -AR au niveau vasculaire

Au niveau vasculaire, la phényléphrine (agoniste synthétique des α_1 -AR) agit à la fois au niveau des CML et des CE. Dans les CML d'artères systémiques et pulmonaires, la contraction à la phényléphrine est médiée par l'activation des α_{1D} -AR (Hussain and Marshall 1997). Les α_{1D} -AR sont couplés aux protéines G_q . Leur activation induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ via la voie de l' IP_3 responsable de la contraction des CML (Salvi 1999).

En plus de leurs actions vasoconstrictrices au niveau des CML, les α_{1D} -AR exprimés au niveau des CE des artères mésentériques peuvent induire la relaxation dépendante du NO endothélial en réponse à la phényléphrine (Filippi, Parenti *et al.*, 2001).

L'augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$ active en parallèle la PKC, activant en aval les MAPK. L'activation de la voie des MAPK induit la prolifération des CML vasculaires (Salvi 1999).

○ α_1 -AR et HTP

Les α_1 -AR interviennent dans la mise en place de l'HTP car ils sont impliqués dans l'augmentation de la vasocontraction et de la prolifération des CML (Salvi 1999).

En normoxie, les CML d'AP ont une expression basale de la protéine HIF-1 α , mais celle-ci est dégradée par le protéasome.

Lorsque ces cellules sont exposées à l'hypoxie aiguë, HIF1 α s'accumule et n'est plus dégradé par le protéasome. HIF-1 α se lie alors à HIF-1 β (isoforme constitutivement active)

pour former l'hétérodimère HIF-1 qui est transloqué dans le noyau. HIF-1 se lie alors au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE : hypoxia response elements) présents au niveau de la région régulatrice de plusieurs gènes (Burroughs, Kaluz *et al.*, 2013), notamment les gènes codant pour les α_1 -AR, le VEGF ou le PDGF. Ce phénomène intervient alors dans l'augmentation de l'activité transcriptionnelle du gène codant pour les α_1 -AR (Figure 17) (Yu, Frid *et al.*, 1998). De plus, la liaison de HIF-1 à l'ADN active également la transcription de facteurs de croissance tels que le VEGF « vascular endothelium growth factor » et le PDGF « platelet derived growth factor » qui interviennent dans l'augmentation de la prolifération des CML vasculaires (Figure 17).

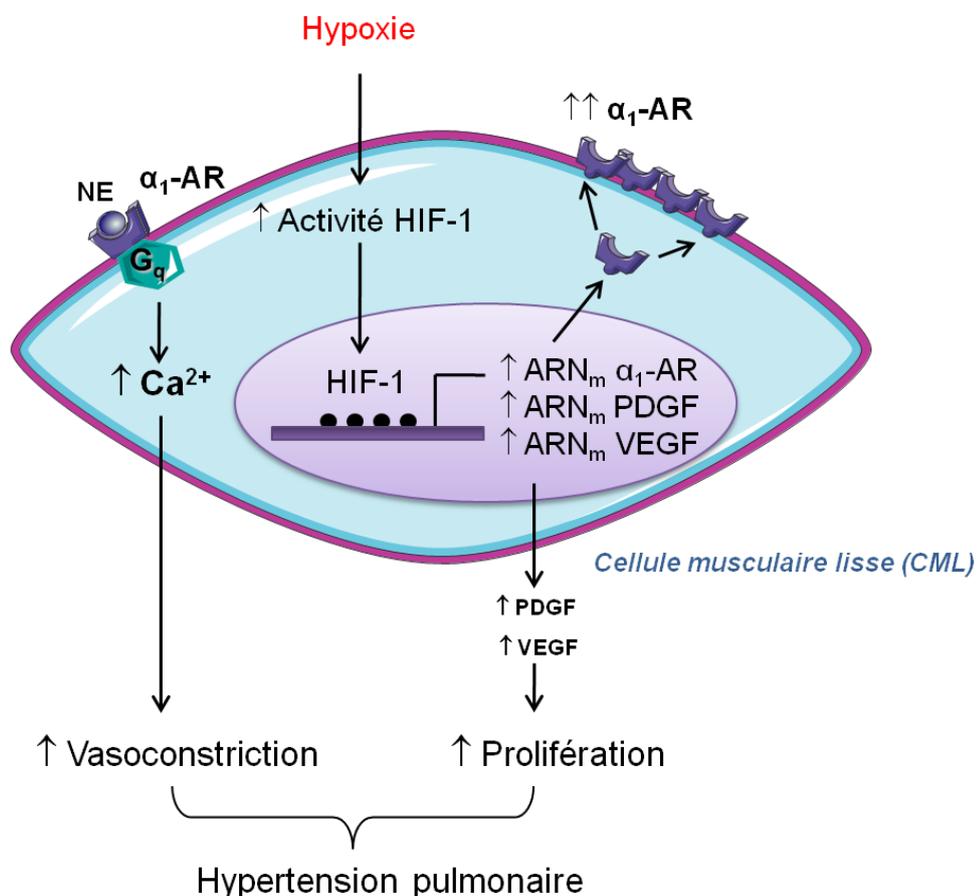


Figure 17: L'hypoxie augmente l'expression des α_1 -AR.

L'hypoxie augmente l'activation du facteur de transcription HIF-1. HIF-1 active la transcription des gènes codant pour les α_1 -AR, le PDGF et le VEGF. NE : Norépinéphrine, HIF-1 : Hypoxia Inducible Factor 1, PDGF : Platelet Derived Growth Factor, VEGF: Vascular endothelial Growth Factor. *D'après (Salvi 1999).*

Par ailleurs, l'hypoxie chronique augmente le taux de norépinéphrine circulante (puissant agoniste α_1/α_2 -AR) via une augmentation de la transcription et de la stabilité de l'ARN_m de l'enzyme tyrosine hydroxylase (voir chapitre III.section 3.1) (Millhorn, Raymond *et*

al., 1997). L'augmentation du nombre de α_1 -AR ainsi que l'augmentation du taux de norépinéphrine circulante induisent une stimulation excessive des α_1 -AR conduisant à une augmentation de la contraction et de la prolifération des CML, deux conséquences majeures de l'HTP.

L'utilisation de souris KO homozygotes (Knock Out) α_{1B} -AR^{-/-} et α_{1D} -AR^{-/-} ont mis en évidence l'implication des α_{1B} -AR et des α_{1D} -AR dans l'HTP. En effet, la stimulation des α_{1B} -AR et des α_{1D} -AR par la norépinéphrine/épinéphrine contribue au remodelage vasculaire pulmonaire, phénomène observé dans l'HTP hypoxique. De plus, la stimulation des α_{1D} -AR contribue de manière plus importante que la stimulation des α_{1B} -AR au remodelage vasculaire pulmonaire (Faber, Szymeczek *et al.*, 2007). D'autre part, les α_{1A} -AR ne sont pas exprimés dans les vaisseaux pulmonaires de souris (Rokosh and Simpson 2002).

- Les α_2 -AR : pharmacologie

Comme pour les α_1 -AR, de nombreuses molécules présentant une meilleure affinité pour les α_2 -AR ont été synthétisées. Parmi cet ensemble de molécules, on trouve des agonistes, tels que la clonidine, la guanfacine et des antagonistes, tels que la yohimbine et la rauwolscine.

- Rôles physiologiques des α_2 -AR au niveau vasculaire

Les récepteurs α_2 -AR sont couplés aux protéines G_i et leur activation conduit à une diminution de l'AMP cyclique (AMP_c) via une inhibition de l'activité de l'adénylate cyclase. Cette diminution de la concentration en AMP_c conduit à une augmentation de la [Ca²⁺]_c. Au niveau des CML, les α_2 -AR sont impliqués dans la vasoconstriction alors qu'au niveau des CE, ils sont impliqués dans la vasodilatation dépendante du monoxyde d'azote (NO) (Miller and Vanhoutte 1985 ; Pepke-Zaba, Higenbottam *et al.*, 1993).

Les α_2 -AR sont exprimés au niveau des CML d'artères pulmonaires (AP) de mouton et ils sont impliqués dans la réponse contractile induite par la guanfacine. La contraction est majoritairement dépendante d'une libération de Ca²⁺ du RS avec une petite contribution de l'influx calcique extracellulaire médié par les canaux Ca²⁺ dépendants du potentiel (de type L) (Sathishkumar, Ross *et al.*, 2006).

- α_2 -AR et HTP

A l'heure actuelle, aucune étude ne démontre le rôle des α_2 -AR dans la pathologie de l'HTP.

III.3.3 Les récepteurs β -adrénergiques (β -AR)

- Les β -AR : pharmacologie

La norépinéphrine et l'épinéphrine se lient aux β -AR mais avec des affinités différentes. La norépinéphrine possède une plus forte affinité pour les β_1 -AR tandis que l'épinéphrine se lie préférentiellement aux β_2 -AR. Néanmoins, l'isoprénaline (agoniste synthétique), aussi appelée isoproterenol, est un agoniste non sélectif des β -AR car il possède la même affinité pour les β_1 -AR et β_2 -AR. Ainsi, lors des études expérimentales, l'isoprénaline est utilisée de manière classique pour activer les β -AR (Hoffmann, Leitz *et al.*, 2004). Parmi les molécules pharmacologiques synthétiques, on retrouve, entre autres, le procaterol (un agoniste sélectif des β_2 -AR), le CG20712A et l'ICI118551, deux antagonistes des β_1 -AR et β_2 -AR respectivement.

- Rôles des β -AR au niveau vasculaire

Les récepteurs β -AR sont couplés aux protéines G_s et leur activation induit l'activation de l'adénylate cyclase et augmente la production d'AMP cyclique. Au niveau vasculaire pulmonaire, les β -AR sont impliqués dans la vasorelaxation des CML. Les β_1 -AR sont exprimés au niveau des CML et des CE des artères extra-pulmonaires de souris. En revanche, les β_2 -AR sont exprimés uniquement au niveau des CE. Chez la souris, les β_1 -AR médient une relaxation indépendante de l'endothélium mais dépendante de l'activation de la voie AMPc/PKA (Leblais, Delannoy *et al.*, 2008). En revanche, les β_2 -AR présents au niveau des CE induisent une relaxation dépendante de l'endothélium via une production de NO suite à l'activation de la NO synthase (NOS) endothéliale (Leblais, Delannoy *et al.*, 2008). Par ailleurs, en plus de leur couplage aux protéines G_s , les β_2 -AR sont capables de se coupler également aux protéines $G_{i/o}$. La stimulation des β_2 -AR couplés aux $G_{i/o}$ induit la voie Src-kinase et l'activation de la NOS endothéliale. La NOS endothéliale activée produit du NO qui induit une vasorelaxation via l'activation de la voie de signalisation guanylate cyclase/GMP cyclique (Banquet, Delannoy *et al.*, 2011).

- β -ARet HTP

Le nébivolol (antagoniste des β_1 et agoniste des β_2/β_3) diminue la prolifération des CE et des CML d'AP issues de rats souffrant d'une HTAP induite par la monocrotaline. En revanche, le metoprolol, un antagoniste β_1 sélectif n'a pas d'effet sur la prolifération. De plus, le nébivolol, contrairement au metoprolol, diminue l'augmentation de la sécrétion d'ET-1 par les CE d'AP de rats HTAP (Perros 2014).

IV. Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO)

Tous les types cellulaires des parois vasculaires (CE, CML et fibroblastes adventitiels) sont des sources importantes d'ERO et plusieurs études ont démontré le rôle des ERO dans la physiologie et la physiopathologie vasculaires. Au niveau du système cardiovasculaire, les ERO exercent un rôle physiologique important dans le maintien de l'intégrité cardiaque et vasculaire et un rôle physiopathologique dans les dysfonctions cardiovasculaires, telles que l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire, l'athérosclérose, le diabète et l'ischémie-reperfusion (Landmesser and Harrison 2001 ; Zalba, San Jose *et al.*, 2001). Le stress oxydatif est l'une des causes principales de la survenue de ces différentes pathologies. Le stress oxydatif survient lorsque les ERO sont produites en quantité importante ce qui est essentiellement dû à une augmentation de leurs synthèses et/ou à une diminution de leurs dégradations (Touyz and Schiffrin 2004).

Par ailleurs, au niveau de la paroi artérielle pulmonaire de rat, la 5-HT augmente la quantité d'ERO, notamment l' $O_2^{\cdot-}$ au niveau du muscle lisse (Billaud, Marthan *et al.*, 2009).

IV.1 Définition des ERO

Les espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) sont une famille de molécules résultant de la réduction de l'oxygène moléculaire (O_2). Elles sont classées selon leurs propriétés chimiques car elles sont de deux natures différentes : **radicalaire** ou **non radicalaire**. Les dérivés de **nature radicalaire** regroupent l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$) et le radical hydroxyle OH^{\cdot} . Les oxydants de nature **non radicalaire** regroupent le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les peroxynitrites ($ONOO^{\cdot-}$), l'acide hypochlorique ($HOCl$), l'ozone (O_3), l'oxygène singulet 1O_2 et les peroxydes lipidiques (LOOH) (Freund-Michel, Guibert *et al.*, 2013) (Figure 18). Les espèces radicalaires se différencient des espèces non radicalaires par la présence d'électron célibataire non apparié sur leurs orbitales externes, ce qui leur confère une très haute réactivité chimique vis-à-vis d'autres composés, notamment les lipides, protéines et acides nucléiques (Aprioku 2013).

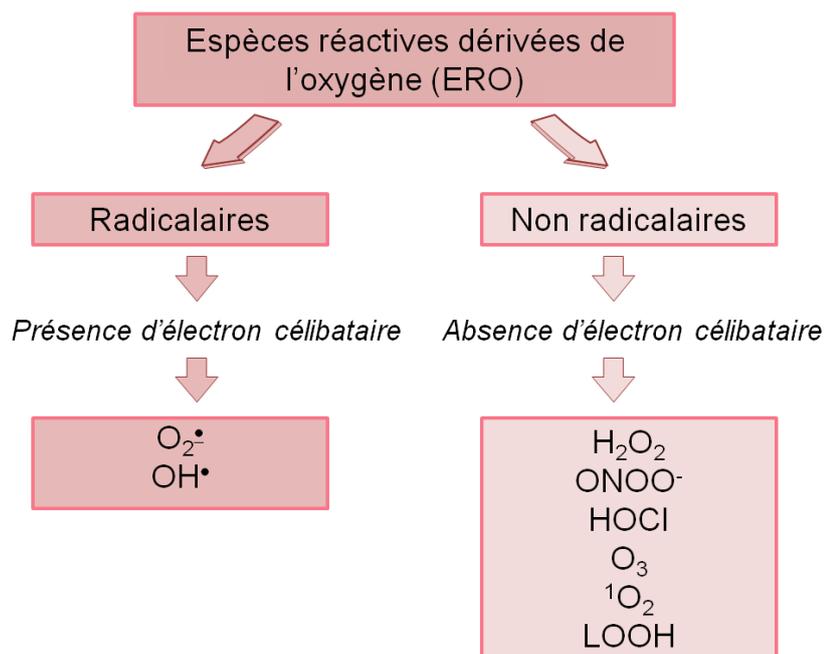


Figure 18: Résumé des différentes espèces réactives dérivées de l'oxygène (ERO) de nature radicalaire et non radicalaire.

D'après (Freund-Michel, Guibert *et al.*, 2013).

IV.2 Rôles biologiques des ERO

Les ERO exercent des rôles importants dans de nombreux processus physiologiques tels que la destruction bactérienne intracellulaire par les granulocytes neutrophiles (Victor, Rocha *et al.*, 2004 ; Anas, Wiersinga *et al.*, 2010), la détoxification hépatique, la production de prostaglandines. Elles interviennent également dans les processus de signalisation cellulaire (Cadenas 2004 ; Pacher, Beckman *et al.*, 2007). Dans les systèmes biologiques, l' $O_2^{\bullet -}$ est l'espèce la plus produite et c'est l'ERO qui fait l'objet d'étude de ma thèse.

IV.3 L'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$)

A l'état fondamental, l' O_2 est un bi radical contenant deux électrons non appariés à spins parallèles. La réduction complète de l' O_2 en H_2O par le transfert séquentiel d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, permet la génération de l' $O_2^{\bullet -}$ ainsi que d'autres ERO intermédiaires telles que l' H_2O_2 et l' OH^{\bullet} .

L' $O_2^{\bullet -}$ est produit par la réduction mono-électronique de l'oxygène moléculaire (O_2). La présence de cet électron libre confère une instabilité énergétique à l' $O_2^{\bullet -}$ et provoque donc sa réaction rapide avec d'autres molécules, notamment le NO pour former des $ONOO^-$ (Martinez and Andriantsitohaina 2009) (Figure 19). De plus, il est rapidement dégradé de par sa demi-vie très courte (de l'ordre de la μs) (Bienert, Schjoerring *et al.*, 2006). Par ailleurs,

étant une espèce chargée négativement, l' $O_2^{\bullet-}$ ne traverse pas librement la membrane plasmique.

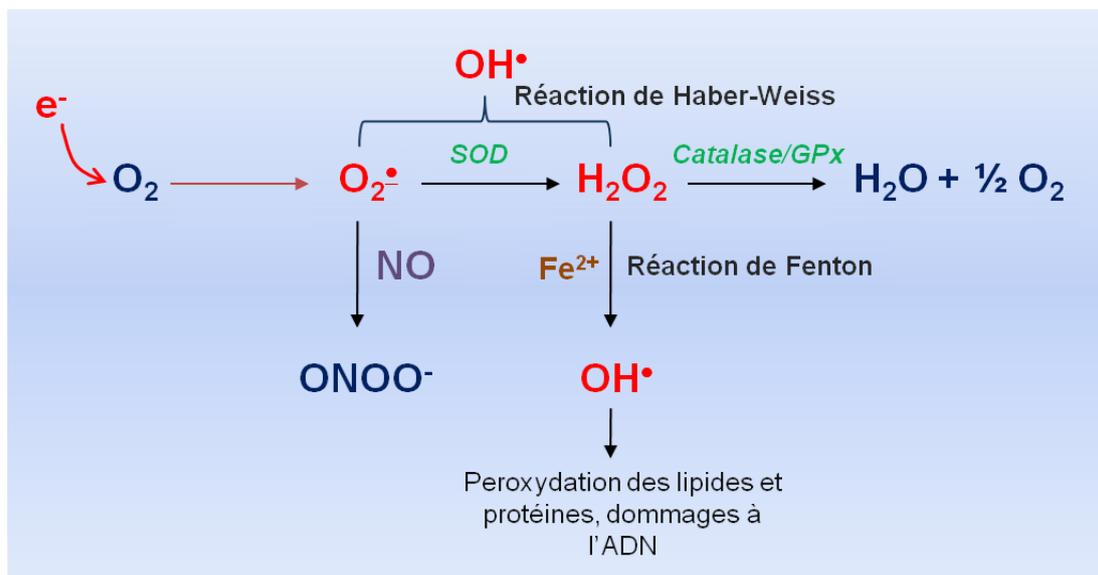


Figure 19: Schéma de la réduction complète de l' O_2 en H_2O : synthèse des ERO.

(D'après Zakhari 2013). GPx : Glutathion peroxydase, SOD : Superoxyde dismutase.

L' H_2O_2 résulte de la dismutation de l' $O_2^{\bullet-}$ par la superoxyde dismutase (SOD). Contrairement à l' $O_2^{\bullet-}$, elle possède une stabilité beaucoup plus grande et une demi-vie plus longue (de l'ordre de la milliseconde) et possède la capacité de passer librement à travers les membranes hydrophobes. L' H_2O_2 est dégradée en O_2 par la catalase. La glutathion peroxydase (GPx) peut aussi dégrader l' H_2O_2 (Mates and Sanchez-Jimenez 1999 ; Bienert, Schjoerring *et al.*, 2006) (Figure 19).

L' OH^{\bullet} est formé via la réaction du fer sous sa forme réduite (Fe^{2+}) avec l' H_2O_2 par la réaction de Fenton. Il peut également être formé via l'interaction de l' $O_2^{\bullet-}$ avec l' H_2O_2 par la réaction d'Haber-Weiss. Le radical OH^{\bullet} est extrêmement instable et il est considéré comme l'ERO la plus réactive. De plus, il est capable de réagir rapidement et de manière non spécifique avec la plupart des molécules biologiques. Malgré son temps de demi-vie très court (de l'ordre de la nanoseconde), il peut causer des dommages graves à la fois au niveau cellulaire et au niveau des structures intracellulaires car il peut former des liaisons covalentes avec des molécules biologiques variées. L' OH^{\bullet} crée ainsi des dommages cellulaires en transformant la molécule cible (lipides, protéines, ADN) en radical libre très réactif. Ce radical nouvellement formé peut alors interagir avec d'autres molécules cibles déclenchant ainsi des réactions en chaîne. Les réactions en chaîne représentent l'un des

plus grands dangers du radical OH^\bullet . En revanche, H_2O_2 et $\text{O}_2^{\bullet-}$ ne sont pas suffisamment réactifs pour déclencher des réactions en chaîne (Lau, Wang *et al.*, 2008 ; Aprioku 2013).

IV.4 Les sources de production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$

Chez les mammifères, au niveau cellulaire, les sources enzymatiques d'ERO regroupent les NADPH oxydases (NOX), la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM), la xanthine oxydase (XO), la NO synthase (NOS) découplée et le cytochrome P450. D'autres enzymes telles que les lipoxygénases, cyclooxygénases, les peroxydases, ainsi que les hémoprotéines (hème/hématine) peuvent être sources d'ERO (Griendling, Sorescu *et al.*, 2000).

Au niveau de la paroi vasculaire pulmonaire, les principales sources d'ERO sont les NOX, la CRM, la XO et la NOS endothéliale découplée (Li and Shah 2004 ; Lyle and Griendling 2006). Par ailleurs, la demi-vie très courte et la haute réactivité des ERO ont permis d'émettre l'hypothèse que ces molécules oxydantes sont produites et exercent leurs actions dans des espaces restreints appelés microdomaines de signalisation (Davidson and Duchon 2006). Même si le concept de microdomaine de signalisation d'ERO n'est pas encore clairement établi, la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ a été observée dans des régions confinées au niveau de la membrane plasmique et au niveau des zones entourant la mitochondrie (Zorov, Filburn *et al.*, 2000 ; Cortassa, Aon *et al.*, 2003 ; Brady, Elmore *et al.*, 2004 ; Davidson and Duchon 2006 ; Garcia-Perez, Roy *et al.*, 2012 ; Siddall, Yellon *et al.*, 2013).

L' $\text{O}_2^{\bullet-}$ est produite via différentes voies de signalisation à la fois en intracellulaire et en extracellulaire (voir Chapitre IV section 4.1 et 4.2). La mitochondrie est la source principale d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ intracellulaire, alors que les NOX sont la source principale d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ extracellulaire (Figure 20).

IV.4.1 Les NADPH Oxydases (NOX)

Les NOX sont des complexes enzymatiques composés de plusieurs sous-unités qui catalysent la production d' $\text{O}_2^{\bullet-}$ à partir de la réduction de O_2 en utilisant le NADPH (forme réduite du NADP « nicotinamide adénine dinucléotide phosphate ») comme donneur d'électrons (Sedeek, Hebert *et al.*, 2009).

La famille des NOX comprend 7 membres, NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1 et DUOX2 (Brandes, Weissmann *et al.*, 2010). Elles diffèrent toutes selon leur mode d'activation, expression et/ou interaction avec d'autres protéines. NOX2 est le prototype phagocytaire des NOX. Par la suite, plusieurs homologues de NOX2 ont été découverts, notamment NOX1, NOX4 et NOX5.

NOX2 est composée de deux sous-unités ancrées à la membrane plasmique, le gp91^{phox} et le p22^{phox}. Le gp91^{phox} est une glycoprotéine de 91 kDa et elle correspond à la

sous-unité catalytique qui fixe les flavines et le nicotinamide (aussi appelée NOX2). Le gp91^{phox} est associé à p22^{phox}, une protéine de 22 kDa. L'association de gp91^{phox} à p22^{phox} forme un complexe hétérodimère appelé cytochrome b₅₅₈. Enfin, trois sous-unités cytosoliques p40^{phox}, p47^{phox} et p67^{phox} s'associent à NOX2. L'activité des NOX2 nécessite également la présence de petites protéines G (Rac1) (Figure 20).

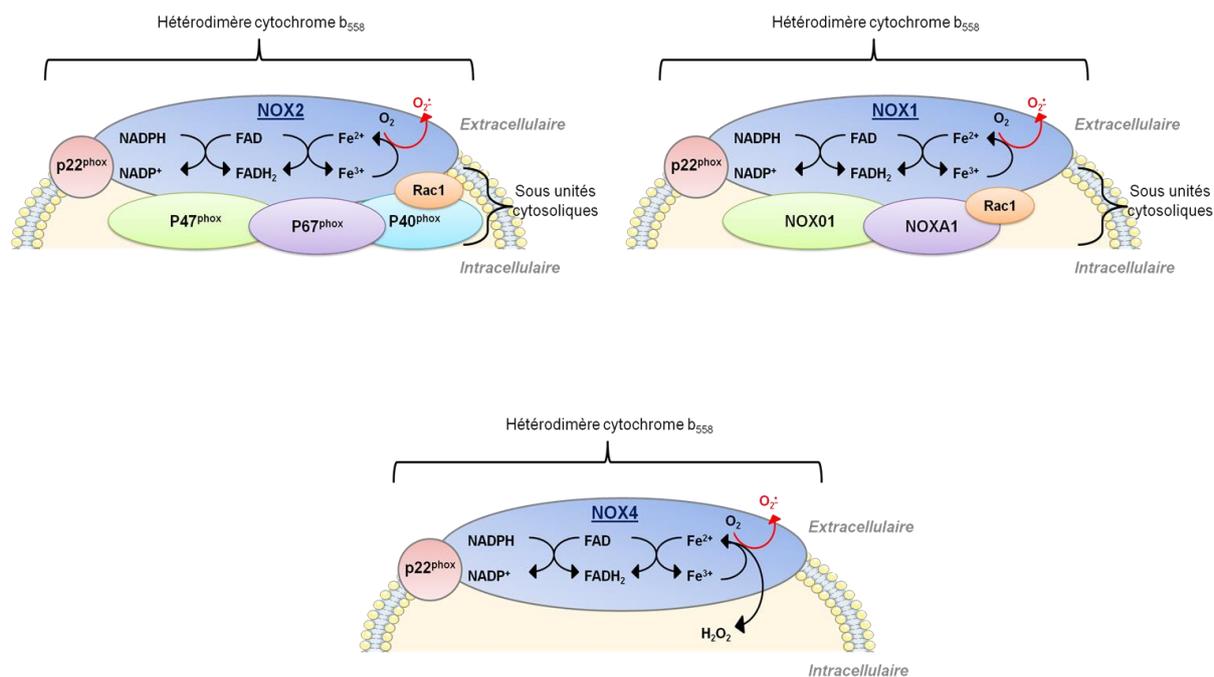


Figure 20: Représentation schématique des composants de NOX2, NOX1 et NOX4.

Le segment transmembranaire des NOX contient 2 molécules d'hème qui permettent le transfert des e⁻ du NADPH à l'O₂ via le nucléotide flavine-adénine (FAD), permettant ainsi la production d'O₂⁻. D'après (Selemidis, Sobey et al., 2008).

NOX1 est l'homologue le plus proche de NOX2 et son activité est dépendante de la présence de la sous unité membranaire p22^{phox} ainsi que des deux sous-unités cytosoliques NOXO1 (« NOX organiser 1 » : analogue de p47^{phox}), NOXA1 (« NOX activator 1 » : analogue de p67^{phox}). L'activation des NOX1 nécessite l'association des sous-unités cytosoliques au cytochrome b₅₅₈ suite à leur translocation membranaire en réponse à une phosphorylation de NOXO1. Comme les NOX2, l'activité des NOX1 est dépendante de la présence de Rac1 (Figure 20).

NOX4 a initialement été appelée RENOX pour « renal oxydase » car son expression est abondante dans les reins. L'activité de NOX4 diffère de l'activité de NOX1 et de NOX2 car elle produit de l'H₂O₂ directement alors que NOX1 et NOX2 produisent d'abord l'O₂⁻ qui

est ensuite converti en H_2O_2 . De plus, l'activité de NOX4 nécessite seulement la présence de la sous-unité membranaire p22phox et ne dépend pas de la présence des sous-unités cytosoliques ou des petites protéines G. NOX4 est la seule isoforme des NOX qui possède une production constitutive d' H_2O_2 (Figure 20).

Enfin **NOX5** est exprimée chez l'humain mais pas chez les rongeurs. Contrairement aux autres NOX, l'activité enzymatique de NOX5 ne dépend pas de p22^{phox} et des sous-unités cytosoliques. Cependant, il s'agit de la seule isoforme dont l'activité est régulée par le Ca^{2+} de par la présence de 4 domaines de liaison au Ca^{2+} de type EF-Hand au niveau de son domaine N-terminal.

Les vaisseaux pulmonaires expriment NOX2 et NOX4 au niveau des trois types cellulaires (CE, CML et fibroblastes adventitiels), NOX4 étant l'isoforme exprimée de façon prédominante. Uniquement les CML expriment l'isoforme NOX1 (Figure 21). Au niveau de la paroi des vaisseaux systémiques, on retrouve l'expression des NOX1, NOX2 et NOX4 (Amanso and Griendling 2012). Une étude montre qu'au niveau des CML d'aorte, les NOX1 sont localisées au sein de microdomaines de signalisation, tels que les cavéoles (Hilenski, Clempus *et al.*, 2004).

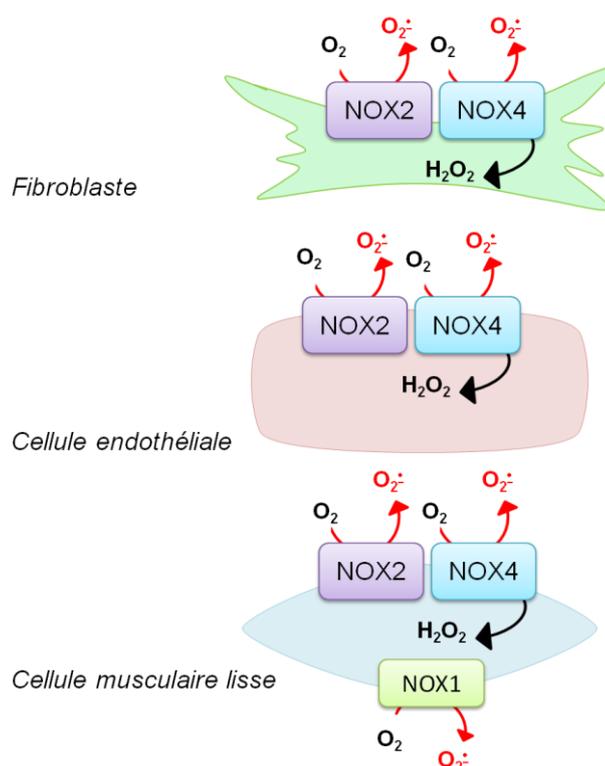


Figure 21: Expression des différentes isoformes des NOX au niveau des trois types cellulaires des vaisseaux pulmonaires.

D'après (Freund-Michel, Guibert et al., 2013).

IV.4.1.1 Le devenir de l'O₂^{•-} produit par les NOX

De par la demi-vie très courte de l'O₂^{•-} et la présence d'une isoforme de SOD extracellulaire, (SOD3 ou SOD-EC), il est suggéré que l'O₂^{•-} produit par les NOX est rapidement dismuté en H₂O₂ dans l'espace extracellulaire. Etant une molécule lipophile, l'H₂O₂ diffuse rapidement à travers la membrane plasmique cellulaire et exerce ses effets oxydants en intracellulaire. Ainsi, en se basant sur la nature lipophile et la stabilité plus grande de l'H₂O₂ par rapport à l'O₂^{•-}, il a été suggéré que l'H₂O₂ est la molécule centrale dans la mise en place du stress oxydant. Cependant, il est de plus en plus admis que l'O₂^{•-} produit en extracellulaire par les NOX a un effet en intracellulaire, ce qui a conduit à l'identification de protéines candidates pour le transport de l'O₂^{•-} à travers la membrane plasmique (Billaud, Lohman *et al.*, 2014).

IV.4.1.2 Les protéines candidates pour le transport des ERO à travers la membrane plasmique

○ Les canaux CIC-3

Les canaux CIC-3 appartiennent à la famille des canaux chlore dépendants du potentiel qui sont abondamment exprimés dans les CML et CE vasculaires. Ils sont activés en réponse à une augmentation du volume cellulaire ou en réponse à un étirement cellulaire (Duan 2011). De plus, il a été montré que ces canaux s'activent lorsque les cellules sont stimulées avec de l'angiotensine II, l'ET-1, la CaM kinase II et les ERO (Duan 2011). L'équipe de Hawkins a mis en évidence, en 2007, le passage d'un flux d'O₂^{•-} à travers la membrane plasmique des CE des micro-vaisseaux pulmonaires à l'aide de la sonde dihydroéthidine (DHE) sensible aux variations de superoxyde (Hawkins, Madesh *et al.*, 2007). Ces auteurs montrent que l'addition d'O₂^{•-} dans le milieu extracellulaire induit une augmentation de la fluorescence des CE chargées avec la sonde DHE. Cet effet est aboli lorsque les CE sont traitées avec l'inhibiteur des canaux CIC-3 (l'acide 4,4'-diisothiocyanate-2,2'-stilbenedisulfonique di sodique) ou le siRNA dirigé contre le canal anionique (Hawkins, Madesh *et al.*, 2007). Les auteurs observent également une augmentation de la [Ca²⁺]_c lorsque les CE sont traitées avec de l'O₂^{•-} exogène. Cette augmentation calcique provient du réticulum sarcoplasmique (RS) et induit une modification du potentiel de membrane mitochondriale, provoquant une augmentation de la production d'O₂^{•-} mitochondrial (Madesh, Hawkins *et al.*, 2005 ; Hawkins, Madesh *et al.*, 2007).

○ Aquaporine

Comme décrit plus haut, H₂O₂ est considéré comme le meilleur candidat pour les dommages intracellulaires en raison de sa demi-vie plus longue et de ses propriétés lipophiles. Ainsi, pendant très longtemps il a été admis que l'H₂O₂ induit ses actions en intracellulaire via une simple diffusion à travers la membrane plasmique. Cette notion a été

récemment ré évaluée par l'équipe de Miller en 2010, qui stipule que l' H_2O_2 entre via l'aquaporine dans les cellules de mammifères. Dans leurs études, les cellules HEK et HeLa surexprimant différentes isoformes d'aquaporines présentent une augmentation de la capture de la sonde Py1-ME chimio-sensible à l' H_2O_2 (Miller, Dickinson *et al.*, 2010).

Au niveau de la paroi vasculaire, l'équipe d'Al Ghouleh a été la première à décrire le transport d' H_2O_2 via les aquaporines de type 1 au niveau de la membrane plasmique des CML (Al Ghouleh, Frazziano *et al.*, 2013). Dans leur modèle, H_2O_2 exogène pénétrant dans les CML via l'aquaporine de type 1, active la production d' O_2^\cdot via les NOX1 (Al Ghouleh, Frazziano *et al.*, 2013).

IV.4.2 La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) est également une source importante d'ERO dans la circulation pulmonaire. En effet, il s'agit d'un site majeur de production d'ERO car 80 % de la production d' O_2^\cdot proviennent de la CRM dans les cellules non phagocytaires.

La matrice mitochondriale contient des enzymes qui participent au catabolisme du pyruvate et des acides gras en Acétyl-CoA, via l'oxydation du glucose et la β -oxydation respectivement ([Figure 22](#)) (Freund-Michel, Khoyarattee *et al.*, 2014). L'Acétyl-CoA est pris en charge par le cycle de Krebs où il subit une série d'oxydations enzymatiques pour produire du CO_2 et de l'énergie sous forme d'équivalents réduits, le NADH « nicotinamide adénine dinucléotide » et FADH_2 « flavine adénine dinucléotide ». Le NADH et FADH_2 sont alors utilisés comme donneurs d'électrons par la CRM pour générer le gradient de proton (H^+) nécessaire à la production d'ATP par l'ATP synthase via la phosphorylation oxydative ([Figure 22](#)).

La mitochondrie exerce un rôle primordial dans la bio-énergétique cellulaire car il s'agit de la source énergétique principale de la cellule. Au niveau des vaisseaux pulmonaires, l'énergie fournie sous forme d'ATP par la CRM est utilisée, entre autres, pour la contraction des CML. En effet, plus de 95 % de l' O_2 consommé par les cellules est réduit par quatre électrons pour générer deux molécules d' H_2O . Cette étape a lieu au niveau de la membrane interne mitochondriale, via le complexe I à IV de la CRM ([Figure 23](#)). Dans les conditions physiologiques, une partie non négligeable d' O_2 (2 à 3 %) échappe à la réduction complète en H_2O et subit une réduction mono-électrique au niveau des **complexes I et III** de la CRM (qui présentent des fuites d'électrons) pour générer de l' O_2^\cdot . Cette production est physiologiquement liée au processus respiratoire ([Figure 23](#)).

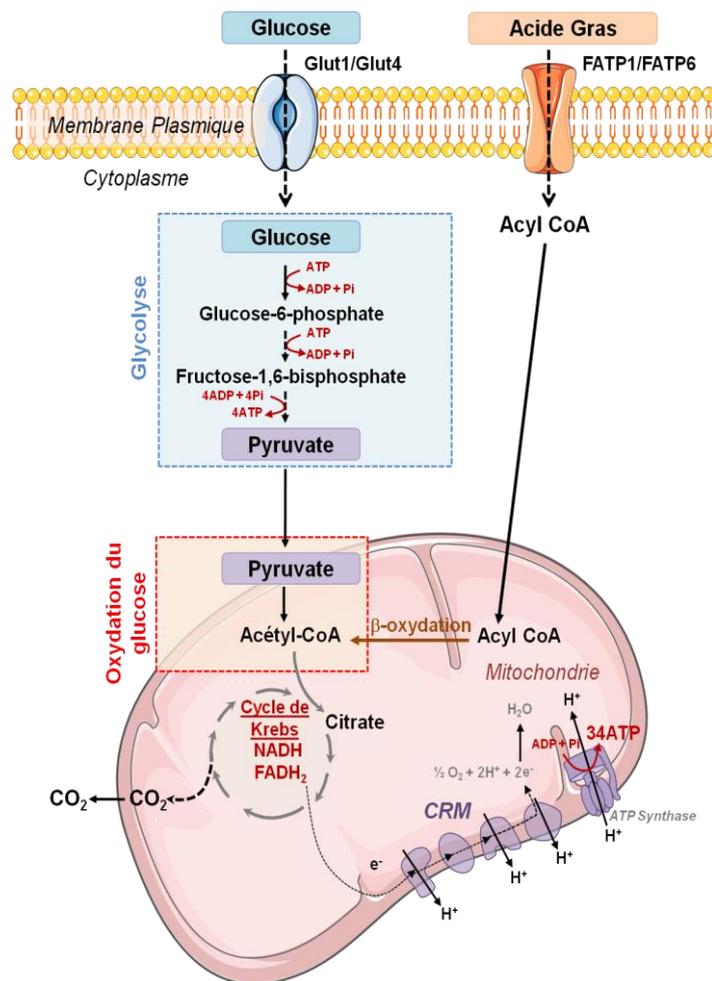


Figure 22: Production mitochondriale d'équivalents réduits (NADH et FADH₂) à partir de l'acétyl-CoA pour l'alimentation de la CRM en électrons (e⁻).

L'Acétyl-CoA est pris en charge par le cycle de Krebs où il subit une série d'oxydations enzymatiques pour produire du CO₂ et de l'énergie sous forme d'équivalents réduits, le NADH « nicotinamide adénine dinucléotide » et le FADH₂ « flavine adénine dinucléotide ». Le NADH et le FADH₂ sont alors utilisés comme donneurs d'électrons par la CRM pour générer le gradient de protons (H⁺) nécessaire à la production d'ATP par l'ATP synthase via la phosphorylation oxydative. CRM : chaîne respiratoire mitochondriale, GLUT1/GLUT4 : transporteur de glucose de type 1 et 4, FATP1/FATP6 : « Fatty acids transporter » ou transporteur des acides gras de type 1 et 6. *D'après (Freund-Michel, Khoyarattee et al., 2014).*

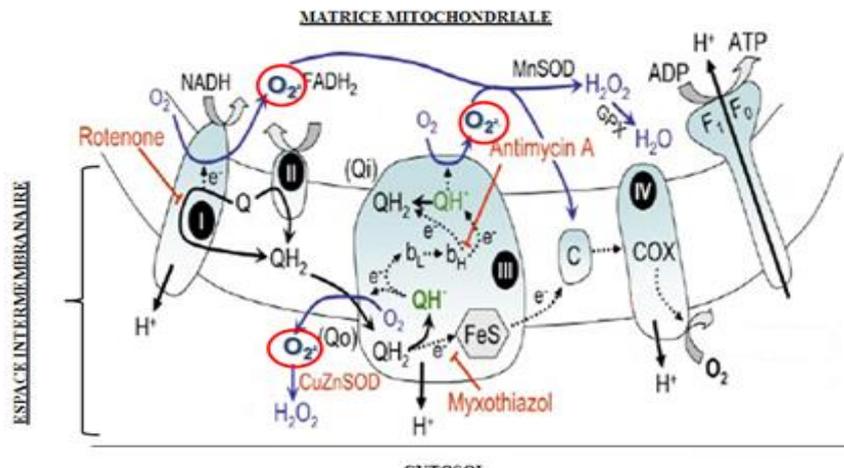


Figure 23: Représentation schématique du fonctionnement de la CRM.

Le NADH et le FADH₂ sont oxydés par le complexe I et II respectivement, induisant la réduction de l'ubiquinone (Q) en ubiquinol (QH₂). Deux e⁻ sont alors transférés par le QH₂ du complexe I au complexe III aussi appelé co-enzyme Q : cytochrome c oxydo-réductase. Une autre paire d'e⁻ est transférée par le QH₂ du complexe II au complexe III. Au niveau du complexe III, un e⁻ est transféré du site Q₀ au centre FeS puis au cytochrome c, alors que les autres e⁻ sont transférés aux cytochromes b (b_L et b_H) suivi d'un transfert à l'ubiquinone au site Q₀. Le cytochrome c fournit alors des e⁻ au complexe IV. L'O₂⁻ est généré au niveau du complexe I et III suite aux fuites d'e⁻. D'après (Ward 2006 ; Shimoda and Udem 2010)

Au niveau du **complexe I**, l'O₂⁻ est généré par l'auto oxydation des flavines. Puis, l'O₂⁻ intègre la matrice mitochondriale où il est métabolisé en H₂O₂ par la superoxyde dismutase de type 2 (SOD2 ou MnSOD) correspondant à l'isoforme spécifiquement localisée dans la matrice mitochondriale.

Dans le **complexe III**, l'O₂⁻ est généré au niveau des co-enzymes Q₀ et Q_i et est libéré dans l'espace intermembranaire et dans la matrice mitochondriale respectivement. Dans la matrice, l'O₂⁻ libéré par Q_i est métabolisé par la SOD2/MnSOD en H₂O₂ (Faraci and Didion 2004 ; Nickel, Kohlhaas *et al.*, 2014). Ce dernier est ensuite décomposé en H₂O par la glutathion peroxydase (GPx) (Shimoda and Udem 2010). L'H₂O₂ peut également se transformer en OH[•] par la réaction de Fenton en présence de Fe²⁺ ou encore diffuser dans le cytoplasme pour oxyder les molécules cytoplasmiques ou nucléaires. De plus, une partie de l'O₂⁻ produit par Q_i au niveau de la matrice échappe à la dégradation par la SOD2/MnSOD et accède à l'espace intermembranaire via le canal anionique de la membrane interne ou IMAC pour « inner membrane anion channel » (Nickel, Kohlhaas *et al.*, 2014 ; Zorov, Juhaszova *et al.*, 2014) puis il est libéré dans le cytosol via des canaux anioniques dépendants du potentiel présents sur la membrane externe de la mitochondrie (VDAC pour « voltage dependent

anion channels ») (Figure 24). Dans l'espace intermembranaire, l' $O_2^{\cdot-}$ libéré par Q_0 est soit dégradé par la SOD de type 1 (SOD1 ou CuZnSOD) (Faraci and Didion 2004), soit métabolisé par le cytochrome c, soit il accède au cytosol via les VDAC (Camello-Almaraz, Gomez-Pinilla *et al.*, 2006).

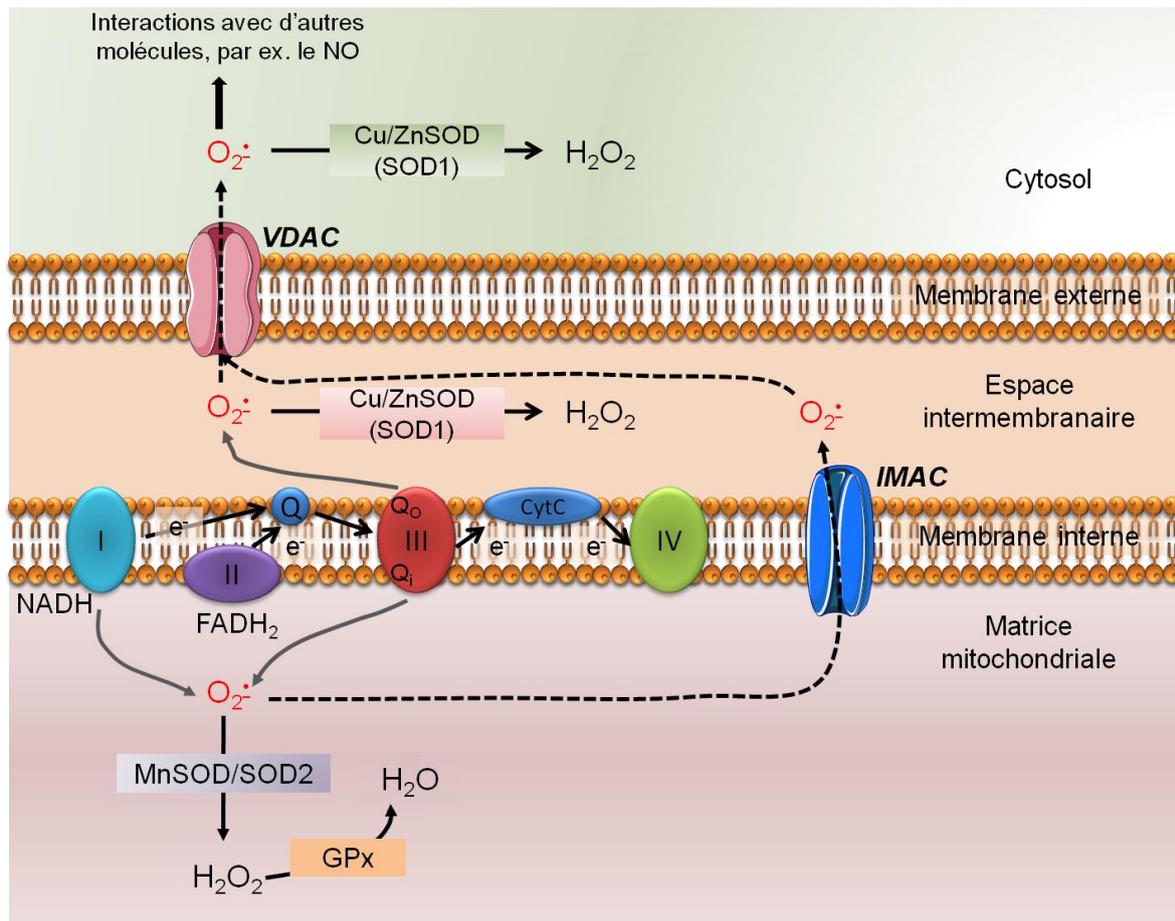


Figure 24: Représentation schématique du devenir de l' $O_2^{\cdot-}$ suite à sa formation au niveau du complexe I et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM).

L' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau de l'espace intermembranaire peut être métabolisé par la CuZnSOD/SOD1 ou traverser la membrane externe mitochondriale via le VDAC pour accéder au cytosol. Dans la matrice mitochondriale, l' $O_2^{\cdot-}$ produit est (1) métabolisé par la MnSOD/SOD2 ou (2) passe à travers la membrane interne via IMAC pour rejoindre l'espace intermembranaire et est libéré dans le cytosol via VDAC de la membrane externe. Abréviations : IMAC : Intern Membrane Anion Channel, VDAC : Voltage Dependent Anion Channel, GPx : Glutathion Peroxydase. *D'après (Zhang and Gutterman 2007 ; Nickel, Kohlhaas *et al.*, 2014 ; Zorov, Juhaszova *et al.*, 2014).*

Le fonctionnement normal de la CRM, associé à un faible potentiel de la membrane mitochondriale implique la production d' $O_2^{\cdot-}$ par les complexes I et III lors du transfert

d'électrons du complexe I aux quinones. Ce phénomène physiologique est connu sous le terme de « forward electron transfer ». Cependant, lorsque le potentiel de membrane mitochondrial augmente, par exemple en absence d'ADP et lorsque le FADH₂ est utilisé par le complexe II, il y a production d'O₂^{•-} au niveau du complexe I via le flux inverse des électrons, ou « reverse electron transfer » (Liu, Fiskum *et al.*, 2002).

IV.4.2.1 Mitochondrie, calcium et O₂^{•-}

Les premières études qui ont montré que les mitochondries de rat étaient capables de stocker le Ca²⁺ datent des années 1960 (Deluca and Engstrom 1961 ; Vasington and Murphy 1962 ; Lehninger, Rossi *et al.*, 1963). Cependant, la pertinence physiologique de ce processus a été écartée en raison de la discordance entre la faible affinité de la mitochondrie pour le Ca²⁺ (de l'ordre du mM) et la concentration calcique cytosolique physiologique (100 nM) (Patron, Raffaello *et al.*, 2013). Le rôle de la mitochondrie dans l'homéostasie calcique ré-émergea dans les années 1990 avec le développement des sondes calciques qui ciblent la mitochondrie (Rizzuto, Simpson *et al.*, 1992). Depuis, la discordance entre la faible affinité de la mitochondrie pour le Ca²⁺ et la faible concentration calcique cytosolique a été expliquée par la localisation proche de la mitochondrie des canaux qui libèrent le Ca²⁺ présents à la fois au niveau du réticulum sarcoplasmique et de la membrane plasmique cellulaire (Mannella, Buttle *et al.*, 1998 ; Rizzuto, Pinton *et al.*, 1998 ; Csordas, Thomas *et al.*, 1999 ; Contreras, Drago *et al.*, 2010).

IV.4.2.2 Ca²⁺ mitochondrial et vasoconstriction

Au niveau du système vasculaire, la contraction des CML est dépendante de l'ATP. Ainsi, la production d'ATP au niveau de la mitochondrie est étroitement liée à la concentration Ca²⁺ mitochondriale ([Ca²⁺]_m) et à la quantité d'ADP. Lors d'une augmentation de la vasoréactivité, l'ADP stimule la production d'ATP au niveau de l'ATP synthase, ce qui influence la force proto-motrice mitochondriale. Afin de maintenir constante la force proto-motrice, le NADH et le FADH₂ fournissent plus d'électrons à la CRM, ce qui accélère le flux d'électrons le long de la CRM et la consommation d'O₂. Cette augmentation de la contraction des vaisseaux stimule l'absorption des ions Ca²⁺ par la mitochondrie. Au niveau de la matrice mitochondriale, le Ca²⁺ active les déshydrogénases des étapes limitantes du cycle de Krebs. L'activation des déshydrogénases mitochondriales induit une augmentation de la vitesse de régénération du NADH et du FADH₂, ce qui maintient la force proto motrice constante lors d'une augmentation de la demande en ATP par les CML (Maack, Cortassa *et al.*, 2006 ; Kohlhaas and Maack 2013).

IV.4.2.3 La signalisation calcique mitochondriale

Lors d'une augmentation de la $[Ca^{2+}]_c$, la mitochondrie, grâce à sa localisation proche du réticulum sarcoplasmique et/ou de la membrane plasmique, est capable de tamponner le Ca^{2+} pour maintenir stable l'homéostasie calcique cytosolique.

- Mitochondrie : réserve calcique

Au niveau de la mitochondrie, les ions Ca^{2+} s'accumulent dans la matrice mitochondriale. Avant de se retrouver dans la matrice, les ions Ca^{2+} doivent, traverser, à la fois, la membrane mitochondriale externe et interne. Les ions Ca^{2+} sont conduits par la charge négative du potentiel de membrane mitochondrial (mise en place par la CRM) et traversent la membrane externe mitochondriale via le VDAC. Au niveau de l'espace intermembranaire, les ions Ca^{2+} sont alors importés dans la matrice mitochondriale via l'uniprot calcique mitochondrial (Figure 25) (MCU pour « mitochondrial calcium uniporter ») présent au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Madesh and Hajnoczky 2001 ; Rapizzi, Pinton *et al.*, 2002 ; Kirichok, Krapivinsky *et al.*, 2004). Le MCU a une faible affinité pour le Ca^{2+} (de l'ordre de 10 à 30 μM) (Nickel, Kohlhaas *et al.*, 2014). D'un point de vue pharmacologique, l'activité du MCU est inhibée par le rouge de ruthénium. Cependant ce composé n'est pas spécifique du MCU car il peut également bloquer l'activité des récepteurs à la ryanodine (RRy) du réticulum sarcoplasmique ainsi que les canaux de type TRPV4 (pour « transient receptor potential vanilloid ») (Ducret, Guibert *et al.*, 2008). Par contre, la forme purifiée du rouge de ruthénium, le Ru360 présente une meilleure sélectivité pour le MCU (Cheranov and Jaggar 2004 ; Kirichok, Krapivinsky *et al.*, 2004 ; Contreras, Drago *et al.*, 2010). De plus, une autre protéine nommée Letm1, présente sur la membrane interne de la mitochondrie a été caractérisée comme un antiport Ca^{2+}/H^+ impliqué dans le transport des ions Ca^{2+} dans la matrice mitochondriale (Endele, Fuhry *et al.*, 1999 ; Jiang, Zhao *et al.*, 2009 ; McCarron, Olson *et al.*, 2012 ; Jiang, Zhao *et al.*, 2013).

- Mitochondrie et homéostasie calcique cytosolique

Par ailleurs, en plus de son pouvoir tampon, la mitochondrie est également capable de libérer sa réserve calcique, par exemple lors d'une diminution de la $[Ca^{2+}]_c$. Les ions Ca^{2+} mitochondriaux stockés dans la matrice sont alors libérés dans un premier temps dans l'espace intermembranaire via l'échangeur Na^+-Ca^{2+} (NCLX pour « Na^+/Ca^{2+} (and Li^+) exchanger ») présent au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Les ions Ca^{2+} sont ensuite libérés dans le cytosol via le pore de transition mitochondrial ou PTP pour « permeability transition pore ». Le Ca^{2+} est alors utilisé pour alimenter le réticulum sarcoplasmique via la pompe calcium-ATPase du réticulum sarcoplasmique (SERCA) (Landolfi, Curci *et al.*, 1998 ; Szado, Kuo *et al.*, 2003 ; Ishii, Hirose *et al.*, 2006 ; Chalmers and McCarron 2009 ; Poburko, Liao *et al.*, 2009 ; Giacomello, Drago *et al.*, 2010) (Figure 25).

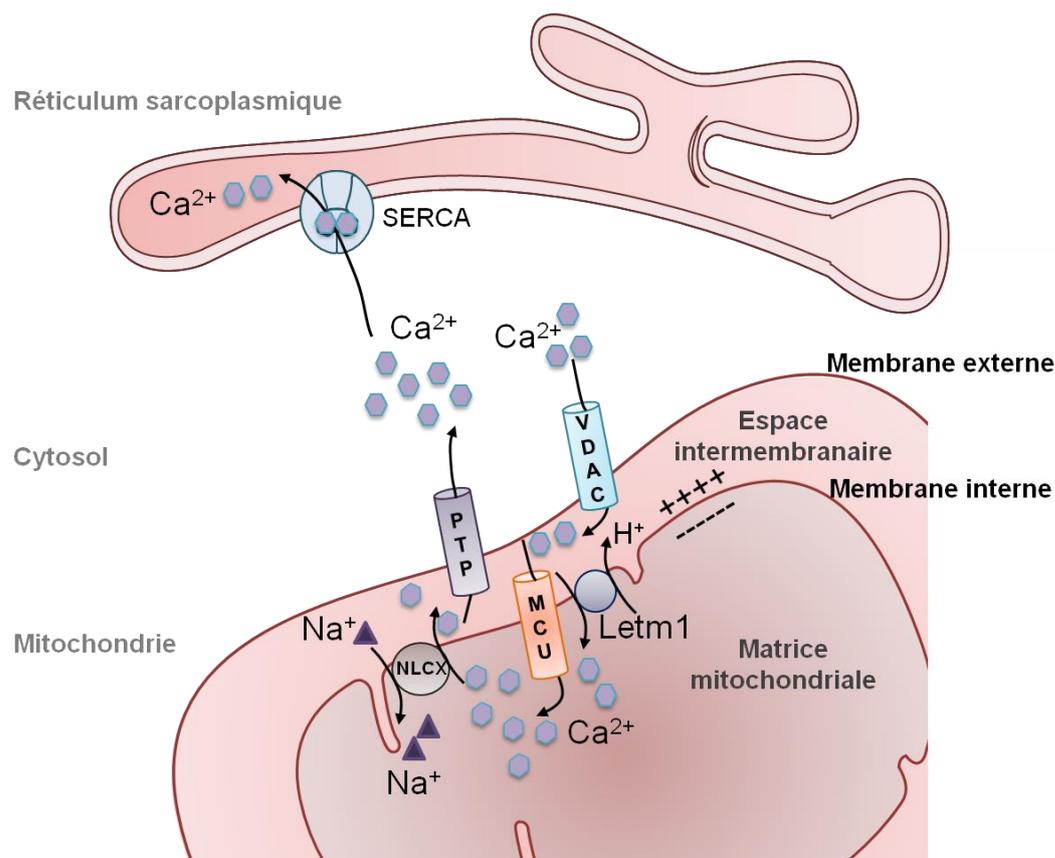


Figure 25: Représentation schématique de la compartimentalisation calcique dans la mitochondrie.

L'influx calcique cytosolique rentre dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie et dans la matrice mitochondriale via le VDAC et le MCU et/ou le Letm1 situés sur la membrane mitochondriale externe et interne respectivement. La mitochondrie peut libérer le Ca^{2+} via l'échangeur mitochondrial $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ et (Li^+) (NLCX) et le PTP présents sur la membrane mitochondriale interne et externe respectivement. Le Ca^{2+} libéré est utilisé pour le remplissage du réticulum sarcoplasmique par les pompes SERCA. Abréviations : PTP : « permeability transition pore », MCU : « Mitochondrial Ca^{2+} uniporter », VDAC : « potentiel dépendant anion channel », NLCX : « $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (and Li^+) exchanger », SERCA : « Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase », Letm1 : « leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 ». Adapté de (Contreras, Drago et al., 2010 ; Billaud, Lohman et al., 2014).

IV.4.3 La xanthine oxydase

La xanthine oxydase (XO) et la xanthine déshydrogénase (XDH) sont des xanthines oxydoréductases (XOR) et sont impliquées dans les dernières étapes du métabolisme des purines (Boueiz, Damarla et al., 2008). Les XOR catalysent l'oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique (Figure 26A) (Jarasch, Grund et al., 1981). La XO

et la XDH sont codées par le même gène (Nishino, Okamoto *et al.*, 2008). La XO est formée suite à une modification post traductionnelle de la XDH. La XDH utilise le NAD^+ comme accepteur d'électrons, produisant alors du NADH , un produit stable. En revanche, la XO préfère l' O_2 comme accepteur d'électrons et génère ainsi de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de l' H_2O_2 (Figure 26B). La XO est composée de deux monomères, chacun contenant un résidu molybdoptérine qui catalyse l'oxydation du substrat (hypoxanthine et/ou xanthine). Les électrons acceptés sont transférés via le centre Fer-soufre (Fe_2S_2) au cofacteur FAD, qui réduit l' O_2 en $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Figure 26B) (Harrison 2002).

IV.4.4 Expression de la XO dans la paroi vasculaire pulmonaire

L'expression de la XO a été mise en évidence dans les CE d'artères pulmonaires bovines à la fois *in vitro* et *in vivo* en condition normoxique (Partridge, Blumenstock *et al.*, 1992 ; Perez-Vizcaino, Cogolludo *et al.*, 2010). En revanche, au niveau des CML pulmonaires bovines, l'activité de la XO est mise en évidence uniquement en condition d'hypoxie chronique (Hassoun, Yu *et al.*, 1994).

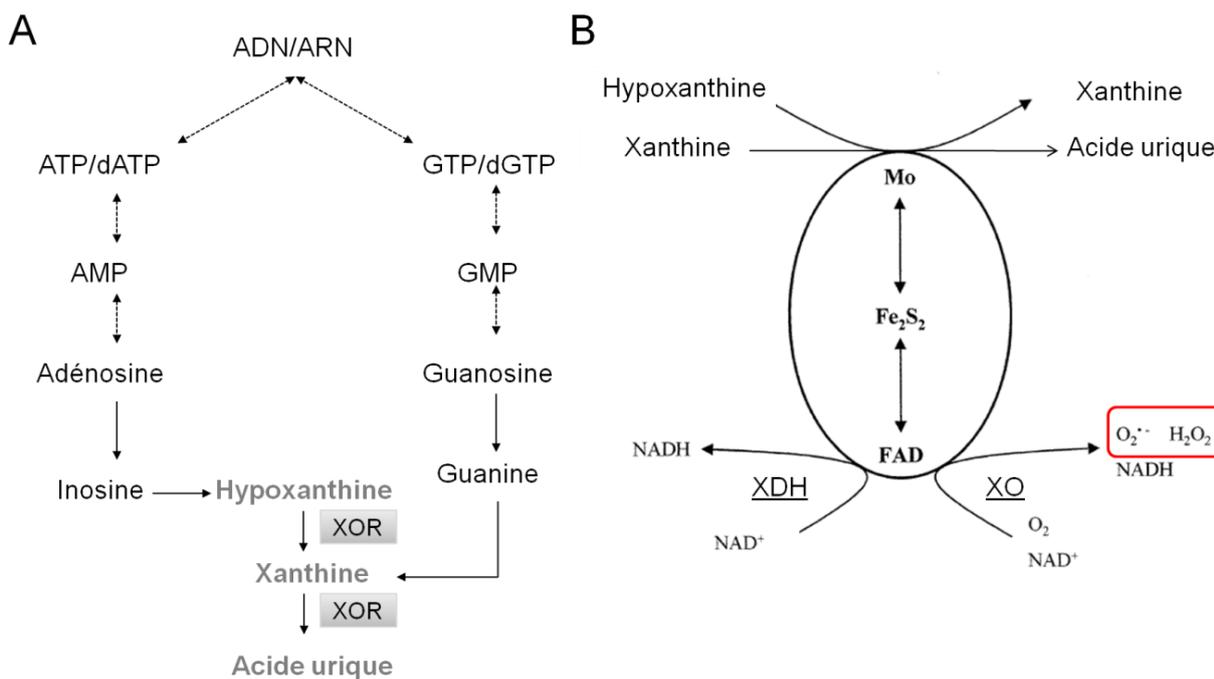


Figure 26: Implication des XOR (XDH et XO) dans le métabolisme des purines.

(A) Les XOR catalysent les deux dernières étapes de la voie du catabolisme des purines. (B) Oxydation de l'hypoxanthine en xanthine et de la xanthine en acide urique au niveau du site molybdoptérine (Mo), conduisant à la production d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ et de NADH . D'après (Harrison 2002 ; Boueiz, Damarla *et al.*, 2008).

IV.4.5 La NO synthase (NOS) et O_2^- : NOS découplée

La NO synthase (NOS) est l'enzyme responsable de la synthèse du NO. Quatre isoformes ont été identifiées : (1) La NOS neuronale (nNOS), (2) la NOS inducible (iNOS), (3) la NOS endothéliale (eNOS) (Zuckerbraun, George *et al.*, 2011 ; Rochette, Lorin *et al.*, 2013) et (4) la NOS mitochondriale (mtNOS) (Ghafourifar and Richter 1997 ; Lacza, Pankotai *et al.*, 2006 ; Zaobornyj and Ghafourifar 2012). Les NOS actives sont sous forme d'homodimères et chaque monomère possède un domaine C-terminal réductase et un domaine N-terminal oxygénase.

Le **domaine réductase** est composé de sites de liaison pour le NADPH et les flavines (flavine mononucléotide (FMN) et flavine adénine dinucléotide (FAD)). Le transfert d'électrons a lieu au niveau du domaine réductase via le NADPH, les flavines FAD et FMN jusqu'à la molécule d'hème présente au niveau du domaine oxygénase (Figure 27).

Le **domaine oxygénase**, quant à lui, contient des sites de fixation pour l'hème, le substrat (la L-arginine) et le co-facteur principal des NOS (la tétrahydrobioptérine ou BH_4). L' O_2 est réduit au niveau du domaine oxygénase et la L-arginine est oxydée en L-citrulline et NO.

Les domaines réductase et oxygénase sont liés entre eux par deux petites séquences d'acides aminés contenant un site de liaison pour la calmoduline (CAM) (Alderton, Cooper *et al.*, 2001).

Au niveau des CE vasculaires, l'activité de la eNOS est régulée, entre autres, par la $[Ca^{2+}]_c$, par la phosphorylation du domaine réductase et du complexe Ca^{2+} /calmoduline via l'action de la PKA, PKB ou CaMKII (Fleming 2010).

Pour que les eNOS forment du NO, elles doivent être sous forme d'homodimères. Lorsque les monomères ne sont pas assemblés, on parle alors de **eNOS découplées**. Les eNOS découplées génèrent alors de l' O_2^- au lieu du NO. La BH_4 est le cofacteur essentiel pour stabiliser la NOS sous forme d'homodimères (Munzel, Daiber *et al.*, 2005 ; Dubois, Delannoy *et al.*, 2013). Lors d'un déficit en BH_4 , le flux d'électrons arrivant du domaine réductase est dévié vers l' O_2 , induisant la formation d' O_2^- au niveau du domaine oxygénase (Figure 27) (Konduri, Bakhutashvili *et al.*, 2007 ; Belik, Jerkic *et al.*, 2009).

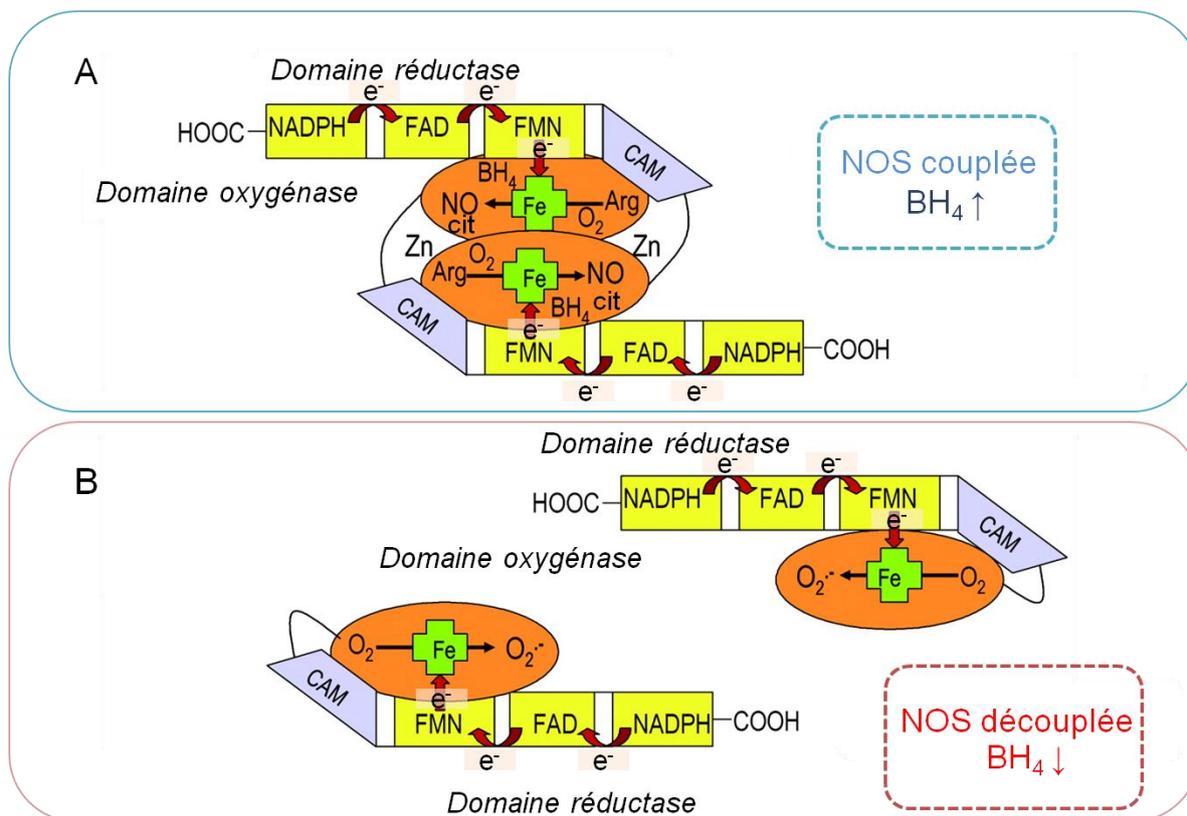


Figure 27: Représentation schématique illustrant le flux d'électrons au niveau de la eNOS couplée (A) vs la eNOS découplée (B).

(A) Le flux d'électrons commence du NADPH vers les flavines FAD et FMN au sein du domaine réductase qui les délivre au Fe^{2+} de la molécule d'hème au niveau du domaine oxygénase. La BH_4 est essentielle pour le don d'un électron et d'un proton aux intermédiaires instables intervenant dans la réaction de conversion de la L-arginine/ O_2 en L-citrulline/NO (NO/cit). La calmoduline (CAM) relie le domaine réductase au domaine oxygénase. Les liaisons des ions Zn à la NOS sont requises pour la formation et la stabilité de l'homodimère. (B) Un déficit en BH_4 ($\downarrow\text{BH}_4$) empêche la dimérisation et la NOS produit de l' O_2^- . D'après (Harrison 2002 ; Munzel, Daiber *et al.*, 2005).

IV.5 Dégradation des ERO

Les ERO sont dégradées par les systèmes antioxydants qui sont de types **non-enzymatique** et **enzymatique** (Figure 28) et sont présents au sein des tissus vasculaires. Ils permettent la détoxification et protègent les cellules contre les effets délétères du stress oxydatif.

Au niveau du système vasculaire pulmonaire, les **antioxydants non enzymatiques** regroupent l'acide ascorbique (vitamine C), le glutathion, la bilirubine, l' α -tocophérol (vitamine E) et l'acide urique (Tajima, Kurashima *et al.*, 2009). Ils sont capables de capter l' OH^\bullet et le radical lipidique peroxyde (L^\bullet) qui ne peuvent pas être dégradés par catalyse

enzymatique car leur vitesse de réaction avec des molécules cibles est trop rapide. Seuls l' $O_2^{\cdot-}$ et l' H_2O_2 sont dégradés par les systèmes enzymatiques.

Les **principaux antioxydants enzymatiques** regroupent les trois isoformes de la SOD (SOD1, SOD2 et SOD3), la glutathion peroxydase (GPx), les catalases et les peroxyredoxines (Touyz and Briones 2010).

La **SOD1** ou **Cu/ZnSOD** est une enzyme homodimérique (32 kDa) contenant un Cu^{2+} et un Zn^{2+} par sous-unité. Elle est principalement localisée dans le cytoplasme et dans le noyau, de manière moindre, dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Elle représente la forme prédominante dans les vaisseaux sanguins.

La **SOD2** ou **MnSOD** possède un Mn^{2+} par sous-unité, elle est présente dans la matrice mitochondriale et elle permet la dismutation immédiate de l' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 produit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La **SOD3** ou **SOD extracellulaire (EC-SOD)** est la forme extracellulaire, c'est une enzyme homotétramérique qui fonctionne avec un Cu^{2+} et un Zn^{2+} par sous-unité. Elle est produite dans les vaisseaux par les CML et est principalement localisée au niveau de l'espace entre l'endothélium et les CML (Faraci 2003).

L' H_2O_2 formée par les différentes SOD sera, par la suite, prise en charge par deux types d'enzymes : la catalase et la GPx.

Lacatalase est une enzyme antioxydante intracellulaire qui est principalement localisée dans les peroxysomes et dans le cytosol. Elle métabolise la dégradation de l' H_2O_2 en $H_2O + \frac{1}{2} O_2$, évitant ainsi sa transformation en radical $\cdot OH$ (Pryor et al., 2006).

La **glutathion peroxydase (GPx)** permet l'élimination de l' H_2O_2 . Elle utilise le glutathion réduit comme donneur d'électron pour former du glutathion disulfite (GSSG) et l' H_2O .

La GPx et la catalase permettent ainsi l'élimination de l' H_2O_2 . Toutefois, la catalase semble jouer un rôle plus important en présence de fortes concentrations d' H_2O_2 , alors que la GPx prend en charge l' H_2O_2 même en faible quantité (Paravicini and Touyz 2008). La GPx est ainsi considérée comme la source majeure de protection contre H_2O_2 .

Les **peroxyredoxines** sont au nombre de 6 chez les mammifères et sont localisées dans le cytosol, dans les mitochondries, dans les peroxysomes, ou sont associées au noyau et aux membranes. Ces protéines exercent leur rôle antioxydant dans la cellule à travers une activité peroxydase et elles utilisent l' H_2O_2 , le peroxy-nitrite et de nombreux hydroperoxydes comme substrats. Ces enzymes ont une faible efficacité catalytique par rapport à la GPx et à

la catalase, mais sont présentes en grande quantité dans les cellules, elles joueraient donc un rôle important dans la détoxification cellulaire (Forman, Zhang *et al.*, 2009).

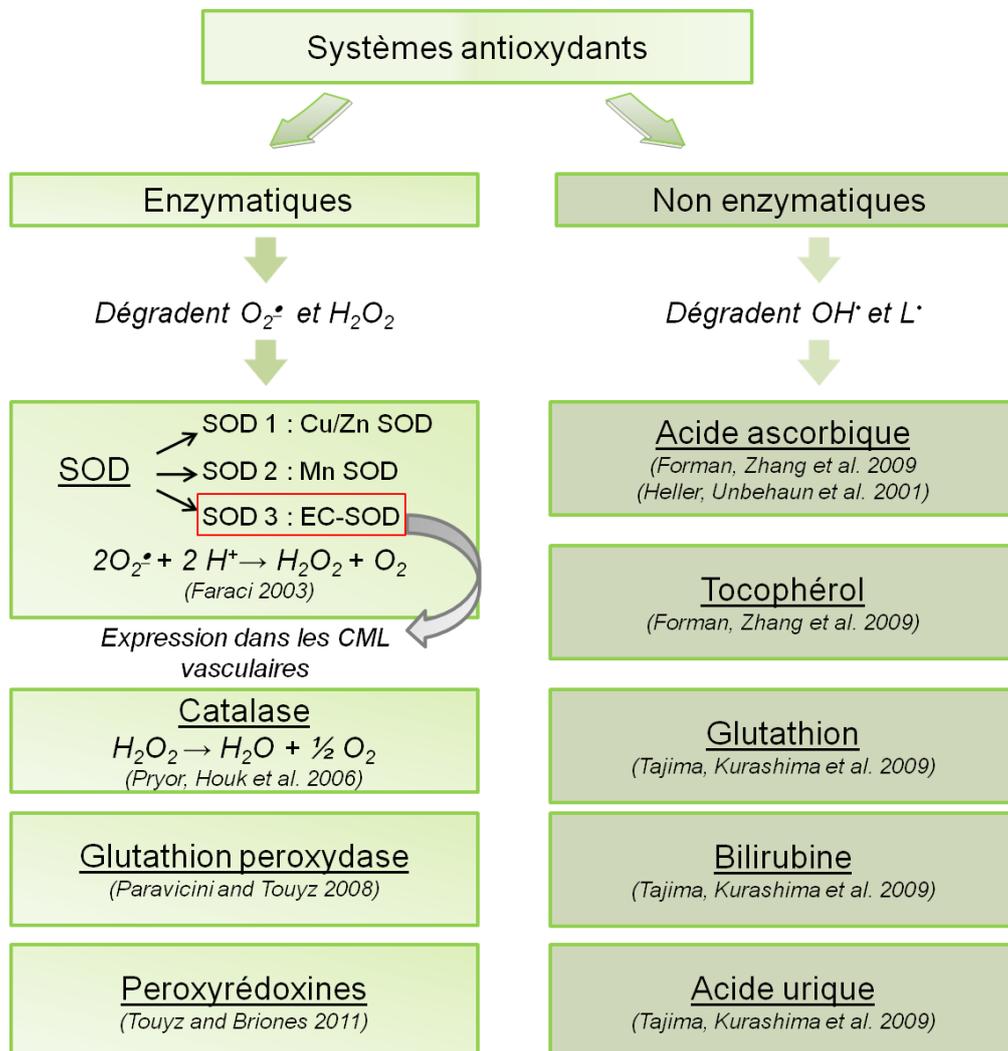


Figure 28: Résumé des systèmes antioxydants enzymatiques et non enzymatiques présents au sein des tissus vasculaires pulmonaires.

D'après (Heller, Unbehaun *et al.*, 2001 ; Faraci 2003 ; Pryor, Houk *et al.*, 2006 ; Paravicini and Touyz 2008 ; Forman, Zhang *et al.*, 2009 ; Tajima, Kurashima *et al.*, 2009 ; Touyz, Briones *et al.*, 2011).

IV.6 Implications physiologiques et physiopathologiques de l'O₂[•] au niveau vasculaire systémique et pulmonaire

IV.6.1 Rôles physiologiques des ERO

Le rôle physiologique cellulaire le plus connu de l'O₂[•] est qu'il intervient comme acteur fondamental dans l'induction du processus d'apoptose et donc de la mort cellulaire programmée.

Au niveau de la paroi vasculaire pulmonaire et systémique, l'O₂[•] intervient dans la contraction des CML.

IV.6.1.1 O₂[•] et la vasoconstriction des CML

L'O₂[•] interagit avec le NO dérivant de l'endothélium pour former des peroxynitrites (ONOO⁻) et diminuer ainsi la biodisponibilité du NO vasorelaxant. La formation d'ONOO⁻ augmente alors l'état contractile des artères pulmonaires bovines et porcines (Cherry, Omar *et al.*, 1990 ; Liu, Wiener *et al.*, 1998). L'O₂[•] augmente également la capture ATP-dépendante de Ca²⁺ dans les microsomes présents au niveau des CML pulmonaires de bœufs (Chakraborti, Ghosh *et al.*, 1996). Des études récentes démontrent que l'O₂[•] induit la contraction des artères pulmonaires via l'activation de la sensibilisation de l'appareil contractile au Ca²⁺ dépendante de la Rho-kinase (Knock, Snetkov *et al.*, 2009 ; Snetkov, Smirnov *et al.*, 2011).

Par ailleurs, au niveau des CML d'aortes bovines, l'O₂[•] potentialise la libération des ions Ca²⁺ du réticulum sarcoplasmique en réponse à la D-myo-inositol 1,4,5-triphosphate (stimulus physiologique pour la mobilisation calcique) (Suzuki and Ford 1992).

IV.6.2 O₂[•] et pathologies vasculaires systémiques et pulmonaires

L'une des conséquences majeures de l'effet délétère de l'O₂[•] correspond à la dysfonction endothéliale. Tout comme les CML, les CE sont également sources d'ERO. Ainsi, au niveau de l'endothélium, lors du stress oxydatif, on observe une augmentation accrue de la production d'O₂[•] qui réagit très rapidement avec le NO endothélial, conduisant à la production d'ONOO⁻. Lorsque ce déséquilibre est installé, c'est-à-dire lorsque la vitesse de production d'O₂[•] dépasse les capacités anti-oxydantes endothéliales, le NO produit par l'endothélium se retrouve piégé et ne peut plus exercer ses effets physiologiques. Ce phénomène de dysfonction endothéliale est à l'origine de nombreuses pathologies touchant à la fois la circulation systémique et pulmonaire, telles que le diabète, l'athérosclérose et les hypertensions artérielles systémique et pulmonaire (Rojas, Figueroa *et al.*, 2006).

IV.6.2.1 Pathologies métaboliques de la circulation systémique : diabète et athérosclérose

Au niveau des adipocytes blancs, une production d'ERO en quantité physiologique induit une réponse adaptative mimant les effets de l'insuline et favorise également l'adipogenèse. Il s'agit alors d'une réponse physiologique adaptative qui permet de réguler la surcharge en nutriments. Cependant, dans le cas de l'obésité (facteur de risque contribuant au diabète), on observe une augmentation chronique des taux d'ERO. Les adipocytes deviennent alors résistants à l'insuline et sont soumis à des peroxydations lipidiques, à la carbonylation des protéines et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires. Ce stress oxydant affecte également l'environnement proche des adipocytes et induit ainsi une dysfonction endothéliale au niveau du réseau périvasculaire entourant les adipocytes (pour revue : Le Lay, Simard *et al.*, 2014).

En ce qui concerne l'athérosclérose, l'activation des récepteurs de type LOX-1 (pour « lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor ») par des LDL oxydés, induit l'activation des NADPH oxydases (NOX) membranaires présentes au niveau des cellules endothéliales, provoquant une augmentation rapide d' $O_2^{\cdot-}$. L' $O_2^{\cdot-}$ produit non seulement interagit avec le NO endothélial mais augmente également l'expression de LOX-1, provoquant ainsi une boucle de production d'ERO. L'activation des NOX induit l'activation de facteurs qui participent au contrôle de l'expression de molécules pro-inflammatoires et d'adhésion qui sont les MAP kinases (P38) et le NF- κ B, (pour revue : Lubrano and Balzan 2014). Par ailleurs, plusieurs études démontrent que la production d'ERO par les NOX est un facteur qui initie et accélère le développement de l'athérosclérose (pour revue : Li and Shah 2004).

IV.6.2.2 Hypertension pulmonaire (HTP) hypoxique chronique (de groupe 3)

Les informations actuelles sont focalisées sur le rôle de l' H_2O_2 dans le développement de l'HTP hypoxique. Deux hypothèses existent l'HTP est médiée soit par une augmentation du taux d' H_2O_2 , soit par une diminution. Il est important de noter que ces deux hypothèses (l'hypoxie induit une augmentation ou une diminution des ERO) font l'objet de débats (Ward 2006). L'une des raisons pouvant expliquer ces différences de résultats proviendraient des différentes méthodes de détection des ERO. Les ERO étant des espèces très réactives, leur détection via des sondes fluorescentes demeure une limite et la seule technique étant de nos jours fiable reste la résonance paramagnétique des électrons RPE (voir matériels et méthodes : RPE).

Dans le cas d'une augmentation de la production d' H_2O_2 par les NOX et par la mitochondrie en réponse à une hypoxie chronique, il y a alors une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ conduisant à une activation de HIF-1 et de la Rho-Kinase. L'activation de la Rho-kinase augmente alors la sensibilité de l'appareil contractile au Ca^{2+} et induit la vasoconstriction des CML d'AP de rat. En parallèle, HIF-1 induit l'activation de la transcription de gènes impliqués dans les phénomènes de remodelage vasculaire (Waypa, Guzy *et al.*, 2006).

En revanche, une diminution de la production d' H_2O_2 par la mitochondrie et par les NOX inactive les canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} (de type BK_{Ca}) et du potentiel ($\text{Kv}_{1.5}$). Cela induit par la suite une dépolarisation membranaire et active ainsi les canaux calciques dépendants du potentiel de type L. Il y a alors une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_c$ induisant la VHP. Cependant, si la VHP se généralise à l'arbre pulmonaire entier, cela aboutit au développement d'une HTP hypoxique chronique (Archer, Gombert-Maitland *et al.*, 2008).

V. Microdomaines de signalisation : Cavéoles

V.1 Définition d'un microdomaine de signalisation

Il est de plus en plus clair que l'accumulation de protéines dans des régions spécifiques de la membrane plasmique, facilite la communication cellulaire. Ces régions sont connues sous le terme de **microdomaines de signalisation ou cavéoles** et sont retrouvées au sein de la paroi vasculaire des vaisseaux sanguins (Billaud, Lohman *et al.*, 2014).

V.1.1 Les cavéoles : structure

Les cavéoles sont des invaginations de la membrane plasmique, leur taille varie entre 50 et 100 nm de diamètre et elles ont été mises en évidence en 1953 par George Palade au niveau des CE des capillaires sanguins par microscopie électronique à transmission (Palade 1953). Puis, en 1955, Yamada décrit des invaginations similaires au niveau de l'épithélium de la vessie et les nomme sous le terme de cavéoles en raison de leur ressemblance avec des « petites caves » (Palade 1953 ; Yamada 1955).

Les cavéoles sont des radeaux lipidiques spécialisés présents au sein de la membrane plasmique. Ils sont enrichis en cholestérol, sphingolipides et une famille de protéines membranaires intégrales : les cavéolines (Figure 29). Le rôle important du cholestérol au sein des cavéoles a été mis en évidence grâce à l'utilisation de composés pharmacologiques tels que l'oxydase du cholestérol, la filipine, la nystatine et la méthyl- β -cyclodextrine. Ces composés sont capables de dépléter le cholestérol membranaire et donc de supprimer les cavéoles (Rothberg, Heuser *et al.*, 1992 ; Smart, Foster *et al.*, 1994 ; Orlandi and Fishman 1998). Au sein de ces cavéoles, on retrouve également d'autres protéines telles que les récepteurs membranaires, les transporteurs, notamment le transporteur du glucose et d'autres protéines de signalisation. Le regroupement de toutes ces protéines permet la création d'une plateforme de signalisation ou d'un microdomaine de signalisation au niveau de la membrane plasmique (Billaud, Lohman *et al.*, 2014).

V.1.1.1 Les cavéolines

Les cavéolines sont une famille de protéines membranaires intégrales d'un poids moléculaire de 21 à 24 KDa. Chez les mammifères, il existe trois types de cavéolines : cavéoline 1 (Cav-1), cavéoline 2 (Cav-2) et cavéoline 3 (Cav-3). Les cavéolines forment des complexes oligomériques entre elles, donnant lieu à un domaine riche en cavéoline au sein de la membrane plasmique. Elles peuvent également se lier à d'autres protéines via leurs domaines CSD « caveolin scaffolding domain » ou domaine d'échafaudage de la cavéoline situé entre les résidus 82 et 101 (Figure 29) (Razani, Woodman *et al.*, 2002 ; Cohen, Hnasko *et al.*, 2004). Les Cav-1 et Cav-2 sont ubiquitaires et sont généralement co-exprimées dans la plupart des cellules avec des fortes expressions dans les CE, fibroblastes et adipocytes tandis que l'expression de la Cav-3 est restreinte au musclesquelettique, cardiaque et lisse (Cohen, Hnasko *et al.*, 2004). Cependant, au niveau des CML vasculaires, la Cav-1 est l'isoforme majeure impliquée dans le maintien de la structure des cavéoles. Les Cav-2 et Cav-3 sont impliquées dans la modulation de l'expression de la Cav-1 ainsi que dans la modulation de la signalisation cellulaire (Segal, Brett *et al.*, 1999 ; Doyle, Upshaw-Earley *et al.*, 2003 ; Woodman, Cheung *et al.*, 2004).

○ **Cavéoline 1 (Cav-1)**

La cavéoline 1 ou Cav-1 est une protéine de 22 KDa et comportant 178 acides aminés. Même si, à l'heure actuelle, le rôle précis de la Cav-1 dans la régulation des molécules de signalisation demeure inconnu, des études suggèrent que la Cav-1 agit comme une protéine d'échafaudage pour l'organisation des molécules de signalisation dans la cavéole. Plusieurs protéines telles que : le récepteur à l'EGF (« epidermal growth factor »), le récepteur au PDGF (« platelet derived growth factor ») et le récepteur à l'œstrogène sont retrouvées au sein des cavéoles et interagissent avec la Cav-1 (Mineo, James *et al.*, 1996 ; Liu, Ying *et al.*, 1997 ; Acconcia, Ascenzi *et al.*, 2005). De plus, les enzymes fondamentales de la fonction vasculaire, notamment la eNOS et la synthase des prostacyclines sont présentes dans ces cavéoles (Razani and Lisanti 2001 ; Spisni, Griffoni *et al.*, 2001 ; Massimino, Griffoni *et al.*, 2002 ; Razani, Woodman *et al.*, 2002).

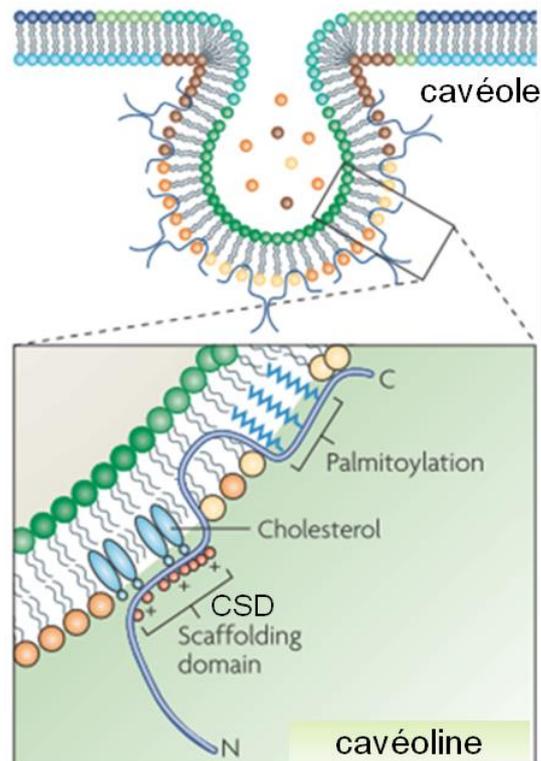


Figure 29: Structure de la cavéole et localisation de la cavéoline au sein de la cavéole.

Les domaines N et C terminaux de la cavéoline sont orientés vers le cytoplasme. Le «scaffolding domain» ou domaine CSD, présent au niveau du domaine N-terminal permet l'interaction de la cavéoline avec le cholestérol. Le domaine C-terminal contient des groupements palmitoyls. *D'après (Parton and Simons 2007).*

V.1.2 Rôle des Cav-1 dans la paroi artérielle

Dans la revue suivante, je vais m'intéresser uniquement au rôle de la Cav-1. Au niveau de la paroi artérielle, la Cav-1 intervient dans de nombreuses fonctions, notamment dans le contrôle de la réactivité vasculaire via la régulation de l'activité de la eNOS ainsi que la signalisation redox (Sowa 2012). D'autre part, au niveau des artères, la Cav-1 intervient dans la régulation de la communication myo-endothéliale.

V.1.2.1 Le contrôle de la réactivité vasculaire

Au niveau des CE, la Cav-1 maintient la eNOS dans un état inactif en interagissant avec le domaine CSD de la Cav-1 (Figure 30) (Garcia-Cardena, Martasek *et al.*, 1997 ; Michel, Feron *et al.*, 1997 ; Bucci, Gratton *et al.*, 2000 ; Sowa, Pypaert *et al.*, 2001).

Chez la souris déficiente pour la Cav-1, (souris Cav-1^{-/-}), on observe un taux supérieur de NO ainsi qu'une augmentation du taux de GMP_c par rapport aux animaux sauvages (Drab, Verkade *et al.*, 2001 ; Razani, Engelman *et al.*, 2001). Les souris Cav-1^{-/-} présentent également une diminution de l'état contractile et une augmentation de la

vasorelaxation à l'acétylcholine au niveau de l'aorte (Drab, Verkade *et al.*, 2001 ; Razani, Engelman *et al.*, 2001). Une étude réalisée par Desjardins et collaborateurs en 2008, a montré que les souris Cav-1^{-/-} présentent une diminution de la pression artérielle systémique par rapport aux animaux sauvages (Desjardins, Lobysheva *et al.*, 2008). D'autre part, les souris Cav-1^{-/-} présentent une diminution du tonus myogénique au niveau de l'aorte thoracique par rapport aux souris sauvages. De plus, le courant calcique sortant transitoire à l'origine du tonus myogénique est diminué chez la souris Cav-1^{-/-} (Drab, Verkade *et al.*, 2001). Par ailleurs, au niveau des CE vasculaires, la Cav-1 intervient dans la régulation de la signalisation calcique via son interaction avec des récepteurs de la famille des TRP, notamment les TRPC1 et les TRPV4 (Kwiatek, Minshall *et al.*, 2006 ; Saliez, Bouzin *et al.*, 2008). En effet, l'influx Ca²⁺ extracellulaire dépendant de la vidange des stocks calciques intracellulaires et médié par les TRP est absent chez les souris Cav-1^{-/-} (Murata, Lin *et al.*, 2007). L'absence de Cav-1/cavéoles chez les souris Cav-1^{-/-} induit une diminution de l'activité des TRPV4 qui participe à la relaxation médiée par le NO et l'EDHF (Saliez, Bouzin *et al.*, 2008).

Au niveau des CML d'aorte, l'utilisation *in vitro* du peptide CSD induit une inhibition de la contraction dépendante de la PKC en réponse à une stimulation des récepteurs α -adrénergiques (Je, Gallant *et al.*, 2004). Cependant, aucune étude n'a montré des modifications hémodynamiques *in vivo* chez la souris Cav-1^{-/-} afin d'appuyer ces observations *in vitro* (Gratton, Bernatchez *et al.*, 2004).

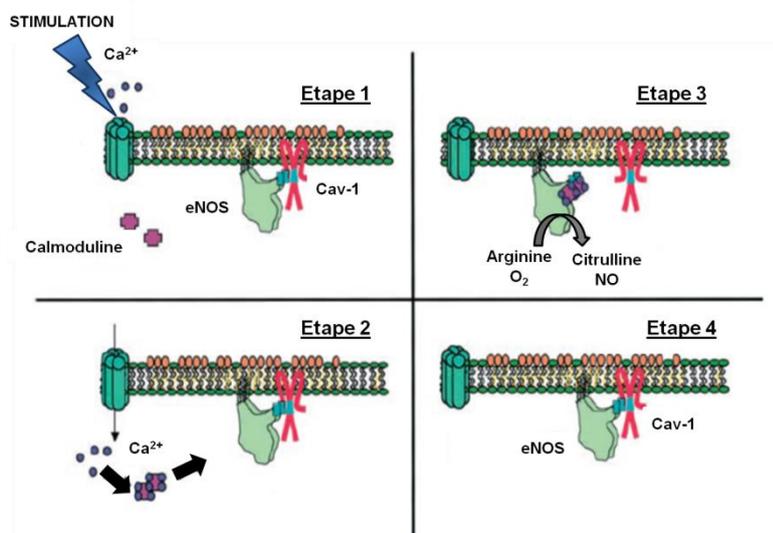


Figure 30: Régulation de l'activité de la eNOS par la Cav-1.

Etape 1 : En absence de stimulation, la Cav-1 interagit avec la eNOS via le domaine CSD de la Cav-1 et inhibe son activité. **Etape 2** : En réponse à une stimulation, l'entrée de Ca²⁺ permet la formation du complexe Ca²⁺/calmoduline et active la calmoduline. **Etape 3** : Le complexe Ca²⁺/calmoduline se fixe à la eNOS et lève l'inhibition exercée par la Cav-1 et le NO est produit. **Etape 4** : La Cav-1 se lie à la eNOS et le cycle est accompli. D'après (Razani, Woodman *et al.*, 2002).

V.1.2.2 La signalisation redox

Des études ont montré qu'au niveau de l'aorte bovine, les NOX2 sont à la fois exprimées et fonctionnelles au niveau des cavéoles (Yang and Rizzo 2007). De plus, d'autres études réalisées au niveau de l'artère coronaire ont montré que des stimuli pro-apoptotiques (le TNF- α et les endostatines) peuvent induire l'assemblage des sous unités des NOX au niveau des cavéoles (Zhang, Yi *et al.*, 2006 ; Li, Zhang *et al.*, 2007 ; Jin, Zhang *et al.*, 2008). De plus, au niveau des CE, la lipolyse des lipoprotéines riches en triglycérides induit la formation de cavéoles et augmente la production des ERO par les NOX (Wang, Sapuri-Butti *et al.*, 2008). La Cav-1 sert de senseur du stress mécanique (shear stress) au niveau des CE et régule la production des ERO via les NOX (Milovanova, Chatterjee *et al.*, 2008).

V.1.3 Rôle des cavéoles dans la physiopathologie cardiovasculaire

V.1.3.1 Athérosclérose

La Cav-1 sert de protéine de liaison au cholestérol pour son transport du réticulum endoplasmique à la membrane plasmique cellulaire (Murata, Peranen *et al.*, 1995). Les récepteurs majeurs aux HDL (ex. le SR-B1) et les récepteurs éboueurs des formes modifiées des LDL (ex. le CD36) sont présents au sein des cavéoles (Graf, Connell *et al.*, 1999). De plus, les LDL oxydés sont capables d'extraire le cholestérol contenu dans les cavéoles, ce qui délocalise la eNOS et influence la synthèse du NO (Blair, Shaul *et al.*, 1999). Une augmentation de l'assimilation du cholestérol par les CE est associée à une augmentation de l'expression de la Cav-1 et influence la synthèse du NO. Ainsi une étude a montré que l'inhibition des HMG-CoA réductases (enzyme clé dans la synthèse du cholestérol) à l'aide de l'atorvastatine, diminue le taux de cavéoline et augmente l'activation de la eNOS (Feron, Dessy *et al.*, 2001). De manière intéressante, l'utilisation des statines chez les souris ApoE^{-/-} (souris déficientes pour les apolipoprotéines de type E) diminue l'expression de la Cav-1 et augmente la fonction de la eNOS in vivo (Pelat, Dessy *et al.*, 2003). Les souris ApoE^{-/-} sont caractérisées par une sévère hypercholestérolémie qui induit la formation de plaques d'athéromes (Nakashima, Plump *et al.*, 1994). Les souris double KO Cav-1^{-/-} ApoE^{-/-} présentent une diminution de 80% des lésions lipidiques, ce qui suggère alors que la Cav-1 intervient dans la dysfonction vasculaire médiée par les LDL, l'inflammation et la progression des lésions lipidiques (Frank, Lee *et al.*, 2004).

V.1.4 Hypertension pulmonaire

Sur le plan clinique, les patients HTAP présentent un taux réduit de l'expression de la Cav-1 au niveau des CE d'artères pulmonaires (AP) (Achcar, Demura *et al.*, 2006 ; Patel, Tsutsumi *et al.*, 2007). En revanche, au niveau des CML d'AP HTAP, l'expression de la Cav-

1 est augmentée (Patel, Zhang *et al.*, 2007 ; Schach, Firth *et al.*, 2008 ; Mathew, Huang *et al.*, 2011 ; Kuhr, Smith *et al.*, 2012).

D'autre part, des polymorphismes de la Cav-1 ont été mis en évidence chez les patients souffrant d'HTAP (Pojoga, Underwood *et al.*, 2011). Le séquençage entier des exomes de ces patients HTAP a permis de mettre en évidence des délétions au niveau des nucléotides 474A et 473C du gène Cav-1 (Austin, Ma *et al.*, 2012). La conséquence de ces délétions est l'ajout de 21 acides aminés supplémentaires au niveau du C-terminal de la séquence protéique de la Cav-1. Par ailleurs, les délétions 474A et 473C de la Cav-1 sont absentes chez les sujets sains (Austin, Ma *et al.*, 2012).

Sur le plan expérimental, les rats souffrant d'une HTP induite par la monocrotaline (MCT) présentent également une perte significative de l'expression de la Cav-1 au niveau des CE d'AP, et cela au bout de deux semaines post injection de MCT. Au bout de quatre semaines post- MCT, l'expression de la Cav-1 diminue fortement dans l'endothélium et est suivie d'une augmentation de l'expression de la Cav-1 dans les CML-AP (Huang, Wolk *et al.*, 2012).

La mesure de la pression artérielle pulmonaire et des analyses histologiques ont montré que les souris Cav-1^{-/-} développent spontanément une hypertension pulmonaire ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire droite (Zhao, Liu *et al.*, 2002). Ces souris Cav1^{-/-} présentent un remodelage vasculaire pulmonaire incluant une augmentation de l'épaisseur de la média et la muscularisation des artères distales (Zhao, Zhao *et al.*, 2009). On retrouve également chez les souris Cav-1^{-/-} des anomalies pulmonaires avec une diminution des espaces alvéolaires et une fibrose pulmonaire (Drab, Verkade *et al.*, 2001 ; Razani, Engelman *et al.*, 2001).

VI. Les jonctions communicantes ou jonctions gap

Au niveau du système cardiovasculaire, les jonctions communicantes ou gap sont des canaux transmembranaires permettant de relier le cytoplasme de deux cellules adjacentes. Elles servent ainsi de conduit direct pour la communication intercellulaire en facilitant la diffusion des molécules de signalisation. Les jonctions gap sont impliquées, entre autres, dans le contrôle de l'expression génique, dans la coordination du développement vasculaire ainsi que dans la réactivité vasculaire. Par ailleurs, le couplage des CE entre elles (jonction CE-CE), des CE avec les CML (jonction CE-CML) et des CML entre elles (jonction CML-CML) via les jonctions gap joue un rôle essentiel dans le contrôle du tonus vasomoteur, la perfusion du tissu et la pression artérielle.

VI.1 Jonctions communicantes

VI.1.1 Découverte

Les travaux de Segal et Duling réalisés dans les années 80 furent les premiers à démontrer le rôle physiologique des jonctions gap dans le système vasculaire (Segal and Duling 1986). Ils ont identifié au niveau de la paroi des artérioles une vasodilatation conductrice en réponse à une stimulation par l'acétylcholine. Ce qui suggère alors qu'une sorte de communication directe intercellulaire était impliquée dans la coordination de la vasodilatation le long de la paroi artériolaire (Segal and Duling 1986).

VI.1.2 Structure

En 1967, la jonction communicante fut dénommée jonction gap en se basant sur les travaux de Revel et Karnovsky (Revel and Karnovsky 1967 ; Hoh, Lal *et al.*, 1991). Ces auteurs ont démontré à l'aide de la microscopie électronique que la jonction communicante était formée par l'apposition des membranes plasmiques de deux cellules adjacentes, séparées par une mince fente de 2 à 3 nm de large désignée par le terme « gap » en anglais ([Figure 31A](#)). En fait, les jonctions communicantes correspondent à une plaque jonctionnelle constituée de milliers de canaux intercellulaires qui relient le cytoplasme de deux cellules voisines (Goodenough and Revel 1970).

Par la suite, plusieurs études utilisant la diffraction aux rayons X ont démontré que chaque cellule contribue à la formation d'une jonction communicante ou d'un canal intercellulaire par la juxtaposition d'un hémicanal ou connexon ([Figure 31B](#)) avec son homologue de la cellule voisine (Caspar, Goodenough *et al.*, 1977 ; Makowski, Caspar *et al.*, 1977). La paroi du connexon est formée d'un assemblage en anneau de six sous-unités protéiques transmembranaires appelées connexines (Cx). D'autres études de cryofracture et de microscopie de force atomique (AFM) ont montré que les connexons étaient arrangés de manière régulière en suivant un profil hexagonal ([Figure 31C](#) et D). Le centre de chaque

connexon est séparé d'une distance de 9 à 10 nm (Hoh, Lal *et al.*, 1991 ; Hoh, Sosinsky *et al.*, 1993 ; Lal, John *et al.*, 1995). Le connexon de la jonction gap forme un cylindre contenant au centre un pore aqueux de 2 nm de diamètre et de 1 nm de profondeur (Revel and Karnovsky 1967 ; Hoh, Sosinsky *et al.*, 1993 ; Lal, John *et al.*, 1995). Le diamètre externe de chaque connexon est de 7 nm au niveau intracellulaire et de 5 nm au niveau de la région extracellulaire (Figure 31C). L'association de 2 connexons forme un canal complet en forme de sablier (Figure 31C) (Saez, Berthoud *et al.*, 2003).

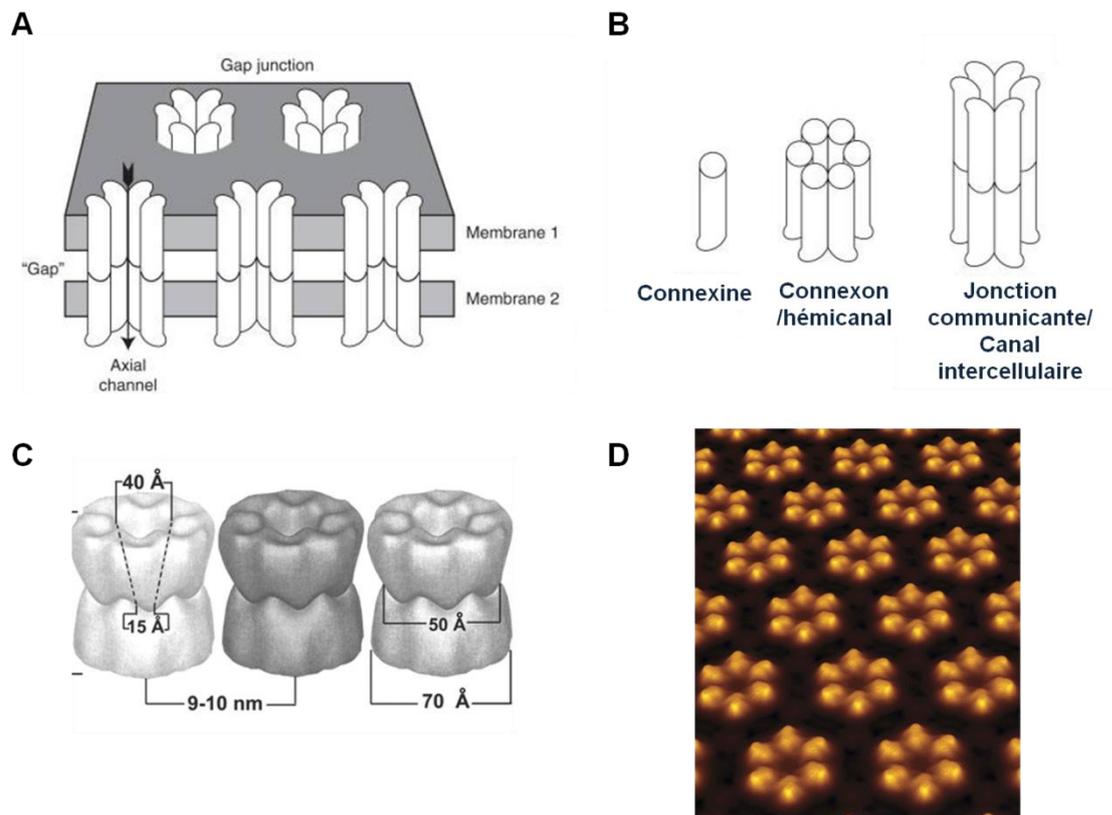


Figure 31: Structure des jonctions communicantes ou gap.

(A) Les canaux intercellulaires se regroupent pour former une jonction communicante entre deux cellules adjacentes séparées par une mince fente ou « gap » en anglais. (B) Lien schématique entre la connexine, le connexon et le canal intercellulaire. Six monomères de connexine s'associent pour former un connexon. L'apposition de deux connexons/hémicanaux l'un à l'autre forme une jonction communicante ou un canal intercellulaire. (C) Dimensions des jonctions gap estimées par des études de diffraction aux rayons X. (D) Représentation par microscopie de force atomique des hémicanaux ou connexons formés d'une association hexamérique de connexines. *D'après (Saez, Berthoud et al., 2003 ; Yu, Bippes et al., 2007 ; Goodenough and Paul 2009).*

VI.1.3 Nomenclature

La première séquence codante pour la Cx d'un poids moléculaire de 32 kilodaltons (kDa) fut isolée du foie murin et humain en 1986 (Kumar and Gilula 1986 ; Paul 1986). Puis, d'autres connexines furent isolées du cœur de rongeurs. Suite à la découverte rapide d'autres types de Cx, une première nomenclature fut proposée dans laquelle les Cx étaient nommées en fonction de leurs tissus d'origine, cependant cette nomenclature était inappropriée car les différents types de Cx ne sont pas spécifiques d'un type cellulaire.

Ainsi, afin de distinguer les différents membres de cette famille, une nomenclature standard a été utilisée qui fait référence à la masse moléculaire prédite à partir de l'ADNc (en kDa) précédée par le préfixe Cx. Dans certains cas, un préfixe est ajouté pour dénommer l'espèce d'origine, par exemple hCx pour les connexines découvertes chez l'homme (Beyer, Paul *et al.*, 1987 ; Beyer, Paul *et al.*, 1990). La première connexine de 32 kDa découverte dans le foie de souris a été nommée Cx32 et celle découverte dans le cœur de rat de 43 kDa, Cx43. Si les connexines présentent des masses moléculaires très proches, elles sont différenciées par l'ajout d'un chiffre décimal (par exemple, la mCx30.3 ou la mCx31.1, avec le préfixe m signifiant « mouse »).

VI.2 Composantes moléculaires des jonctions gap

VI.2.1 La famille multigénique des connexines

Les jonctions gap sont formées d'une association de deux connexons qui sont chacun formés de six connexines. Les connexines appartiennent à une famille multigénique comprenant 21 gènes chez l'Homme et 20 gènes chez la souris ([Figure 32A](#)), 19 étant regroupés en paires orthologues (Sohl and Willecke 2004). La plupart des gènes codant pour les connexines montrent une structure identique (deux exons et un intron) (Saez, Berthoud *et al.*, 2003) présentant une homologie de 40 % entre eux. Le premier exon contient une séquence 5' non traduite (5' UTR) et est suivi d'un intron de longueur variable. Le deuxième exon contient le reste de la région 5' UTR, la région codante complète et la région 3' non traduite ([Figure 32B](#)).

Par ailleurs, au départ, on pensait que les Cx pouvaient former des jonctions communicantes uniquement chez les vertébrés. Cependant, chez les invertébrés, une autre famille de protéines des jonctions gap a été identifiée et dénommée **innexines** (Inx) pour leur origine (**invertébrés**) (Panchin, Kelmanson *et al.*, 2000).

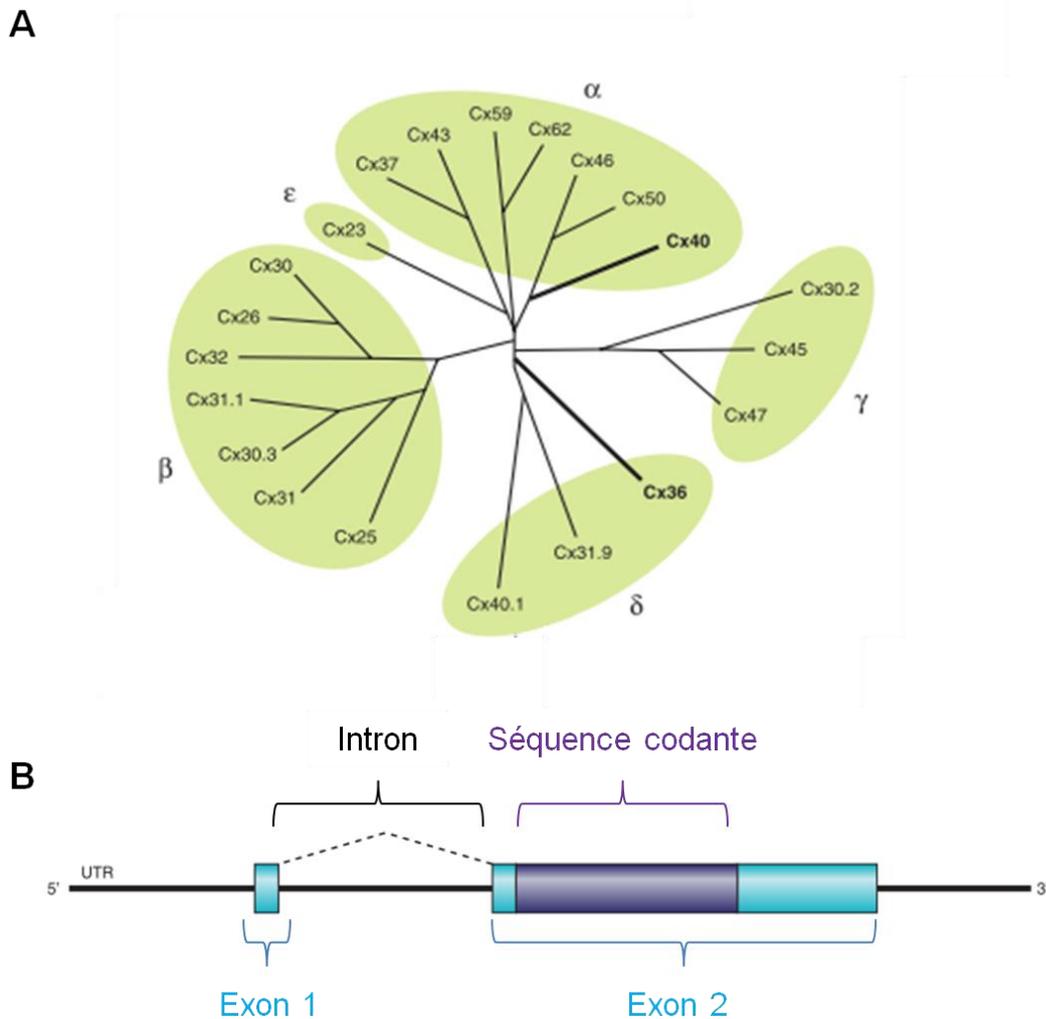


Figure 32: La famille multigénique des connexines.

(A) La famille des connexines humaines comprend 21 membres et chaque connexine est codée par un gène différent. L'arbre phylogénétique des Cx humaines montre qu'elles appartiennent à 5 sous-groupes distincts α , β , γ , δ , ϵ . (B) Structure commune du gène codant pour la Cx. D'après (Bosco, Haefliger et al., 2011).

VI.2.2 La topologie des connexines

Les protéines constituant les Cx ont été hautement conservées au cours de l'évolution, à la fois au niveau de la séquence et de la topologie. Chaque Cx est constituée de quatre domaines transmembranaires comprenant chacun 20 acides aminés (M1, M2, M3 et M4) (Figure 33). Les domaines N et C terminaux sont localisés au niveau du cytoplasme. Les connexines présentent deux boucles extracellulaires (EC1 et EC2) qui correspondent aux régions les plus conservées et une boucle intracellulaire (IC) variable située entre les domaines M2 et M3. Chaque boucle EC contient trois résidus cystéine. Les résidus cystéine servent essentiellement à l'ancrage des connexons l'un face à l'autre via la formation de

ponts disulfures interboucles et intracaténaïres (Dupont, el Aoumari *et al.*, 1989 ; John and Revel 1991 ; Rahman, Carlile *et al.*, 1993).

Les quatre domaines transmembranaires sont également hautement conservés et forment des hélices α qui contribuent à la formation de la paroi du connexon et entourent l'espace central hydrophile. Il s'avère que l'espace hydrophile (le pore du canal) est formé par le domaine transmembranaire M3 de par sa teneur en résidus chargés positivement et négativement (Bennett, Barrio *et al.*, 1991). Le domaine N terminal est identique pour toutes les Cx. Par contre, le domaine C terminal diffère en taille et en séquence, permettant l'élaboration d'anticorps spécifiques d'une isoforme de Cx. Ainsi, l'extrémité C-terminale de la Cx 26 possède 16 acides aminés alors que la Cx 43 en possède 156, ce qui explique les variations de poids entre les différentes isoformes de Cx (Bosco, Haefliger *et al.*, 2011).

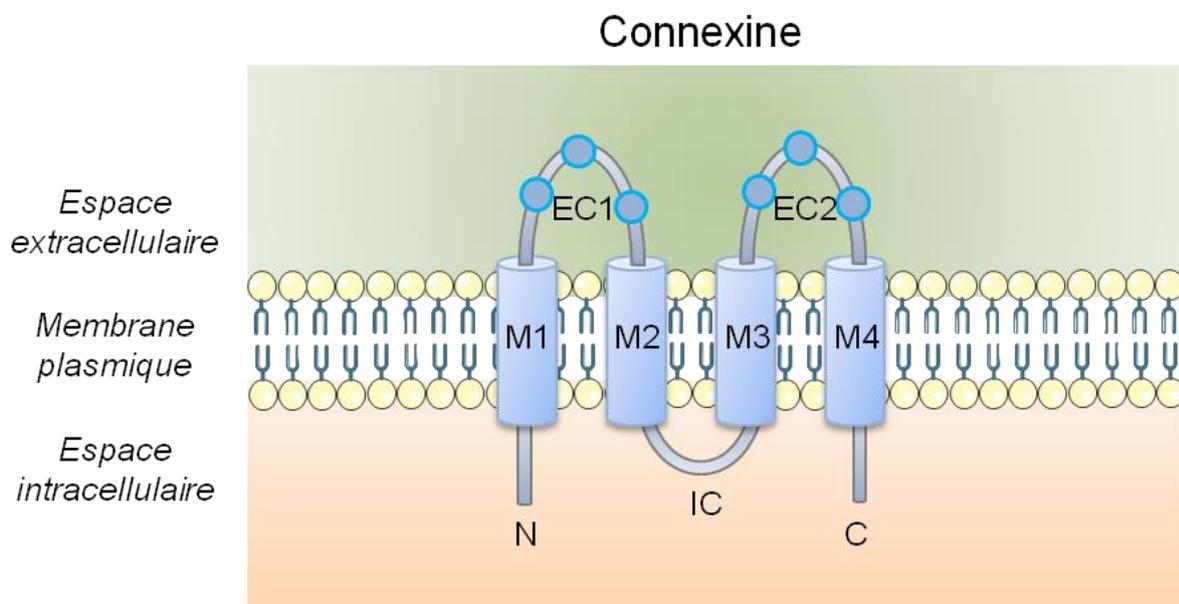


Figure 33: Structure topologique d'une connexine (Cx).

Une Cx est composée de quatre domaines transmembranaires (M1, M2, M3 et M4). Les domaines N et C terminaux sont cytoplasmiques. La Cx possède deux boucles extracellulaires (EC1 et EC2) et une boucle intracellulaire (IC). Les boucles EC1 et EC2 contiennent trois résidus cystéines. *D'après (Bosco, Haefliger et al., 2011).*

VI.2.3 Expression tissulaire des Cx

Chez les vertébrés, la majorité des types cellulaires exprime les Cx à l'exception des globules rouges, des spermatozoïdes matures et du muscle squelettique adulte (Kumar and Gilula 1996 ; Rackauskas, Neveauskas *et al.*, 2010). Certaines Cx peuvent avoir une distribution tissulaire très large, tandis que d'autres sont restreintes à un ou deux types cellulaires. Par exemple, la Cx33 n'est exprimée qu'au niveau des testicules, alors que la Cx40 ou encore la Cx37 possèdent des répartitions plus étendues. La Cx la plus ubiquitaire correspond à la Cx43 qui est présente dans 34 tissus et 46 types cellulaires différents et il s'agit également de la Cx la plus étudiée. Le Tableau 4 résume la distribution tissulaire des différentes isoformes de Cx retrouvées chez l'humain et la souris.

Connexine humaine	Connexine souris	Profil d'expression des connexines au sein des différents tissus
Cx 23	Cx 23	Absence d'expression
Cx 25		Génome humain
Cx 26	Cx 26	Glande mammaire, peau, cochlée, foie, endomètre, cellules gliales, épithélium des voies aériennes respiratoires, tubules séminifères, pancréas
Cx 30	Cx 30	Peau, cerveau, cochlée, épithélium des voies aériennes respiratoires, glandes exocrines
Cx 31.3	Cx 29	oligodendrocytes, muscle squelettique, foie, pancréas, reins
Cx 30.3	Cx 30.3	Peau
Cx 31	Cx 31	Peau, voies aériennes respiratoires, cochlée, placenta
Cx31.1	Cx31.1	Peau
Cx31.9	Cx30.2	Cœur, cerveau
Cx 32	Cx32	Foie, peau, cellules de Schwann, oligodendrocytes, endomètre, cellules glandulaires
	Cx33	Testicules
Cx36	Cx36	Rétine, cellules β -pancréatiques, neurones du système nerveux central
Cx37	Cx37	CML vasculaires, endothélium, ovaires, peau
Cx40	Cx40	Peau, système nerveux central, endothélium, cœur
Cx40.1	Cx39	Génome humain, muscle de souris en cours de développement
Cx43	Cx43	Cx la plus exprimée, présente dans 34 tissus différents et 46 types cellulaires : blastocystes, peau, cornée, fibroblastes, ostéoblastes, reins, glandes mammaires, cellules musculaires cardiaques, cellules épithéliales pulmonaires, kératinocytes, hypophyse antérieure, parathyroïdes, thyroïde, pancréas, surrénales, testicules, ovaires, myomètre, muscle lisse, cellules endothéliales, cristallin, astrocytes, cellules épithéliales rénales tubulaires, macrophages, tissu conjonctif, placenta
Cx45	Cx45	Cellules épithéliales pancréatiques, cœur, oligodendrocytes, astrocytes, système vasculaire, peau, ostéoblastes, rétine, utérus
Cx46	Cx46	Cristallin, épithélium alvéolaire
Cx47	Cx47	Cerveau, moelle épinière, oligodendrocytes
Cx50	Cx50	Cristallin
Cx58		Génome humain
Cx62	Cx57	Cellules horizontales de la rétine, ovocytes de souris

Tableau 4: Résumé de la distribution tissulaire des connexines chez l'humain et la souris.

D'après (Rackauskas, Neveauskas et al., 2010)

VI.2.4 Le cycle de vie des connexines

Les Cx ont une demi-vie courte de 1,5 à 5 heures, par rapport aux autres protéines transmembranaires (Laird, Puranam *et al.*, 1991 ; Beardslee, Laing *et al.*, 1998). Ainsi, la régulation de l'expression protéique des Cx et le trafic des Cx ont une influence sur le

nombre de jonctions gap intercellulaires (Su and Lau 2014). Les Cx sont donc en perpétuelle biosynthèse et dégradation. Il est probable que les Cx ont un cycle de vie très court afin de réguler finement le nombre de jonctions gap en fonction des demandes physiologiques de l'organisme (Laird 2006).

VI.2.4.1 Biosynthèse et oligomérisation des Cx

La biosynthèse ainsi que l'oligomérisation des six Cx en connexon (hémicanal) commencent au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et se terminent dans le réseau trans-golgien (Laird 2006). Cependant, la localisation précise de l'assemblage des Cx en connexon est dépendante de chaque type de Cx. Par exemple, la Cx32 s'assemble dans le RE ou dans le compartiment intermédiaire RE/Golgi alors que la Cx43 s'assemble dans le réseau trans-golgien (Saez, Berthoud *et al.*, 2003). L'oligomérisation hexamérique des sous-unités protéiques de Cx est indispensable pour le fonctionnement du connexon. Le connexon peut être soit sous forme homomérique (composé d'isoformes de connexines identiques, ex. Cx43 uniquement), soit hétéromérique (composé d'isoformes de Cx différentes, ex. Cx43 et Cx45). En fait, un canal intercellulaire peut être homotypique (formé de deux connexons homomériques) ou hétérotypique (formé de l'association d'un connexon homomérique composé de Cx43 avec un autre connexon homomérique formé de Cx45 ou formé de deux connexons hétéromériques) (Kumar and Gilula 1996 ; Segretain and Falk 2004 ; Laird 2006) (Figure 34).

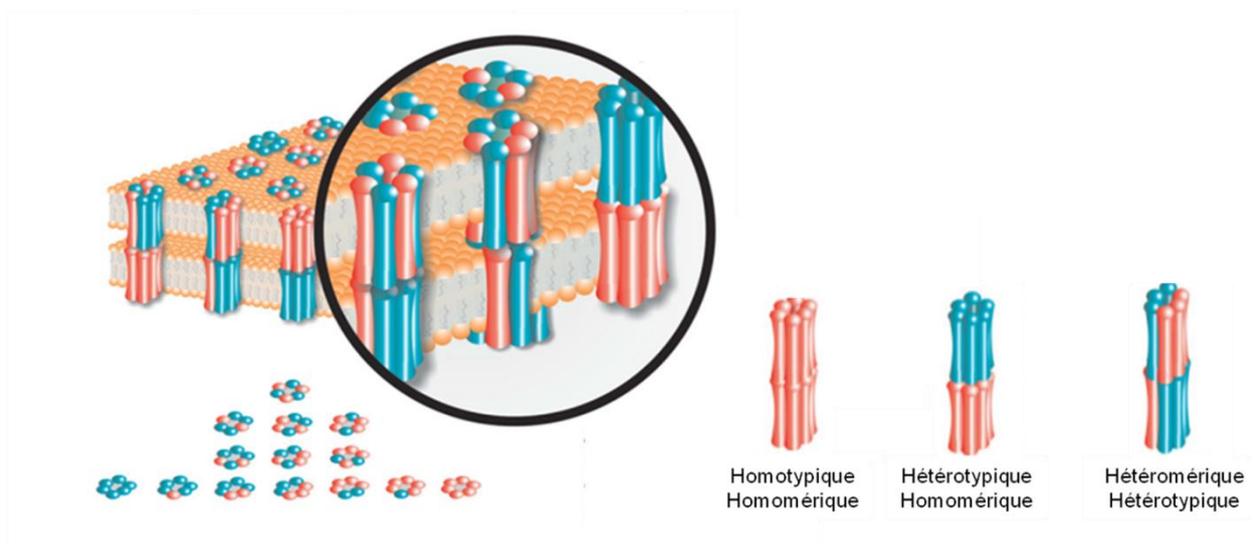


Figure 34: Assemblage des connexines en jonction gap.

Six connexines s'oligomérisent pour former un connexon ou un hémicanal qui peut être soit homomérique soit hétéromérique. Chaque connexon s'ancre « bout à bout » dans la bicouche lipidique cellulaire pour former des canaux intercellulaires de type homotypique ou hétérotypique. L'association des canaux intercellulaires forme la jonction gap. *D'après (Laird 2006).*

VI.2.4.2 Transport et adressage membranaire

Suite à l'oligomérisation, les connexons sont internalisés dans des vésicules qui sont transportées le long des microtubules et des filaments d'actine, depuis l'appareil de Golgi, vers la membrane plasmique (Laird 2006 ; Smyth and Shaw 2012). Une fois insérés dans la bicouche lipidique, les connexons peuvent bouger librement et sont guidés par des protéines des jonctions adhérentes (N et E cadhérines) pour leur ancrage avec les connexons des cellules adjacentes formant ainsi la jonction intercellulaire (Figure 35). Il existe un co-assemblage entre la N-cadhérine et la Cx43, ce qui suggère l'existence d'une interaction entre les protéines de jonctions adhérente (N et E cadhérines) et de jonction gap (Cx43). L'ancrage membranaire de plusieurs connexons donne lieu à une plaque de jonctions communicantes. En règle générale, les connexons nouvellement synthétisés sont libérés à la périphérie de la plaque jonctionnelle et, au cours du temps, ils migrent vers le centre de la plaque. Ainsi, les jonctions gap situées au centre de la plaque sont alors en fin de cycle et sont retirées de la plaque par internalisation dans des structures à double membrane appelées connexosomes ou jonctions gap annulaires qui sont ensuite dégradées (Gaietta, Deerinck *et al.*, 2002 ; Lauf, Giepmans *et al.*, 2002) (Figure 35).

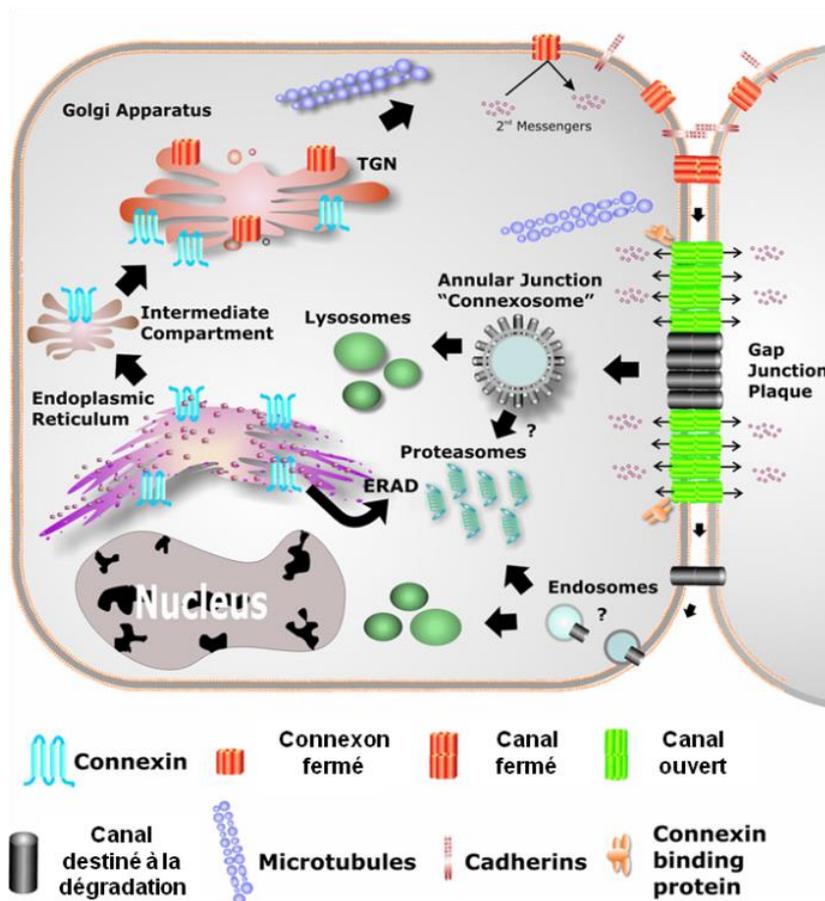


Figure 35: Cycle de vie des connexines.

Suite à l'oligomérisation, les connexons sont transportés depuis de l'appareil de Golgi, le long des microtubules, pour leur insertion dans la membrane plasmique. Les connexons diffusent de manière latérale le long de la membrane plasmique et forment des canaux intercellulaires. Les canaux s'assemblent en plaque jonctionnelle. Les canaux se trouvant au centre de la plaque sont internalisés par endocytose. Ils sont ensuite dégradés par voie lysosomale et/ou protéosomale. ERAD: « Endoplasmic-reticulum associated protein degradation ». TGN: « Trans-Golgi Network ». *D'après (Laird 2006)*

VI.2.4.3 Dégradation des jonctions gap internalisées

En 2001, l'utilisation d'anticorps anti-Cx ainsi que l'imagerie en temps réel sur la Cx taguée avec une étiquette fluorescente GFP, a permis de confirmer que les connexosomes/jonctions gap annulaires sont dérivés de jonctions gap pré-existantes provenant de l'interface cellule-cellule (Jordan, Chodock *et al.*, 2001). L'existence de ces connexosomes/jonctions annulaires indique que le canal intercellulaire ne se dissocie pas en hémicanaux avant d'être dégradé et que les hémicanaux non plus ne se dissocient pas en Cx individuelles mais que toute la plaque est dégradée en une seule entité. Les connexosomes/jonctions annulaires peuvent être dégradés via 3 voies différentes: soit par

ubiquitinylation via le système protéasomique, soit par la voie endo/lysosomale ou encore par la voie de l'autophagie (Figure 36) (Laird 2006 ; Su, Cochrane *et al.*, 2012 ; Falk, Kells *et al.*, 2014 ; Su and Lau 2014). En effet, en 2012, deux équipes démontrent que les autophagosomes forment un cercle autour des connexosomes et ensuite la vésicule nouvellement formée fusionne avec les lysosomes (Bejarano, Girao *et al.*, 2012 ; Fong, Kells *et al.*, 2012).

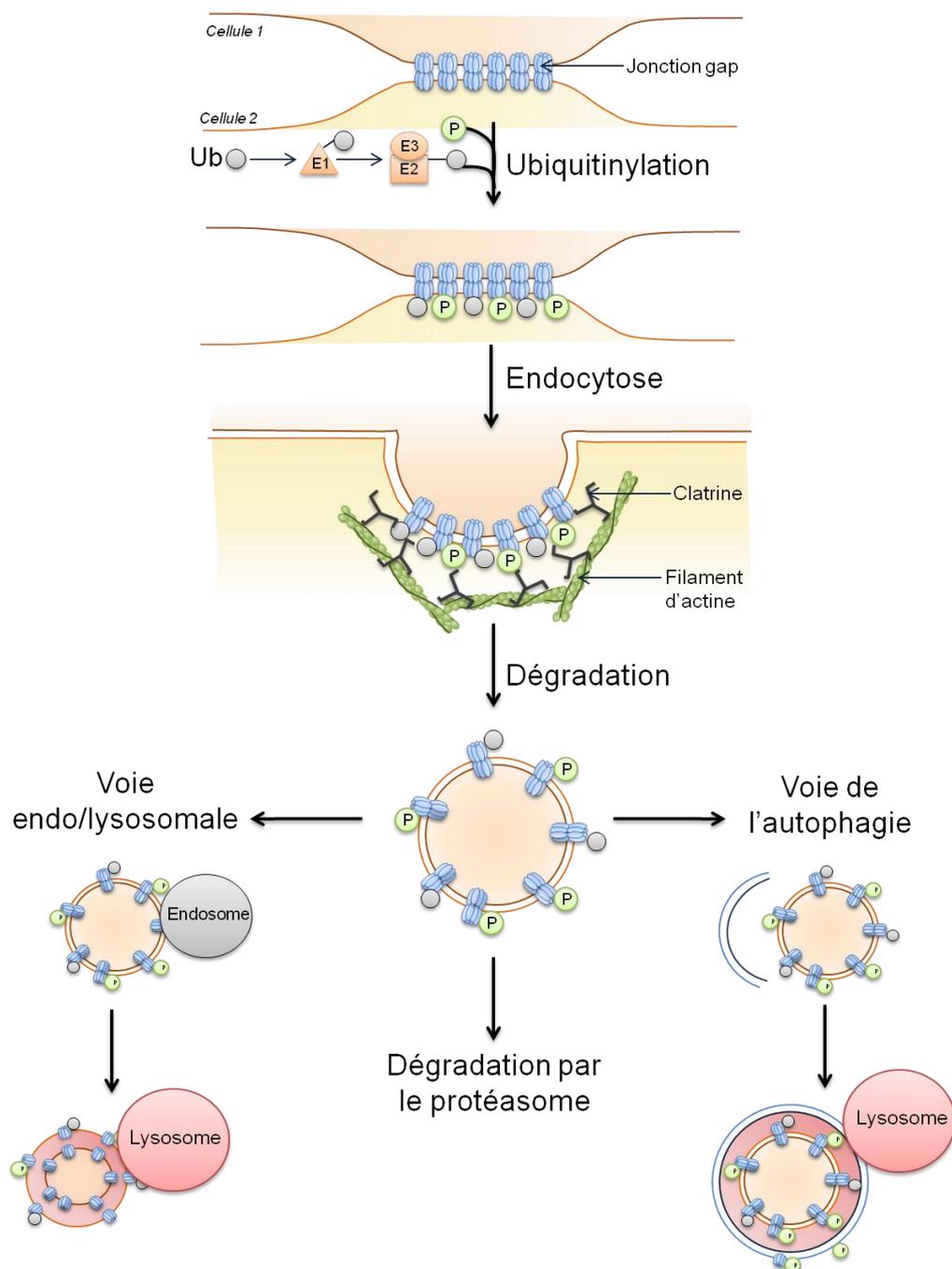


Figure 36: Voies de dégradation des connexosomes/jonctions annulaires.

La plaque jonctionnelle endocytée est dégradée soit via la voie endo/lysosomale, soit via la voie protéasomale, soit par autophagie. D'après (Laird 2006 ; Falk, Kells *et al.*, 2014).

VI.2.5 La régulation de la communication intercellulaire

La communication intercellulaire est régulée selon trois voies : (1) le nombre de canaux présents à la membrane, (2) leur état fonctionnel et (3) leur perméabilité. Ces régulations sont majoritairement dépendantes de l'état de phosphorylation des Cx. Mais les Cx sont également sensibles à d'autres stimuli tels que le potentiel, le pH intracellulaire et la $[Ca^{2+}]$ intracellulaire.

VI.2.5.1 Phosphorylation des Cx

L'extrémité C-terminale cytoplasmique des Cx subit des phosphorylations par des kinases de par la présence de nombreux résidus sérine, thréonine et tyrosine. Il a été démontré que de nombreuses Cx (Cx31, Cx32, Cx36, Cx37, Cx40, Cx43 et Cx45) sont des phosphoprotéines (Saez, Martinez *et al.*, 1998 ; Solan and Lampe 2005). L'activation des protéines kinases ou des phosphatases influence la communication cellulaire et le renouvellement des canaux intercellulaires. L'état de phosphorylation des Cx modifie la communication électrique et métabolique entre les cellules contiguës en changeant la structure moléculaire du canal, ce qui influence la conductance unitaire du canal (Moreno, Fishman *et al.*, 1992), le temps moyen d'ouverture du canal (Cottrell, Lin *et al.*, 2003), et/ou la probabilité d'ouverture du canal (van Veen, van Rijen *et al.*, 2000). De plus, la phosphorylation altère la charge nette du domaine C-terminal, ce qui module la sensibilité des Cx au potentiel ou au pH.

La Cx43 étant l'isoforme la plus exprimée, elle fait l'objet de nombreuses études intensives en ce qui concerne les différents sites de phosphorylations. Elle ne contient aucun résidu sérine au niveau de la boucle cytoplasmique et elle ne possède pas de site de phosphorylation au niveau de son domaine N-terminal. Cependant, l'activation des PKA, PKC, cycline B kinase, caséine kinase CK1, MAPK et Src tyrosine kinase augmente l'état de phosphorylation des résidus sérine 255, 262, 265, 279, 282, 328, 330, 364, 365 et 368 présents au niveau du domaine C-terminal (pour revue : Rackauskas, Neverauskas *et al.*, 2010). Chaque protéine kinase phosphoryle des résidus sérines spécifiques et influence de manière différente la fonctionnalité du canal. Par exemple, la PKC phosphoryle les sérines 262 et 368. La phosphorylation de la sérine 262 potentialise la progression du cycle cellulaire tandis que la phosphorylation de la sérine 368 diminue de moitié la conductance unitaire des canaux intercellulaires composés de Cx43 (Solan and Lampe 2009). La PKC phosphoryle également la sérine 368 et diminue la communication intercellulaire en induisant l'internalisation des Cx43 (Billaud, Lohman *et al.*, 2014). Quant à la MAPK, elle phosphoryle les sérines 255, 279 et 282, induisant une diminution du temps d'ouverture des canaux intercellulaires (Solan and Lampe 2009). L'activation de la MAPK induit également une

augmentation de l'internalisation des Cx43. La protéine kinase CK1, quant à elle, phosphoryle les sérines 325, 328 et 330, ce qui potentialise l'assemblage des Cx43 en connexons (Solan and Lampe 2009). L'activation de la PKA augmente l'insertion des Cx43 au niveau de la membrane plasmique. De plus, l'état de phosphorylation de la Cx43 ainsi que la communication cellulaire sont augmentés par le NGF (« nerve growth factor » ou facteur de croissance des nerfs) (Cushing, Bhalla *et al.*, 2005).

Par ailleurs, la Cx26 est l'unique isoforme qui ne possède pas de sites de phosphorylation de par la présence d'un faible nombre d'acides aminés (18 acides aminés) au niveau de son extrémité C-terminale. Cependant, la présence de Cx26 au niveau des connexons n'empêche pas la formation d'une jonction fonctionnelle (Traub, Look *et al.*, 1989).

VI.2.5.2 Autres régulations des Cx

La communication intercellulaire est sensible au potentiel, au Ca^{2+} , au pH intracellulaire et aux interactions protéiques.

○ Sensibilité au potentiel

En ce qui concerne le potentiel, les canaux composés de Cx43 sont relativement insensibles au potentiel transjonctionnel par rapport aux canaux composés de Cx 45. Chaque hémicanal composant la jonction gap contient deux zones sensibles au potentiel : (1) une zone dite rapide, localisée au niveau de l'entrée cytoplasmique de l'hémicanal et (2) une zone dite lente ou « boucle », localisée vers les extrémités extracellulaires des hémicanaux. Les canaux composés de Cx26, Cx30, Cx50 se ferment pour des valeurs positives, en revanche les canaux composés de Cx31, Cx32, Cx37, Cx40, Cx43, Cx45 et Cx57 se ferment pour des valeurs négatives. Les Cx peuvent être classées selon deux groupes en fonction de leur polarité de fermeture : les Cx45 et Cx57 se ferment lors d'une hyperpolarisation tandis que les canaux composés de Cx43, Cx26 et Cx30 se ferment lors des dépolarisations (pour revue : Rackauskas, Neverauskas *et al.*, 2010).

○ Effet du Ca^{2+}

Une forte concentration en Ca^{2+} intracellulaire induit la fermeture des jonctions communicantes. Toutefois, la sensibilité des jonctions communicantes au Ca^{2+} varie en fonction du type de Cx ainsi que du type cellulaire. Les canaux intercellulaires laissent passer les ions Ca^{2+} pour une concentration de 200 nM. Lorsque la concentration calcique est supérieure à 200 nM, cela induit la fermeture des canaux intercellulaires. Cette fermeture des jonctions communicantes par le calcium joue un rôle important dans la protection des cellules lors des dépolarisations membranaires. En effet, les Cx possèdent des sites spécifiques de liaison à la calmoduline au niveau de leurs boucles intracellulaires. Le Ca^{2+} se fixe à la calmoduline et induit un changement de conformation de la calmoduline, permettant

l'interaction du complexe calmoduline/Ca²⁺ avec les Cx. Une telle interaction a été mise en évidence pour les Cx43, Cx37, Cx38, Cx32, Cx44 et Cx 50.

- Sensibilité au pH

Les Cx contiennent des sites de régulation sensibles au pH intracellulaire. En effet, la protonation des résidus histidines présents au niveau du domaine C-terminal et de la boucle cytoplasmique des Cx module la perméabilité des jonctions communicantes. Ainsi, l'acidification du milieu intracellulaire provoque un changement de conformation de la Cx43 induisant la fermeture du canal intercellulaire (Wei, Xu *et al.*, 2004).

- Interactions protéiques

En plus de la régulation via l'environnement intracellulaire, la communication intercellulaire est également régulée via des interactions directes avec des protéines localisées dans des microdomaines de signalisation. Parmi celles-ci, on retrouve la cavéoline (Cav-1 et Cav-2) et les protéines des jonctions serrées, la zonula occludens (ZO).

De nombreuses études d'interactions, telles que la colocalisation par immunofluorescence et la co-immunoprécipitation, ont montré que les Cx vasculaires 32, 37, 43 et 40 peuvent interagir avec la cav-1 ainsi que la cav-2 au niveau de la membrane plasmique (Schubert, Schubert *et al.*, 2002 ; Locke, Liu *et al.*, 2005 ; Langlois, Cowan *et al.*, 2008 ; Saliez, Bouzin *et al.*, 2008). Des études où la séquence protéique de la Cx43 a été tronquée ont démontré que la Cav-1 interagit avec la Cx43 au niveau des résidus 244-256 de la partie C-terminale. De plus, les Cx43 nouvellement synthétisées peuvent également interagir avec la Cav-1 et la Cav-2 dans le Golgi, indiquant que les deux isoformes de cavéolines sont impliquées dans le transport membranaire des Cx (Langlois, Cowan *et al.*, 2008). D'autre part, l'utilisation de souris déficientes pour la Cav-1 a démontré que le niveau d'expression des Cx37, 40 et 43 ainsi que la formation de jonctions gap sont diminuées chez ces souris (Saliez, Bouzin *et al.*, 2008).

Au niveau de leurs points d'insertion dans la membrane plasmique, les hémicanaux composés de Cx interagissent avec les ZO-1/2/3 (Toyofuku, Akamatsu *et al.*, 2001 ; Singh, Solan *et al.*, 2005 ; Palatinus, Rhett *et al.*, 2012). Des études d'interactions directes (co-immunoprécipitation, immunofluorescence, proximity ligase assay, compétition du peptide et pull down assay) entre la ZO-1 et les Cx43 et 45 ont mis en évidence une interaction entre ces protéines au niveau de la membrane plasmique (Kausalya, Reichert *et al.*, 2001 ; Laing, Manley-Markowski *et al.*, 2001 ; Laing, Chou *et al.*, 2005 ; Laing, Koval *et al.*, 2005). L'interaction entre la ZO-1 et la Cx43 n'est pas requise pour le bon fonctionnement de la jonction gap mais elle intervient dans la régulation négative de l'accumulation des jonctions gap au niveau de la membrane plasmique, ce qui permet alors de limiter la taille ainsi que la stabilité de la plaque jonctionnelle. De plus, la phosphorylation de la sérine 368 est

dépendante de l'interaction de la Cx43 avec ZO-1 car, en l'absence de ZO-1, la Cx43 n'est pas phosphorylée par la PKC ϵ (Akoyev and Takemoto 2007).

Enfin, la Cx interagit également avec les protéines du cytosquelette telles que l'actine α , la tubuline α et β et la drébrine, une protéine de liaison à l'actine présente au niveau des CE et des CML vasculaires. Ces interactions permettent l'adressage correct des Cx à la membrane plasmique (Herve, Derangeon *et al.*, 2008). Par ces diverses associations, les Cx entrent dans la composition de complexes multiprotéiques ou microdomaines, où les différents acteurs de la signalisation intracellulaire sont regroupés (Herve, Bourmeyster *et al.*, 2007).

VI.2.6 Propriétés physiologiques des jonctions communicantes

Les propriétés des jonctions gap sont très diverses et incluent l'échange de signaux électriques et de métabolites entre les cellules, ainsi que des fonctions qui ne sont pas liées à leurs propriétés de communication intercellulaire (Nielsen, Axelsen *et al.*, 2013). Étant donné qu'il existe plusieurs isoformes de Cx et que leur oligomérisation forme des canaux de nature homo ou hétérotypique, chaque canal intercellulaire possède des propriétés uniques en termes de conductance unitaire, de perméabilité moléculaire et une sensibilité unique à la régulation chimique et électrique. Ainsi, en combinant les 21 isoformes de Cxs, il existe 190 possibilités de conformations de jonctions communicantes hétérotypiques faisant alors varier leurs propriétés (Cottrell and Burt 2005). Cette diversité d'associations rend complexe la régulation de l'activité de la jonction gap.

VI.2.6.1 Couplage électrique

Les jonctions gap assurent entre les cellules la diffusion directe, de cytoplasme à cytoplasme, d'ions selon le gradient électrochimique, permettant ainsi aux cellules d'homogénéiser et de propager de manière synchrone le signal électrique. Elles assurent ainsi le passage de molécules d'une taille inférieure à 1kDa. Des études incluant la mesure de la conductance du canal unitaire, la sélectivité ionique et la perméabilité aux traceurs fluorescents de différentes tailles, charges et propriétés chimiques, ont mis en évidence les propriétés du canal jonctionnel. Il a donc été démontré que les jonctions gap homotypiques composées de Cx43, 40, 37 et 45 présentent une sélectivité similaire pour les cations monovalents (K^+ et Na^+) en revanche les canaux composés de Cx32 présentent une meilleure sélectivité pour les anions (pour revue : Nielsen, Axelsen *et al.*, 2012).

Par ailleurs, la conductance ainsi que la perméabilité des canaux jonctionnels dépendent de la composition en Cx. Par exemple, les canaux composés de Cx36 présentent une faible conductance de 14 pS tandis que les canaux composés de Cx37 présentent une très forte conductance électrique de 300 pS (pour revue : Nielsen, Axelsen *et al.*, 2012). Ce

type de communication électrique joue un rôle primordial dans les types cellulaires dont les fonctions sont associées à une dépolarisation, tels que les neurones, les CML et les cellules sécrétrices et sensorielles, générant ainsi une réponse synchronisée des cellules.

VI.2.6.2 Couplage métabolique

L'échange via les jonctions gap implique également des petits métabolites, des seconds messagers, des peptides ou des ARN interférents (Berman, Martin *et al.*, 2002 ; Goodenough and Paul 2003 ; Saez, Berthoud *et al.*, 2003 ; Herve and Derangeon 2013). Par rapport au couplage électrique, le couplage métabolique intervient pour des processus physiologiques beaucoup plus lents tels, que la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire, le développement embryonnaire et la prolifération. La contribution du couplage métabolique à la mort cellulaire implique l'échange d'IP₃, d'AMP_c et de GMP_c à travers ces canaux. En revanche, la survie cellulaire est plutôt liée à un échange d'ATP, de glucose, d'acide ascorbique ou de glutathion (Decrock, Vinken *et al.*, 2009).

VI.2.6.3 Connexine et développement embryonnaire

Chez la souris, lors du développement embryonnaire, le gène codant pour la Cx43 apparaît déjà lors du stade de deux cellules. Au stade de huit cellules, on observe l'apparition de l'expression génique d'autres types de Cx, telles que la Cx30.3, 31, 31.1, 40 et 45. Les jonctions communicantes sont alors impliquées dans la pré-implantation de l'embryon et également dans la mise en place de l'asymétrie droite gauche des organes.

D'autre part, chez l'homme, la formation du placenta et notamment la fusion du cytotrophoblaste en syncytiotrophoblaste, nécessite la présence d'une communication intercellulaire fonctionnelle. Cette communication jonctionnelle permet alors les échanges de nutriments entre la mère et le fœtus.

La Cx43 joue un rôle crucial dans la morphogénèse de l'appareil cardio-pulmonaire. En effet, les souris invalidées pour le gène codant pour la Cx43 (souris Cx43^{-/-}) présentent des malformations cardiaques, pulmonaires et osseuses létales à la naissance. Ces souris meurent quelques heures après la naissance par asphyxie car elles présentent une obstruction du tronc pulmonaire, empêchant le sang d'atteindre les poumons lors de leur première inspiration (Reaume, de Sousa *et al.*, 1995 ; Wei, Xu *et al.*, 2004). Par ailleurs, la délétion partielle de la Cx43 (souris Cx43^{+/-}) n'est pas létale. Cependant, ces souris Cx43^{+/-} présentent une cavité ventriculaire droite élargie avec une diminution de l'épaisseur de la paroi du myocarde (Huang, Wessels *et al.*, 1998).

VI.3 Les jonctions communicantes dans la paroi vasculaire

VI.3.1 Au niveau du système vasculaire

L'une des premières indications du rôle physiologique des jonctions gap dans le système vasculaire provient des travaux de Segal et Duling en 1986 (Segal and Duling 1986). Ces auteurs identifièrent une « vasodilatation conductrice » au niveau des artérioles en amont d'un stimulus à pouvoir vasodilatateur. Ils ont suggéré alors l'existence d'une forme de communication directe. Cette communication intercellulaire via les jonctions communicantes permet la coordination rapide des réponses vasculaires en synchronisant la propagation des variations du potentiel membranaire et les ions calciques. Ainsi, le signal est propagé via le couplage qui se fait : entre les CML, entre les CE et entre les CML/CE (on parle de couplage jonctionnel gap de type myoendothélial) (Figuroa and Duling 2009). Par ailleurs, les jonctions communicantes sont aussi impliquées dans des phénomènes physiologiques plus lents tels que la prolifération, la différenciation et le développement cellulaire (Brisset, Isakson *et al.*, 2009).

VI.3.1.1 Isoformes exprimées

Au niveau de la paroi des vaisseaux sanguins, 4 isoformes de Cx ont été caractérisées : la Cx37, 40, 43 et 45. Cependant, il a été récemment montré que la Cx32 est exprimée dans les cellules endothéliales d'artères pulmonaires et d'aorte humaines. Les Cx32 au niveau de ces vaisseaux participent à la communication directe « cellule-cellule » via les jonctions gap (Okamoto, Akiyama *et al.*, 2009 ; Okamoto, Akiyama *et al.*, 2011 ; Fowler, Akins *et al.*, 2013).

L'expression des Cx au niveau de la paroi vasculaire varie en fonction de l'espèce animale et du lit vasculaire étudié.

Ainsi, au niveau de l'aorte (artère de type élastique) et des artères coronaires (artères de type musculaire), on retrouve une expression abondante et uniforme des Cx37 et 40 dans les CE. En revanche, l'expression de la Cx43 endothéliale est restreinte aux points d'embranchement, où le flux sanguin est turbulent (Gabriels and Paul 1998). Au niveau des CML de ces vaisseaux de gros calibre (aorte, artères coronaires), on retrouve une expression prédominante de la Cx43, celle-ci participe au contrôle de la mitose et ainsi jouerait un rôle dans la différenciation des CML (Brisset, Isakson *et al.*, 2009). Dans les CML, les jonctions communicantes sont également impliquées dans le tonus myogénique (Figuroa and Duling 2009).

VI.3.2 La jonction myoendothéliale (JME)

L'ultrastructure de la jonction myoendothéliale (JME) a été décrite pour la première fois par Moore et Ruska en 1957. Ils observèrent des protubérances des CE qui passent à

travers les fenêtres des lames élastiques internes pour établir un contact direct avec les CML (Moore and Ruska 1957). Plus tard, Rhodin et ses collaborateurs ont produit des images plus résolutes des JME au niveau des artérioles de lapin (Rhodin 1967). Il définit alors les JME comme des « structures de conduction » impliquées dans la communication inter cellulaire (Rhodin 1967).

La JME possède une ressemblance à la synapse du système nerveux et elles sont de tailles similaires (environ 0,5 μm de large et 0,5 μm de profondeur). Etant des structures de très petites tailles et localisées dans des zones très confinées (microdomaine de signalisation), la microscopie électronique demeure la technique de choix pour les étudier.

D'un point de vue morphologique, les JME sont principalement des extensions des CE ou dans une moindre mesure des CML, qui traversent la lame élastique interne de manière à créer un contact direct cellule-cellule (Figure 37). Les JME correspondent alors à des points de contact permettant la communication entre les CE et les CML (Sandow and Hill 2000 ; Billaud, Marthan *et al.*, 2009 ; Brisset, Isakson *et al.*, 2009 ; Gairhe, Bauer *et al.*, 2011 ; Gairhe, Bauer *et al.*, 2012). Les artères de petit calibre, notamment l'artère mésentérique et l'artère pulmonaire présentent la particularité de former des JME. En revanche, les artères de gros calibre ne possèdent pas cette particularité. Au niveau de ces JME, on retrouve l'expression des Cx37, 40 et 43. Dans les CE, la Cx43 joue un rôle essentiel dans la propagation des vagues calciques d'une CE à une autre (de Wit, Hoepfl *et al.*, 2006). De plus, les isoformes de Cx exprimées au niveau des JME varient en fonction du type de vaisseau étudié. D'autre part, le nombre de JME varie le long de l'arbre artériel et dépend de l'espèce et de l'organe étudiés.

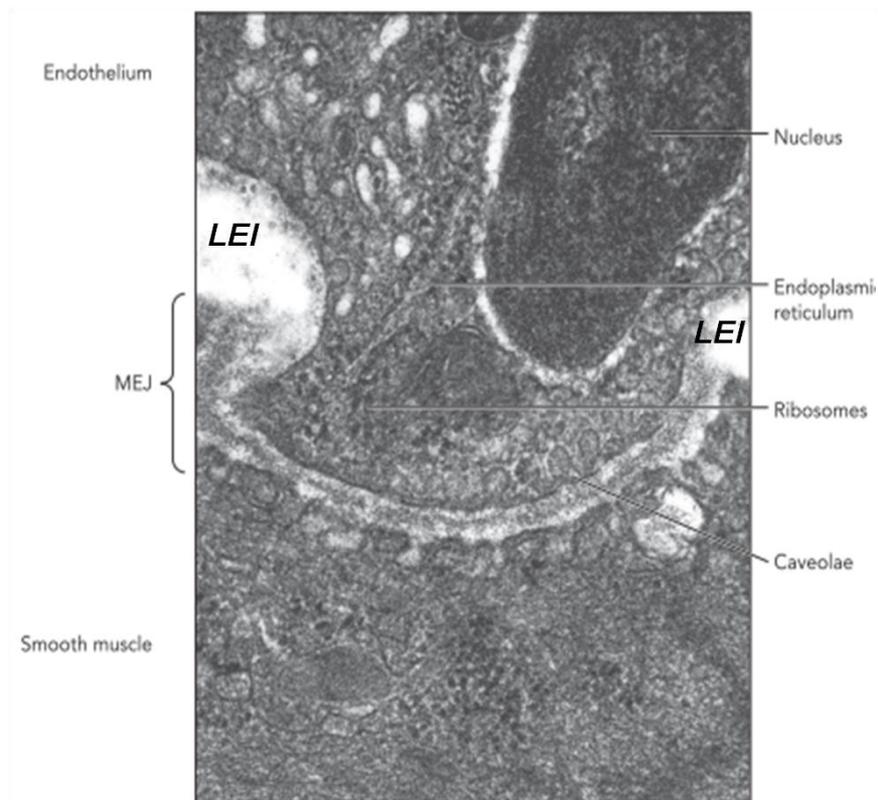


Figure 37: Ultrastructure d'une JME.

Image électronique à transmission d'une JME d'artériole issue du muscle spino-trapèze de
LEI : lame élastique interne. Pour revue : (Straub, Zeigler *et al.*, 2014)

VI.3.2.1 La jonction myoendothéliale et l'EDHF

Les JME sont particulièrement connues pour leurs rôles physiologiques dans la propagation du facteur hyperpolarisant dérivant de l'endothélium ou EDHF pour « endothelium derived hyperpolarizing factor » (Shimokawa, Yasutake *et al.*, 1996 ; Sandow and Hill 2000 ; Berman, Martin *et al.*, 2002). L'une des études qui montrent l'existence de ce phénomène indique une relaxation des vaisseaux en réponse à l'acétylcholine dérivant de l'endothélium mais n'implique pas la voie des prostaglandines et du NO (Vanhoutte 2004).

Le mécanisme de l'EDHF implique une augmentation du Ca^{2+} intracellulaire au niveau des CE puis un efflux de K^+ via les canaux K_{Ca} des CE vers l'espace extracellulaire myoendothélial, induisant la stimulation de la pompe Na^+-K^+ ATPase et des canaux K_{IR} (canaux K^+ à rectification entrante) des CML, provoquant une sortie de K^+ des CML (Edwards, Feletou *et al.*, 2010). De plus, la libération d'EET des CE au niveau de la JME induit l'activation des canaux potassiques sensibles au Ca^{2+} et de grande conductance (BK_{Ca}) dans le muscle lisse (pour revue : Straub, Zeigler *et al.*, 2014). Des travaux récents

réalisés par l'équipe de Sonkusare ont démontré que la signalisation calcique ayant lieu à la JME en réponse à une stimulation à l'acétylcholine, active les canaux de type TRPV4 au niveau des CE. L'activation des TRPV4 induit un influx de Ca^{2+} extracellulaire et l'activation maximale des canaux potassiques de type IK_{Ca} et SK_{Ca} (pour « Intermediate conductance et small conductance » respectivement) provoquant ainsi une hyperpolarisation du muscle lisse.

De plus, la JME présente une dynamique calcique avec la présence des réticulums sarcoplasmiques, source importante de Ca^{2+} intracellulaire, des canaux K^+ sensibles au Ca^{2+} ($\text{KCa}_{2.3}$ et $\text{KCa}_{3.1}$) (Figure 38) (Heberlein, Straub *et al.*, 2009 ; Sonkusare, Bonev *et al.*, 2012).

Par ailleurs, des études basées sur l'utilisation de peptides mimétiques qui bloquent la formation des jonctions gap et de souris déficientes pour la Cx40 ont montré que la propagation de l'EDHF se fait via les jonctions gap composées de Cx40 localisées à la JME au niveau des artères mésentériques (Mather, Dora *et al.*, 2005 ; Boettcher and de Wit 2011).

D'autre part, des études fonctionnelles suggèrent que la JME est un microdomaine positionné de manière à réguler la communication cellule endothéliale – cellule musculaire lisse et de façon à influencer grandement la vasodilatation des vaisseaux de résistance (pour revue : Straub, Zeigler *et al.*, 2014).

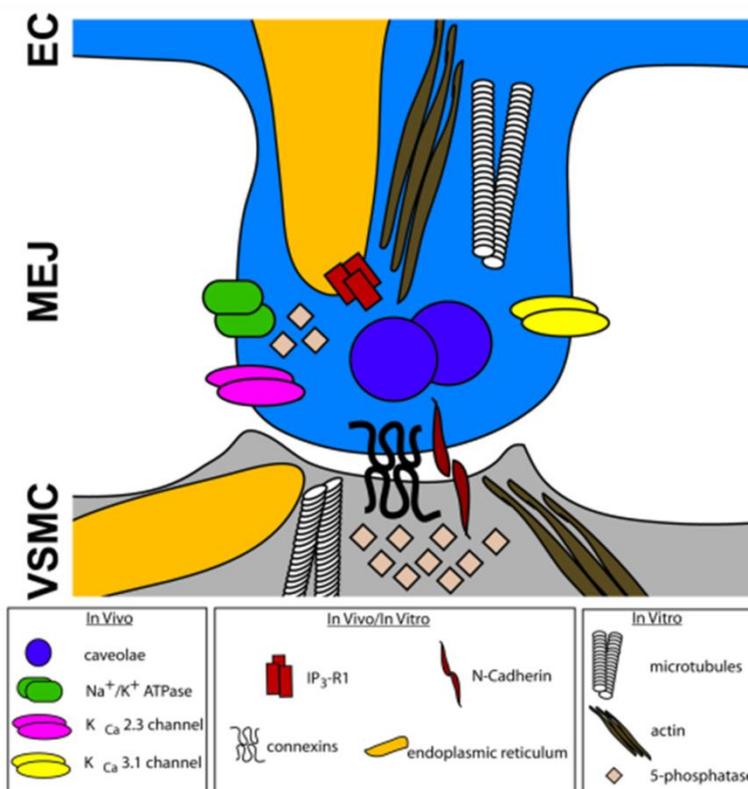


Figure 38: Protéines localisées à la JME.

Identification *in vivo* et *in vitro* de molécules de signalisation présentes au niveau des CML, CE et JME vasculaires. Abréviations : VSMC : vascular smooth muscle cell. MEJ : Myoendothelial junction, EC : endothelial cell. D'après (Heberlein, Straub *et al.*, 2009).

VI.3.2.2 Cavéoles, JME et EDHF

D'un point de vue structural, les cavéoles jouent un rôle important dans le maintien du microdomaine de signalisation de la voie de l'EDHF à la JME. En effet, des études ont montré que la réponse EDHF est abolie chez des souris déficientes pour la Cav-1 (souris KO Cav-1) (Saliez, Bouzin *et al.*, 2008). En parallèle, les souris KO Cav-1 présentent également une diminution de l'expression des Cx37, 40 et 43 à la JME. Enfin, les canaux TRPV4, les Cx37, 40 et 43 et les SKCa (canaux K⁺ dépendants du calcium de petite conductance) sont localisés dans les cavéoles et ils sont colocalisés et/ou immunoprécipitent avec la Cav-1 (Graziani, Bricko *et al.*, 2004 ; Absi, Burnham *et al.*, 2007 ; Saliez, Bouzin *et al.*, 2008).

VI.4 **Jonctions communicantes et pathologies vasculaires**

VI.4.1 Athérosclérose

L'athérosclérose est une maladie progressive inflammatoire touchant les artères de gros et moyen calibre. Les conséquences de cette maladie sont fatales et induit notamment un infarctus du myocarde ou encore une crise cardiaque (Kolodgie, Narula *et al.*, 2007 ; Yla-Herttuala, Bentzon *et al.*, 2011). L'expression des Cx évolue en même temps que la progression de l'athérosclérose d'un vaisseau sain à un vaisseau présentant une dysfonction endothéliale, jusqu'à la rupture de la plaque d'athérome (Brisset, Isakson *et al.*, 2009).

L'étape initiale de l'athérosclérose correspond à une dysfonction endothéliale induite par les forces de cisaillement du flux sanguin au niveau des bifurcations artérielles (Figure 39A). Dans les vaisseaux sains, la Cx37 est exprimée au niveau des CE et des monocytes circulants (Figure 39a). L'expression des Cx est changée au niveau des points d'embranchements artériels (Figure 39b et c). L'expression de la Cx43 augmente au niveau des CE tandis que l'expression des Cx37 est diminuée au niveau des CE et commence à être exprimée au niveau des CML (pour revue Morel 2014). Lorsque la plaque d'athérome se développe (Figure 39c), la partie coudée de la lésion athérosclérotique exprime la Cx43, tandis que les CE recouvrant la plaque d'athérome n'expriment pas de Cx (Figure 39c). Au niveau de l'intima des vaisseaux touchés par l'athérosclérose, on observe une prolifération des CML avec une sécrétion de matrice extracellulaire. Ces deux phénomènes induisent la formation d'une capsule fibreuse autour de la plaque d'athérome. La prolifération des CML dans l'intima est associée à une augmentation de l'expression des Cx43 dans les CML (pour revue : (Morel 2014). Quant à la Cx40, son expression est diminuée à mesure que l'endothélium devient non fonctionnel. Dans les stades les plus avancés de la pathologie, les CE n'expriment plus aucune Cx (Morel 2014).

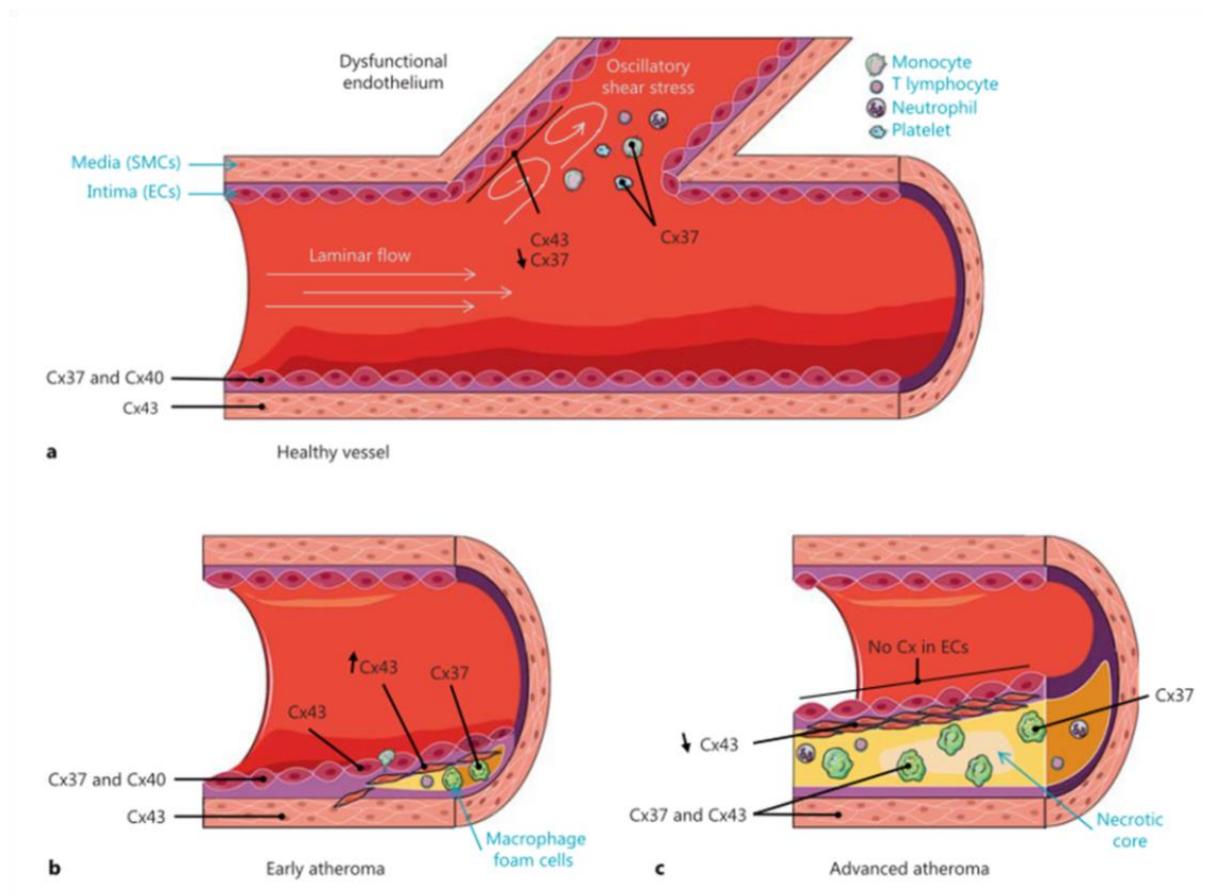


Figure 39: Représentation schématique de l'expression des Cx dans les vaisseaux sains et lors du développement de la plaque d'athérome.

(a) Les vaisseaux sains expriment les Cx37 et 40 au niveau des CE, tandis que les CML expriment les Cx43. Les forces de cisaillement présentes au niveau des bifurcations artérielles induisent dans les CE respectivement une augmentation et une diminution de l'expression des Cx43 et Cx37. Les monocytes circulants expriment la Cx37. Lors du développement de l'athérosclérose, l'expression de la Cx43 au niveau de l'intima contenant des CML prolifératives augmente dans un premier temps (b) et diminue à des stades avancés de la maladie (c). *D'après (Morel 2014).*

VI.4.2 Hypertension pulmonaire

Au niveau des cardiomyocytes de rats sains, l'expression de la Cx43 est localisée au niveau des disques intercalaires. Cependant, dans le modèle de rat MCT, une étude réalisée par Uzzaman a montré une dispersion du marquage de la Cx43 au niveau de la surface cellulaire des cardiomyocytes du ventricule droit (Uzzaman, Honjo *et al.*, 2000) et la désorganisation du marquage de la Cx43 est d'autant plus prononcée que l'hypertrophie ventriculaire droite est évoluée (Uzzaman, Honjo *et al.*, 2000). Par conséquent la Cx43 est

déphosphorylée, conduisant à son internalisation en jonctions annulaires pour la dégradation (Sasano, Honjo *et al.*, 2007). L'expression de la Cx43 au niveau des cardiomyocytes du ventricule droit est alors diminuée. Par ailleurs, le traitement des rats souffrant d'une HTP induite par la MCT pendant trois semaines avec du bosentan (antagoniste des R-ET_A/ET_B) rétablit la distribution de la Cx43 au niveau des disques intercalaires des cardiomyocytes (Tan and He 2009).

D'autres auteurs ont décrit la désorganisation cardiaque de la Cx43 observée dans l'hypertrophie ventriculaire droite consécutive au développement de l'HTP, sous le terme de jonctions gap latéralisées. En effet, les Cx43 ne sont plus retrouvées au niveau des disques intercalaires mais sont relocalisées au niveau des membranes latérales des cardiomyocytes (Chkourko, Guerrero-Serna *et al.*, 2012 ; Fontes, van Veen *et al.*, 2012 ; Nielsen 2012).

Au niveau des artères intrapulmonaires, une étude réalisée au laboratoire chez des rats souffrant d'HTP induite par la MCT et l'HC a montré l'implication des Cx40 et 43 dans la contraction à la phényléphrine. Plus précisément, chez les rats MCT et HC, l'inhibition des Cx40 et Cx43 par leurs peptides mimétiques sélectifs, induit des diminutions significatives de la contraction induite par la PHE (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). D'autre part, chez les rats souffrant d'HTP hypoxique chronique, l'expression de la Cx43 est augmentée.(Billaud, Dahan *et al.*, 2011).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. Matériel biologique

I.1 Animaux

I.1.1 Groupes contrôles

Pour l'étude de la production d'O₂[•] au niveau des vaisseaux artériels pulmonaires et systémiques, des rats mâles de souche Wistar d'un poids compris entre 250 et 300 g ont été utilisés. En ce qui concerne l'étude du rôle de la Cx43 dans la physiopathologie de la circulation pulmonaire, des souris mâles de souche CD1 d'un poids compris entre 30 et 45 g ont été utilisées. Les animaux sont élevés dans une animalerie avec des conditions constantes de température et d'humidité et des cycles de 12 heures de jour et 12 heures de nuit, ils reçoivent de l'eau et sont nourris *ad libitum*.

I.1.2 Souris déficientes pour la Cx 43 (Cx 43^{+/-})

La mutation pour la Cx43 a été obtenue suite à l'insertion d'un gène néomycine sans promoteur au niveau de l'exon 2 de la Cx43 (Reaume, de Sousa *et al.*, 1995). Comme précédemment décrit, les souris homozygotes pour la mutation Cx43 meurent quelques heures après la naissance en raison des malformations cardiaques associées à une sténose de l'artère pulmonaire (Reaume, de Sousa *et al.*, 1995).

Les souris mâles hétérozygotes pour la Cx43 (Cx43^{+/-}) de souche CD1 ont été obtenues suite à une collaboration avec le Dr. Laurent Cronier de l'institut de Physiologie et Biologie Cellulaires CNRS ERL 7368 (Université de Poitiers). Les souris mâles Cx 43^{+/-} ont été ensuite croisées avec leurs homologues femelles sauvages. Après la mise bas, les souriceaux sont bagués pour identification et un morceau de queue est récupéré pour le génotypage. Les souris mâles sont ensuite utilisées à partir de 8 semaines pour les expériences.

I.1.3 Modèles animaux d'hypertension pulmonaire de groupe 3 : hypoxique chronique (HC)

Les rats et les souris sauvages et déficientes pour la Cx43 sont placés dans un caisson hypobare (Minerve, Esternay) ([Figure 40A](#)) pendant 3 semaines, où ils sont soumis à une pression barométrique de 380 mmHg équivalant à 1/2 atmosphère et à une altitude de 5500 m. La pression inspirée en dioxygène (O₂) est donc diminuée de moitié par rapport au groupe contrôle, et correspond à 80 mmHg. Le caisson est divisé en plusieurs compartiments, chaque compartiment pouvant recevoir une cage de 4 animaux. Le caisson possède un capteur de pression ainsi qu'une entrée d'air unique, avec un débit de renouvellement de 10 l/min. Le capteur de pression permet de vérifier la valeur de la pression (380 mmHg) au sein du compartiment.

Le caisson est ouvert 3 fois par semaine pour le nettoyage des cages et le réapprovisionnement en eau et nourriture. La dépressurisation ainsi que la montée en pression du caisson sont contrôlées grâce à un système de régulation automatique (Duffau, Talence) permettant une montée et une descente progressive et linéaire de la pression dans les compartiments sur une durée de 45 minutes (Figure 40B).



Figure 40: Dispositif utilisé pour la mise en place de l'HTP de groupe 3 : caisson hypobare.

(A) Les animaux sont placés pendant 3 semaines dans les compartiments du caisson. (B) La pression barométrique est contrôlée automatiquement par un système de régulation.

I.2 Préparation du matériel biologique

Les rats sont sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital (150 mg/kg) selon les recommandations de la protection des animaux et les usages du comité d'éthique régional d'Aquitaine – No. 50110016-A. Le bloc cœur-poumon est rapidement prélevé et placé dans une solution saline physiologique de Krebs-Hepes-Bicarbonate (KHB) dont la composition est décrite dans le Tableau 5 ci-dessous.

Les souris sont anesthésiées avec une dose de 100mg/kg de pentobarbital. Une fois la souris endormie, le cœur battant toujours, la cage thoracique est ouverte et on procède à la mesure de la pression artérielle pulmonaire systolique en insérant un cathéter avec un capteur de pression (Vacutainer systems) au niveau du ventricule droit. Le dispositif est relié à un système informatique et la pression est enregistrée à l'aide du logiciel chart & scope (AD instrument, Power Lab). A la fin de la manipulation, soit le bloc cœur-poumon est prélevé puis placé dans du KHB, soit la souris est fixée avec du paraformaldéhyde (PFA) pour les études histologiques.

	Concentrations (mmol/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	118,4
Chlorure de potassium (KCl)	4,7
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	1,2
Sodium hydrogenocarbonate (NaHCO ₃)	4
Potassium dihydrogenophosphate (KH ₂ PO ₄)	1,2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2
HEPES	10
Glucose	6

Tableau 5: Composition de la solution Krebs-HEPES bicarbonate (KHB).

Le pH est ajusté à 7,4 à l'aide de NaOH.

I.2.1 Artères intrapulmonaires (AIP)

Chez le rat, l'arbre artériel pulmonaire (AIP de diamètre externe de 2 mm à moins de 300 µm, correspondant à des AIP du 1^{er} au 3^{ème} ordre) est isolé du poumon gauche ([Figure 41A](#)). Pour la souris, les AIP de 1^{er} et 2^{ème} ordre sont disséquées du poumon gauche et droit pour récupérer un maximum de tissu ([Figure 41B](#)). Dans les deux cas, les artères sont isolées par microdissection sous loupe binoculaire pour en éliminer le parenchyme.

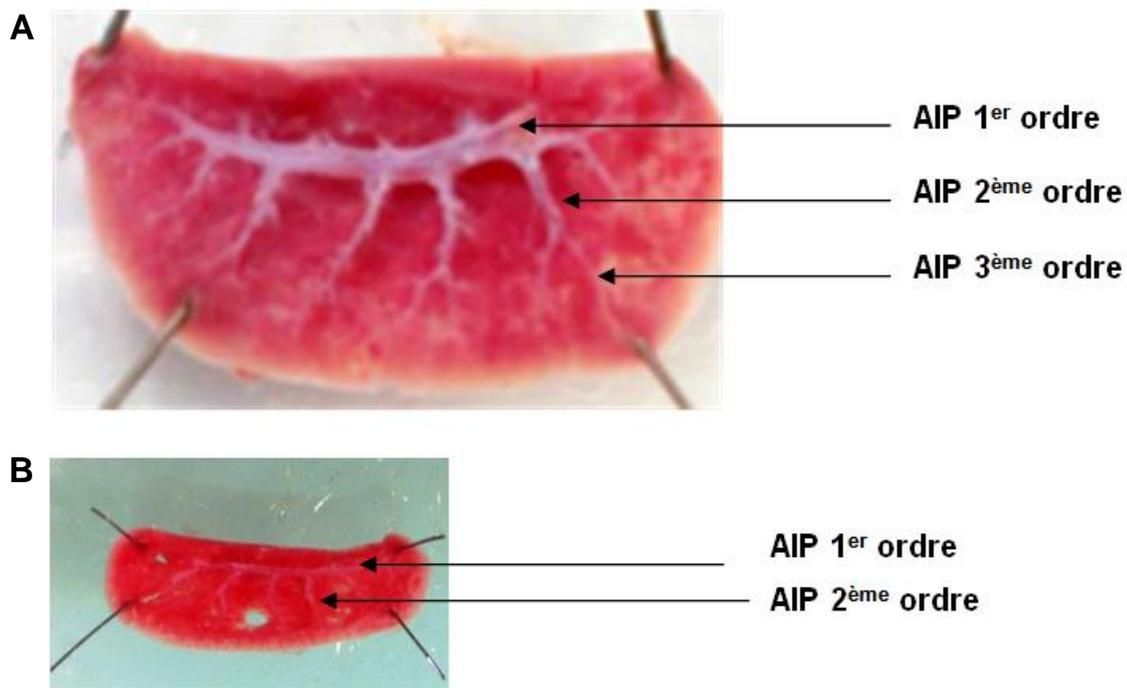


Figure 41: Arbre artériel intrapulmonaire de poumon gauche.

(A) AIP de 1^{er} au 3^{ème} ordre de rat. (B) AIP de 1^{er} au 2^{ème} ordre de souris.

Concernant l'étude de la production d'O₂^{•-} en réponse aux agonistes vasoconstricteurs : Chez le rat, la résonance paramagnétique des électrons (RPE) et le dosage de l'activité de la SOD seront réalisés sur la moitié de l'arbre artériel pulmonaire. Le dosage des nitrites (ONOO⁻) sera réalisé sur l'arbre artériel pulmonaire entier. Les AIP de 1^{er} ordre sont utilisées pour les réponses contractiles en présence de 5-HT, ET-1, PHE et KCl.

Pour l'étude du rôle des Cx43 dans la physiopathologie de la circulation pulmonaire chez la souris, les AIP du poumon droit et gauche seront utilisées pour l'immunofluorescence et le Western Blot.

1.2.2 Cellules musculaires lisses artérielles pulmonaires de rat

La dissociation des CML à partir des AIP a été réalisée comme précédemment décrit par l'équipe (Martin, Dahan *et al.*, 2012). Suite à la dissection, les AIP sont découpées en petits fragments et placées dans une solution d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) dont la composition est détaillée dans le Tableau 6, à laquelle on ajoute 0,3 mg/ml de DiThioThreitol (DDT), 0,4 mg/ml de papaine et 0,3 mg/ml de collagénase de type I pendant 10 minutes, dans un bain-marie à 37°C. Après l'incubation à 37°C, les vaisseaux sont lavés deux fois avec la solution d'HBSS. La dissociation des cellules se fait mécaniquement à l'aide d'une pipette pasteur siliconée et rodée, dans 2 ml de solution d'HBSS pendant 15 minutes. Le liquide est ensuite récupéré et centrifugé à 250 g pendant 5 minutes. Puis, le

culot de cellules dissociées est remis en suspension dans du milieu de culture stérile (milieu Dulbecco modifié par Eagle –DMEM- Gibco) supplémenté avec 1 % pénicilline-streptomycine (Gibco), 1 % d'acides aminés non essentiels (Sigma), 1% de sodium pyruvate (Sigma) et 10 % de sérum de veau foetal inactivé (Gibco).

	Concentrations (mmol/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	145
Chlorure de potassium (KCl)	4
Chlorure de magnésium (MgCl ₂)	1
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	0,1
HEPES	10
Glucose	10
<i>Albumine de sérum de bœuf (BSA)</i>	<i>1 mg/ml</i>

Tableau 6: Composition de la solution d'HBSS.

1.2.3 Culture cellulaire

Le comptage cellulaire est effectué à l'aide d'une cellule de Malassez. Puis, les cellules sontensemencées sur des lamelles en verre (autoclavées et flambées au préalable avec de l'alcool) à raison de 50000 cellules/lamelle dans un volume final de 2ml par boîte de pétri. Les boîtes sont incubées à 37 °C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Lorsque les cellules ont adhéré, le milieu est changé toutes les 48 heures jusqu'à 80 % de confluence des CML. Une fois les cellules confluentes, elles sont rendues quiescentes par une incubation de 48 heures avec un milieu DMEM dont le sérum est remplacé par une solution contenant 10 µg/ml d'insuline, 5,5 mg/ml de transferrine et 5 ng/ml de sélénite de sodium (ITS 1%, Sigma). Cette étape permet de faire évoluer les cellules du phénotype prolifératif au phénotype contractile. La viabilité cellulaire est vérifiée quotidiennement sous microscope. Les cellules sont ensuite utilisées pour la mesure simultanée de la concentration calcique mitochondriale et cytosolique ainsi que du potentiel membranaire mitochondrial à l'aide de différentes sondes fluorescentes. Pour la mesure de la respiration mitochondriale, les CML d'AIP ont étéensemencées dans des flasques de 175 cm². Les cellules sont utilisées en suspension à partir d'une flasque (175 cm²) à 100 % de confluence.

II. Mesure simultanée du calcium mitochondrial et cytosolique

II.1 Protocole expérimental

Les CML d'AIP de rat sont incubées pendant 30 minutes à 37 °C dans du KHB contenant les sondes calciques non ratiométriques Fluo-4-AM (2 µM) et Rhod-2-AM (1 µM) afin de mesurer respectivement la concentration calcique à la fois dans le cytosol et dans la mitochondrie de manière simultanée. Ces sondes non ratiométriques possèdent une seule longueur d'onde d'excitation par rapport aux sondes ratiométriques, telles que l'indo-1 et le Fura-PE3 qui possèdent deux longueurs d'onde d'excitation.

Il s'agit de sondes dérivées de chélateurs calciques couplés à des fluorophores. Elles sont toutes les deux associées à une fonction acétoxyméthylester (AM) nécessaire pour traverser les membranes cellulaires. Cependant, une fois à l'intérieur de la cellule et de la mitochondrie, les acétoxyméthylestérases vont désestérifier les sondes, empêchant ainsi leur sortie du cytoplasme et de la mitochondrie.

II.1.1 Fluo-4

Le fluo-4 est un analogue optimisé du fluo-3 développé par le groupe de Roger Tsien (Grynkiewicz, Poenie *et al.*, 1985). Il est constitué de deux parties : (1) le fluorophore (fluorescein-like) et (2) le chélateur spécifique de l'ion Ca^{2+} (BAPTA-like) (Figure 42). Le fluo-4 possède une longueur d'onde d'excitation de 494 nm pour la sonde liée au Ca^{2+} et une longueur d'onde d'émission de 506 nm (forme liée au Ca^{2+}). De plus, il possède une forte affinité pour le Ca^{2+} qui est de l'ordre de 300 nM. Ainsi une faible variation de la concentration calcique cytosolique est rapidement détectée par le fluo-4.

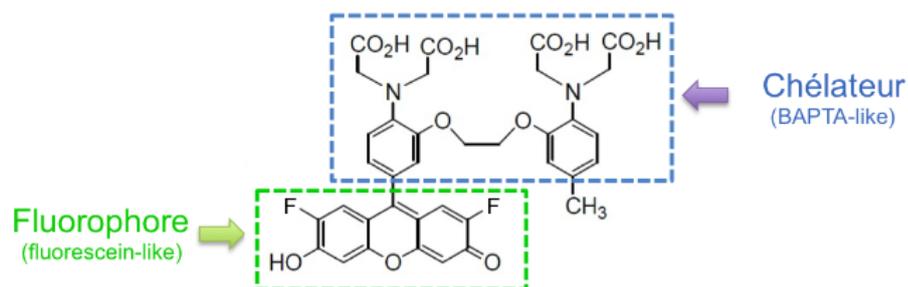


Figure 42: Structure du fluo-4.

D'après <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/F14201#citationsList>.

II.1.2 Rhod-2

La Rhod-2 a été introduite pour la première fois en 1989 par le groupe de Minta pour la mesure de la concentration Ca^{2+} cytosolique (Minta, Kao *et al.*, 1989). Cependant, la forme commercialisée de la sonde Rhod-2 possède une fonction AM cationique (chargée positivement). Cette charge nette positive de la Rhod-2-AM augmente l'accumulation préférentielle de la Rhod-2 dans la matrice mitochondriale en raison du potentiel de membrane mitochondrial très négatif (de l'ordre de -150 mV). Une fois à l'intérieur de la matrice, les estérases vont hydrolyser la fonction AM piégeant ainsi la Rhod-2 dans la mitochondrie sous sa forme imperméable à la membrane (McCarron, Olson *et al.*, 2012). Cette caractéristique a permis la validation de la Rhod-2 comme sonde calcique mitochondriale (Hajnoczky, Robb-Gaspers *et al.*, 1995 ; Babcock, Herrington *et al.*, 1997 ; Hoth, Fanger *et al.*, 1997).

Elle est constituée de deux parties : (1) du fluorophore (rhodamine-like) et (2) du chélateur Ca^{2+} (BAPTA-like) (Figure 43). La Rhod-2 est excitée à 552 nm et émet de la fluorescence à 581 nm sous sa forme liée au Ca^{2+} . Elle possède une affinité pour le Ca^{2+} qui est de l'ordre de 570 nM.

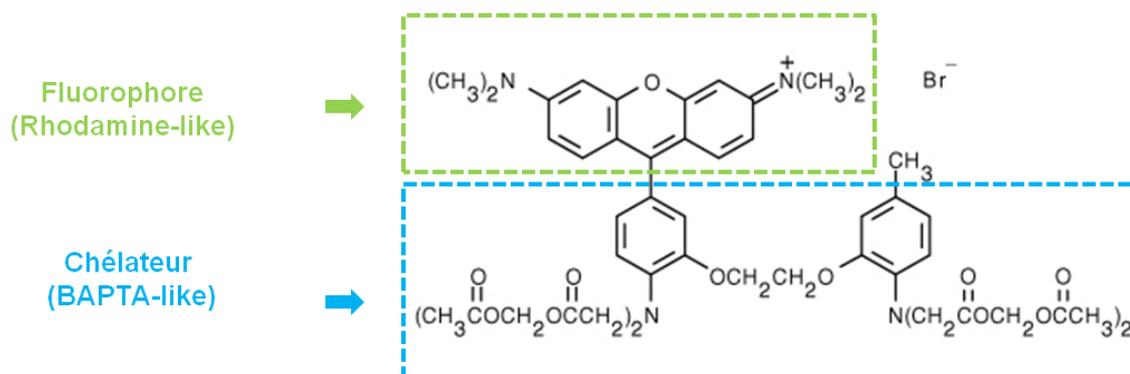


Figure 43: Structure de la Rhod-2.

D'après <http://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/R1245MP>

II.1.3 TMRM

Nous avons également mesuré le potentiel de membrane mitochondrial à l'aide de la sonde cationique lipophile (perméable à la membrane), le tétraméthylrhodamine, méthylester (TMRM) (Scaduto and Grotyohann 1999). Il s'agit d'une sonde rouge-orangé de la famille des rhodamines (Figure 44), qui est séquestrée par les mitochondries actives.

En raison du potentiel de membrane (Ψ) très négatif de la membrane interne mitochondriale, le TMRM s'accumule préférentiellement dans la mitochondrie (1000x) par rapport au cytosol. De plus, le TMRM est la sonde de choix pour la mesure du Ψ de

membrane mitochondriale par rapport aux TMRE (tétraméthyl rhodamine éthyl ester) et la Rhodamine 123 (R123). En effet, le TMRM présente une très faible affinité pour les protéines de la matrice mitochondriale et inhibe de manière moindre la respiration mitochondriale (Scaduto and Grotyohann 1999).

Le TMRM est excité à 550 nm et émet de la fluorescence à 600 nm. La fluorescence émise par le TMRM varie en fonction du Ψ mitochondrial, plus le Ψ mitochondrial est négatif plus la fluorescence émise sera élevée.

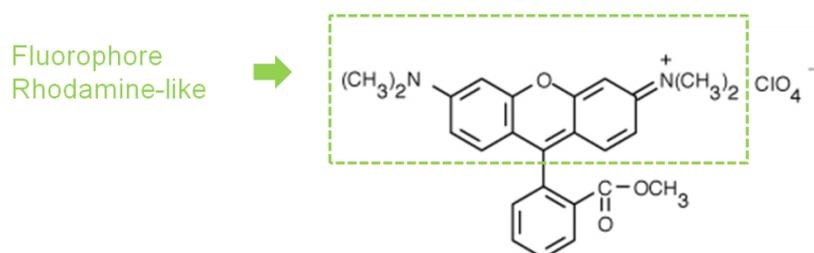


Figure 44: Structure du TMRM.

D'après <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/T668>

II.2 Dispositif expérimental : imagerie calcique par microscopie confocale

Une fois chargées avec les deux sondes calciques, les CML sont soumises à un lavage d'une demi-heure à 37°C dans du KHB dépourvu de sondes. Cette étape est nécessaire et importante pour éliminer les excès de sondes qui se sont fixés de manière non spécifique à la surface cellulaire. Elle permet également la dé-estérification complète des sondes piégées en intracellulaire. Puis les CML sont mises sur le dispositif adapté du microscope confocal (TE2000, Nikon, Champigny sur Marne, France). La fluorescence est observée grâce à un objectif x 20, ouverture numérique à 1,4 et à immersion à huile. Les cellules sont perfusées de manière continue par une pompe péristaltique (débit de 2ml/minutes) avec du KHB maintenu à 37°C à l'aide d'un bain-marie. Les agonistes sont dilués aux concentrations requises dans du KHB et sont appliqués également par perfusion. Le fluo-4 est alors excité avec un laser argon à 488 nm et la fluorescence émise est récupérée à l'aide d'un photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 515 ± 30 nm. La Rhod-2 est excitée à 543 nm à l'aide d'un laser hélium-néon et la fluorescence émise est récupérée par un autre photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 605 ± 75 nm.

II.3 Analyse des résultats

Les intensités de fluorescence émises suite aux excitations à 488 nm et 543 nm sont mesurées chaque 2 secondes au niveau des cellules dont les contours ont été dessinés à l'aide du logiciel EZ-C1 (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France). Les valeurs maximales de

fluorescence obtenues après stimulation (F) ont été normalisées par rapport aux valeurs de fluorescences basales pendant la perfusion avec du KHB seul (F0), afin d'obtenir le ratio F/F0. Les traces calciques des valeurs F/F0 (en ordonnée) en fonction du temps (en abscisse) sont réalisées à l'aide du logiciel Origin 6.0 (Microcal). L'augmentation du taux de Ca²⁺ cytosolique et mitochondrial en réponse aux agonistes est alors calculée en mesurant l'aire sous les courbes entre 45 secondes (le temps correspondant à l'application de l'agoniste) et 120 secondes. L'aire sous la courbe est alors exprimée en F/F0.s⁻¹.

III. Respiration mitochondriale

Ces expériences ont été réalisées en collaboration avec le Dr. Rodrigue Rossignol du laboratoire des Maladies rares : Génétique et Métabolisme (MRGM), centre hospitalier-universitaire, Bordeaux.

III.1 Mise en suspension des CML d'AIP

Lorsque les CML d'AIP sont confluentes à 100 %, le milieu DMEM supplémenté avec 10 % de sérum est éliminé et les cellules sont lavées deux fois à l'aide d'une solution de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, Gibco). Elles sont ensuite soumises à l'action de la trypsine (Gibco) pendant 5 à 10 minutes afin de les décoller du support plastique. Le décollement cellulaire ainsi que l'intégrité membranaire des cellules sont vérifiés au microscope. Lorsqu'un maximum de cellules est décollé, l'action de la trypsine est neutralisée par l'ajout de DMEM contenant 10 % de sérum. Le liquide contenant les cellules est centrifugé, puis le culot est remis en suspension dans du milieu DMEM sans sérum. Les cellules sont comptées à l'aide d'une cellule de Malassez et utilisées à une concentration de 1×10^6 cellules/ml pour chaque série d'expériences.

III.2 Dispositif expérimental : Oxygraphie

La consommation endogène d'oxygène est mesurée sur la suspension de CML d'AIP dans une chambre thermostatique équipée d'une électrode à oxygène de Clark (Oxygraph system, Hansatech) comme cela a été décrit précédemment (Rossignol, Gilkerson *et al.*, 2004). Le tampon de respiration utilisé pour les expériences est le DMEM sans sérum. Avant le début des expériences, une étape du réglage du zéro est nécessaire à l'aide du dithionite de sodium qui sert à tamponner tout l'oxygène du milieu. L'électrode de Clark est composée d'une cathode de platine et d'une anode en argent plongeant dans du KCl qui sert d'électrolyte. L'ensemble électrodes-électrolyte est séparé de la suspension cellulaire par une membrane perméable à l' O_2 mais imperméable à l'eau et aux ions. L' O_2 diffusant à travers la membrane est réduit en eau (H_2O) par les électrons libérés à la cathode et le courant qui s'établit entre les deux électrodes est proportionnel à la concentration en O_2 dans l'électrolyte et donc dans la suspension cellulaire. L'oxygraphe est relié à une interface informatique permettant le suivi de la consommation en oxygène de la suspension cellulaire.

III.3 Analyse des résultats

La pente de la respiration basale est mesurée à l'aide du logiciel OXY (Hansatech) et après chaque ajout de concentrations cumulatives des agonistes. Les résultats sont exprimés en taux de respiration mitochondriale ($nmol O_2/min/10^6$).

IV. Immunofluorescence

IV.1 Fixation

Après dissection, l'arbre artériel pulmonaire de rat ou de souris est fixé pendant 10 minutes dans du formalin 10 % (Sigma Aldrich), puis rincé au PBS. Les AIP sont ensuite soit : (1) incluses dans de l'O.C.T compound (« optimal cutting temperature » compound) et congelées à -20 °C soit (2) conservées dans un eppendorf contenant du PBS 1X pour les immunomarquages de type « en face ». Des coupes de 10 µm d'épaisseur des AIP de 3^{ème} ordre incluses dans de l'O.C.T sont ensuite réalisées à l'aide d'un cryostat (LEICA). Elles sont ensuite fixées par la chaleur sur des lames en verre à l'aide d'une plaque chauffante pendant 2 heures.

IV.2 Protocole expérimental

IV.2.1 Immunofluorescence sur coupes d'AIP

IV.2.1.1 Extinction de l'immunofluorescence des lames élastiques

Les coupes d'AIP sont ensuite entourées d'un trait au crayon hydrophobe (DakoPen, Dako), puis une goutte de solution de glycine diluée dans du PBS 1X (50 mM) est déposée sur les coupes. Les lames contenant les coupes d'AIP sont incubées pendant une demi-heure à température ambiante et cette étape permet de diminuer l'auto fluorescence des lames élastiques.

IV.2.1.2 Perméabilisation membranaire et blocage

Les cryocoupes d'AIP sont perméabilisées pendant une heure à l'aide d'une solution de PBS 1X contenant 0,05 % Triton-X100. Les sites non spécifiques des cryocoupes sont bloqués à l'aide d'une solution de PBS 1X supplémentée avec 3 % de sérum albumine de bovin (BSA, Sigma) et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (solution de blocage) pendant 2 heures à température ambiante. Ce supplément en sérum permet de saturer les sites non spécifiques.

IV.2.1.3 Incubation avec les anticorps

Les cryocoupes d'AIP sont ensuite lavées trois fois pendant 5 minutes à l'aide du PBS1X, 0,05% Triton-X 100 puis incubées dans une chambre humide (StainTray™, Simport) avec l'anticorps primaire (Tableau 7) pendant toute la nuit à 4 °C. Suite à cette étape, trois lavages de 5 minutes au PBS1X, 0,05 % Triton-X100 sont réalisés et les AIP sont incubées avec l'anticorps secondaire approprié pendant 2 heures à 37 °C (Tableau 7). Tous les anticorps sont dilués dans la solution de blocage. A la fin de cette incubation avec l'anticorps secondaire, les cryocoupes sont lavées trois fois pendant 5 minutes avec du PBS1X, 0,05%

Triton-X100 et deux fois 10 minutes avec du PBS1X. Les coupes sont ensuite incubées avec du DAPI dilué dans du PBS1X (2 µg/ml) afin de marquer en bleu les noyaux.

IV.2.1.4 Montage

Les cryocoupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage (Dako Mounting Medium). Pour les contrôles négatifs, les cryocoupes sont incubées avec de la solution de blocage sans les anticorps primaires puis avec les anticorps secondaires. Les lames sont conservées à 4 °C jusqu'à observation au microscope confocal.

IV.2.2 Co-immunomarquage « en face » sur AIP entière

Les AIP entières subissent la même étape d'extinction de l'autofluorescence que les cryocoupes. Néanmoins, le protocole expérimental contient quelques différences par rapport aux cryocoupes. L'étape de perméabilisation est réalisée avec une solution de PBS 1X contenant 0,25% Triton-X100 pendant 1 heure. Puis, les AIP sont incubées avec une solution de Krebs 0 Ca²⁺ contenant 1 mM d'EGTA et 10 µM de sodium nitroprussiate (SNP). Cette étape permet de déplier les lames élastiques. Concernant l'étape de blocage, les AIP sont incubées pendant 6 heures avec la même solution de blocage que les cryocoupes. Les AIP sont lavées trois fois 5 minutes avec du PBS 1X contenant 0,25% Triton-X100. Pour les co-immunomarquages, les AIP sont incubées avec l'anticorps primaire (dans une plaque de 96 puits) pendant toute la nuit à 4 °C, puis lavées 3 fois pendant 5 minutes avec PBS 1X contenant 0,25% Triton-X100. Puis, l'anticorps secondaire dirigé contre le premier anticorps primaire est appliqué pendant 2 heures à 37 °C. Le deuxième anticorps primaire est alors incubé pendant toute la nuit à 4 °C, puis les AIP sont lavées 3 fois pendant 5 minutes avec PBS 1X contenant 0,25% Triton-X100. Enfin, l'anticorps secondaire dirigé contre le deuxième anticorps primaire est appliqué pendant 2 heures à 37°C. Suite à cette étape, les AIP sont lavées trois fois pendant 5 minutes avec du PBS1X, 0,25% Triton-X100 et deux fois 10 minutes avec du PBS1X. Les anticorps utilisés sont indiqués dans le Tableau 7. Les AIP sont ensuite incubées avec du Hoechst dilué dans du PBS1X (10 µg/ml) afin de marquer en bleu les noyaux. Pour le montage, les AIP entières sont ouvertes dans le sens de la longueur sous la loupe binoculaire puis déposées avec la face externe contre la lame en verre. Une goutte de solution de montage (Dako Mounting Medium) est déposée à côté de l'artère pour éviter qu'elle se referme. Puis la contre-lamelle est déposée sur le côté de la goutte de la solution de montage, de manière à n'avoir qu'une surface en contact avec le milieu de montage. La lamelle est ensuite inclinée délicatement pour qu'elle recouvre l'artère tout en étalant le milieu de montage.

Anticorps primaires	Concentration finale ($\mu\text{g/ml}$)	Hôte	Anticorps secondaires	Concentration finale ($\mu\text{g/ml}$)	Hôte
Anti ET _B (Abcam)	20	lapin	AlexaFluor [®] 555 (Abcam) – anti-lapin	10	âne
Anti α_{1D} (Alomone)	16				
Anti 5-HT _{2A} (Abcam)	10				
Anti Cx-43 (Zymed)	5	souris	AlexaFluor [®] 488 (Invitrogen) – anti-souris	10	chèvre
Anti Cav-1 (Abcam)	0.5				

Tableau 7: Anticorps primaires et secondaires utilisés pour les expériences d'immunofluorescences.

IV.3 Visualisation : microscope confocal

Les coupes sont ensuite visualisées à l'aide d'un microscope confocal (TE2000, Nikon) muni d'un objectif X60, ouverture numérique 1,40, Apochromat à immersion à huile. Les noyaux marqués au Hoechst/DAPI sont excités à 405 nm à l'aide d'un laser à diode, les fluorophores AlexaFluor[®] 555 et 568 sont excités à 543 nm à l'aide d'un laser hélium-néon et le fluorophore AlexaFluor[®] 488 nm est excité à 488 nm à l'aide d'un laser argon. La fluorescence émise par les noyaux est ensuite récupérée par un premier photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 405 ± 35 nm, les fluorescences des AlexaFluors 555 et 568 sont, quant à elles, récupérées par un second photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 605 ± 75 nm et la fluorescence émise par l'AlexaFluor 488 est récupérée par un troisième photomultiplicateur filtrant les longueurs d'onde de 515 ± 30 nm.

V. Mesure de la contraction isométrique

V.1 Dispositif expérimental

Les AIP de premier ordre disséquées sont sectionnées en 4 segments tubulaires (anneaux) de taille équivalente. Les anneaux sont ensuite montés dans des cuves de 5 ml, thermostatées à 37 °C, alimentées par une solution physiologique de Krebs-Henseleit (Tableau 8).

	Concentrations (mmol/L)
Chlorure de sodium (NaCl)	118,4
Chlorure de potassium (KCl)	4,7
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)	1,2
Sodium hydrogenocarbonate (NaHCO ₃)	25
Potassium dihydrogenophosphate (KH ₂ PO ₄)	1,2
Chlorure de calcium (CaCl ₂)	2,5
Glucose	11,1

Tableau 8: Composition de la solution de Kreb's-Henseleit dont le pH est ajusté à 7,4 avec du NaOH.

Les anneaux sont ensuite accrochés grâce à deux agrafes passant à l'intérieur de l'anneau (Figure 45) : une première agrafe permet de relier le tissu à la cuve (agrafe inférieure), et une deuxième agrafe relie l'anneau au capteur de force (agrafe supérieure ; IOX, EMKA technologies). Durant toute l'expérience, la solution de Kreb's Henseleit est continuellement bullée avec un mélange gazeux composé de 15 % d'O₂ et 5 % de CO₂

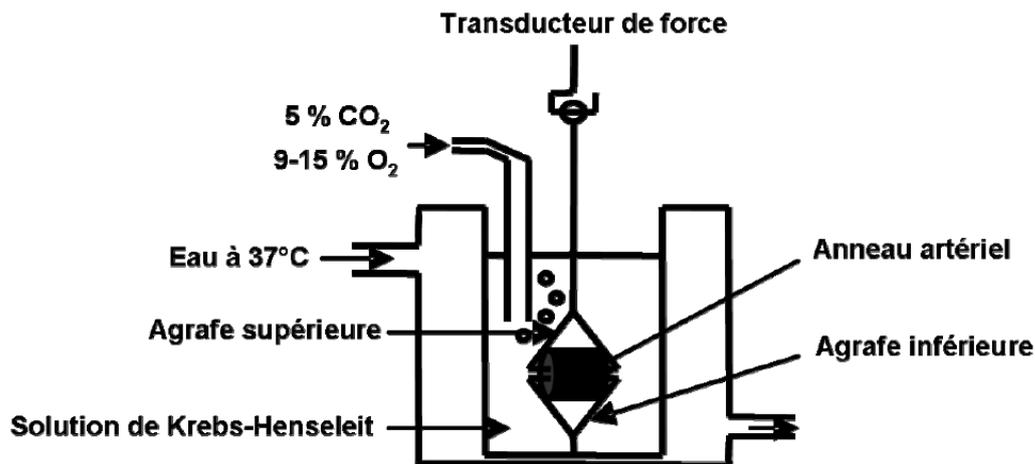


Figure 45: Représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'artère pulmonaire de premier ordre.

V.2 Protocole expérimental

Les anneaux sont équilibrés au début de l'expérience contre une charge de 0,8 g. Des études préalables ont montré que ces valeurs de charge étiraient les anneaux à leur longueur optimale (L_0) : il s'agit de la longueur pour laquelle la force isométrique développée est maximale après stimulation avec une solution hyperpotassique (KCl 80 mM).

Une contraction de référence est effectuée avec la solution hyperpotassique (80 mM) afin de normaliser les réponses contractiles. Les tissus sont soumis à une étape d'équilibration dans la solution de Krebs Henseleit pendant une heure avec des lavages toutes les 15 minutes. Cette étape permet la relaxation des tissus à leur charge initiale. Puis des courbes en réponse à des concentrations cumulées (CCRC) de divers agonistes : 5-HT (10 nM à 100 μ M), ET-1 (0,03 à 100 nM), phényléphrine (PHE, 0,1 nM à 10 μ M) et KCl (4,7 mM à 100 mM) sont réalisées en présence ou non du destructeur des cavéoles : la méthyl- β -cyclodextrine (M β CD, 7 mM).

Dans le cas où la manipulation a été menée en présence du M β CD, les anneaux ont été au préalable mis en présence de ce composé 30 minutes avant la contraction aux agonistes. Les contractions obtenues en réponse aux divers agonistes, en présence ou non de M β CD, sont exprimées en pourcentage de la contraction au KCl 80 mM (contraction de référence). La fonctionnalité de l'endothélium est vérifiée pour chaque anneau en fin d'expérience. Pour cela, les anneaux sont précontractés à la PHE (0,3 μ M) puis la relaxation est induite par 10 μ M de carbamylcholine. Une relaxation supérieure à 30 % de la valeur de précontraction témoigne de la présence d'un endothélium fonctionnel.

VI. Résonance paramagnétique des électrons (RPE)

VI.1 Principe

La résonance paramagnétique des électrons (RPE) est une méthode de spectroscopie sous champ magnétique qui nous renseigne sur la nature des espèces magnétiques d'un échantillon ainsi que sur leurs concentrations. Le principe de la RPE est similaire à celui de la résonance magnétique nucléaire (RMN), avec la différence qu'en RPE, ce sont des électrons qui sont excités et non des noyaux atomiques.

En raison de sa spécificité et de sa sensibilité élevée, cette technique permet la détection directe des espèces magnétiques telles que les radicaux libres, les sels et les complexes de métaux de transition qui sont caractérisés par la présence d'un électron non apparié sur la couche de valence.

Les électrons d'un atome sont : (1) en rotation autour du noyau atomique et (2) en rotation sur eux-mêmes, ce que l'on définit comme le « spin ». Le « spin » permet alors la mise en place d'un champ magnétique, ce qui caractérise les électrons comme des petits aimants. Lorsque les électrons d'une molécule s'apparient, les champs magnétiques qui leur sont associés s'annulent, en revanche si le nombre d'électrons est impair (cas de l' O_2^-), il existe alors un électron non apparié. Les radicaux libres sont alors considérés comme des petits aimants.

Lorsqu'un « spin S » est soumis à l'action d'un champ magnétique extérieur intense B_0 , les niveaux d'énergie du « spin » se séparent en plusieurs états, ce qui correspond à la séparation énergétique ou effet de Zeeman.

VI.2 Effet de Zeeman

Dans le cas d'un ion magnétique ne présentant qu'un seul électron célibataire, pour lequel le spin S est égal à $\frac{1}{2}$, le champ magnétique B_0 donne lieu à deux états énergétiques correspondant à $m_s = -\frac{1}{2}$ et $m_s = +\frac{1}{2}$. Les électrons s'alignent alors sur le champ magnétique B_0 de manière parallèle (\rightarrow) et anti parallèle (\leftarrow) correspondant à $m_s = -\frac{1}{2}$ et $m_s = +\frac{1}{2}$ respectivement ([Figure 46](#)). La rotation des électrons autour de B_0 donne lieu à un mouvement de précession.

Les électrons alignés de manière parallèle auront une énergie $E_+ = +\frac{1}{2} g \mu B_0$ tandis que les électrons alignés de manière antiparallèle auront une énergie $E_- = -\frac{1}{2} g \mu B_0$, avec :

g = facteur g ou constante sans dimension

μ = constante de magnéton de Bohr

B_0 = valeur du champ magnétique (que l'on fera varier au cours des expériences)

La différence $E_+ - E_- = g \mu B_0$ = séparation énergétique de Zeeman

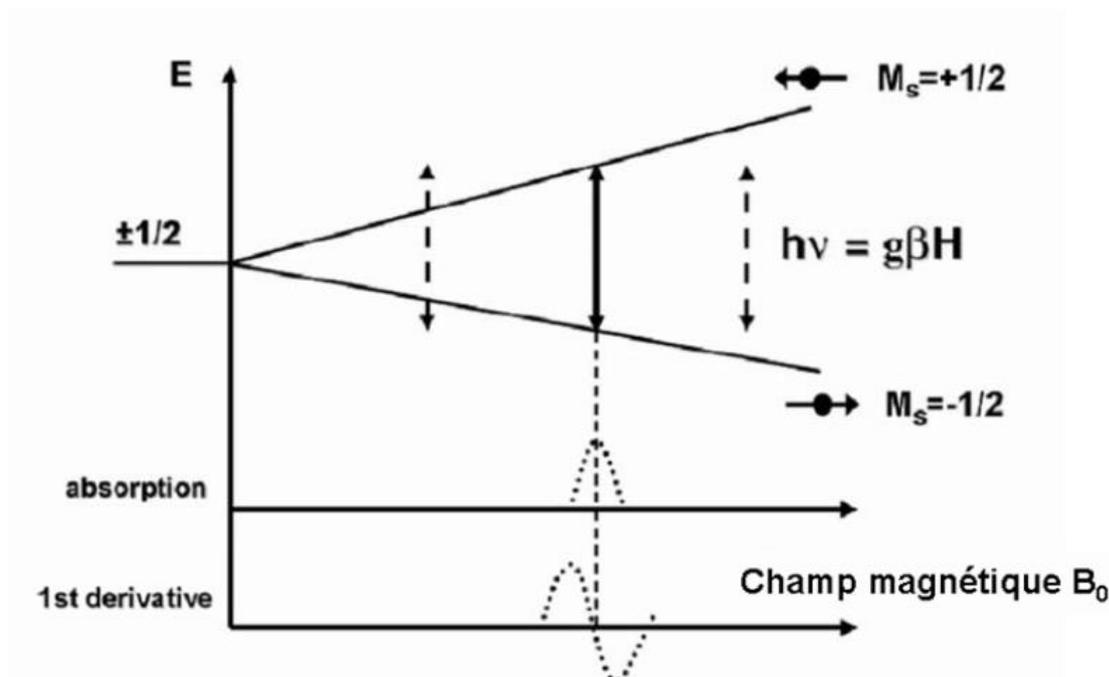


Figure 46: Principe de la RPE : Effet de Zeeman.

Représentation de la séparation des niveaux d'énergie en présence d'un champ magnétique externe B_0 . D'après (Kleschyov, Wenzel *et al.*, 2007)

VI.3 Effet de résonance

La transition entre ces deux états énergétiques peut avoir lieu sous l'action d'un deuxième champ magnétique perpendiculaire à B_0 et possédant une amplitude beaucoup plus faible (micro-ondes), ayant une fréquence ν . Pour que la transition ait lieu, il faut que

l'énergie du deuxième champ magnétique ($= h\nu$ où h est la constante de Planck) soit égale à la séparation énergétique de Zeeman ($g \mu B_0$).

Lorsque $g \mu B_0 = h\nu$, les électrons entrent en résonance et vont absorber des photons du champ magnétique créé par les micro-ondes d'énergie $h\nu$. Cela permet la transition entre les états énergétiques parallèles et antiparallèles. Le spectromètre mesurera le second champ magnétique perpendiculaire après absorption des photons par l'échantillon.

VI.4 Utilisation de piègeur de « spin » : « Spin trapping »

La majorité des espèces radicalaires ont une demi-vie trop courte pour pouvoir être détectées directement et nécessitent une étape de stabilisation préalable à leur détection en RPE, c'est le cas pour l' $O_2^{\cdot-}$. Ainsi, la méthode de « spin trapping » permet de stabiliser le radical libre à l'aide d'un piègeur moléculaire, appelé « spin trap ». La réaction de piégeage produit un nouveau composé paramagnétique, appelé adduit, résultant de la liaison covalente du spin trap avec l' $O_2^{\cdot-}$. L'adduit, de nature radicalaire également, possède une plus grande stabilité et une durée de vie plus longue, permettant ainsi sa détection en RPE.

Le « spin trap » idéal doit répondre aux critères suivants (Kleschyov, Wenzel *et al.*, 2007) :

1. Il doit réagir rapidement avec l'espèce étudiée
2. Il doit être en quantité suffisante près du site de production de l'espèce étudiée
3. Il doit former un adduit stable
4. Le « spin trap » ainsi que l'adduit ne doivent pas interférer avec la production et la dégradation de l'espèce étudiée.

Pour la mesure de l' $O_2^{\cdot-}$, le « spin trap » de la famille des nitrons 5,5-diméthyl-1-pyrroline N-oxyde (DMPO) est l'un des plus couramment utilisés. Toutefois son adduit (DMPO-OOH) est d'une durée de vie limitée au pH physiologique (~ 1 minute à pH 7,4) et se décompose de manière spontanée en l'adduit du radical hydroxyle (DMPO-OH) dont les caractéristiques spectrales sont différentes. De plus, les adduits DMPO-OOH et DMPO-OH sont rapidement transformés en espèces silencieuses, suite à leur réaction avec les nombreux réducteurs présents au sein des tissus, tels que l'ascorbate et le glutathion. Ces limites du « spin trap » ont mené au développement de sondes ou « spin probes » (Munzel, Afanas'ev *et al.*, 2002).

VI.5 « Spinprobes »

Pour nos expériences, nous avons utilisé la sonde 1-hydroxy-3-méthoxycarbonyl - 2,2,5,5-tétraméthylpyrrolidine ou CMH ([Figure 47](#)) qui appartient à la famille des hydroxylamines. Les sondes de cette famille présentent l'avantage de réagir beaucoup plus

vite avec l' $O_2^{\cdot-}$ que les « spins trap » de la famille des nitrons (Dikalov, Li *et al.*, 2007). De plus, cette sonde a la propriété d'être liposoluble, elle mesure alors l' $O_2^{\cdot-}$ à la fois en intra- et en extracellulaire. Le radical nitroxyde (CM \cdot) produit suite à la réaction du CMH avec l' $O_2^{\cdot-}$ possède une plus grande stabilité et l'avantage de produire un signal en spectroscopie RPE (Figure 47).

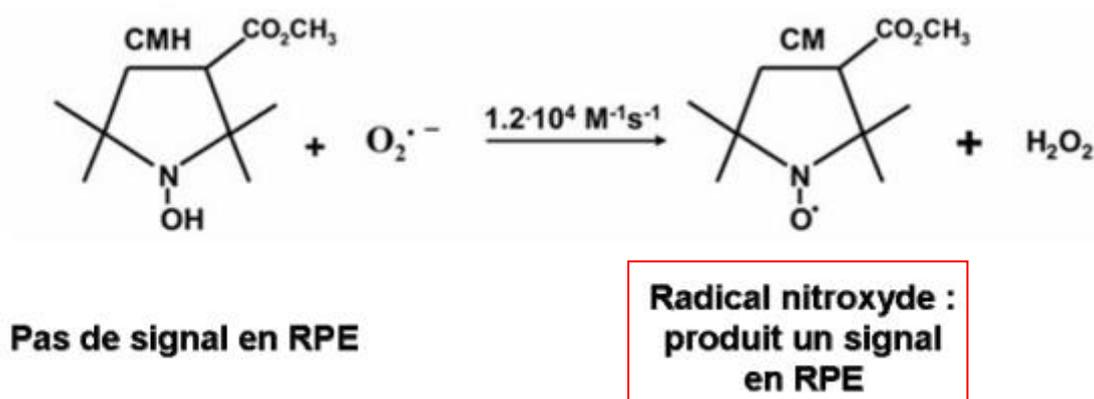


Figure 47: Réaction spontanée entre la sonde CMH et l' $O_2^{\cdot-}$ donnant lieu à la formation du radical nitroxyde CM \cdot .

*D'après (Dikalov, Li *et al.*, 2007).*

VI.6 Dispositif expérimental

Le dispositif utilisé est un spectromètre à bande X Miniscope MS200 (Magnetech, Berlin) (Figure 48). Celui-ci contient un aimant qui permet de créer des champs magnétiques B_0 d'intensités comprises entre 50 et 450 mT. De plus, l'appareil est à bande X, ce qui correspond à la bande de fréquence à laquelle est soumis l'échantillon dans le but de faire entrer les électrons en résonance. Il s'agit du second champ magnétique perpendiculaire à B_0 dont la fréquence est égale à 9 GHz. L'appareil a donc la possibilité de produire des micro-ondes perpendiculaires à B_0 . L'échantillon est refroidi à 77°K avec de l'azote liquide et puis placé dans une flasque « dewar » qui est introduite dans la cavité de lecture (résonateur). Puis l'absorption des photons par l'échantillon donne naissance aux micro-ondes qui sont détectées par un électroaimant (Figure 48).



Figure 48: Dispositif utilisé pour la RPE : Miniscope MS200 (Magnetech).

L'appareil est relié à une interface informatique et l'acquisition des spectres d'absorption se fait grâce au logiciel Miniscope controler 2.0 (Magnetech). Ce logiciel est paramétré de manière à réaliser trois passages sur le même échantillon. Le spectre final qui apparaît à l'écran correspond à la moyenne des trois passages (Figure 49).

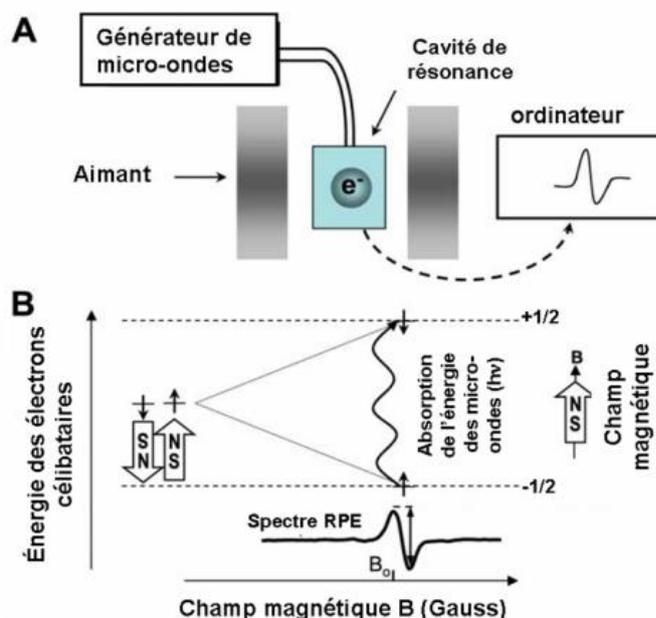


Figure 49: Principe de la spectroscopie par RPE.

(A) L'échantillon est placé dans le résonateur (cavité de lecture). Il est soumis à un champ magnétique B_0 variable et à des micro-ondes perpendiculaires de fréquence fixe (9 GHz). (B) Lorsque B_0 atteint la valeur à laquelle $h \nu = g \mu B_0$, les électrons de l'échantillon entrent en résonance et absorbent des photons générés par le champ micro-ondes (Dikalov, Griendling *et al.*, 2007).

VI.7 Spectres d'absorption

Le spectre d'absorption enregistré est caractéristique de l'élément magnétique étudié. La valeur B_0 (valeur pour laquelle la résonance a lieu) permet d'identifier l'élément et le facteur g , caractéristique de l'élément en question. Ainsi pour l' $O_2^{\cdot-}$, le radical nitroxyde (CM') entre en résonance lorsque B_0 a une intensité aux alentours de 335 mT (Figure 50).

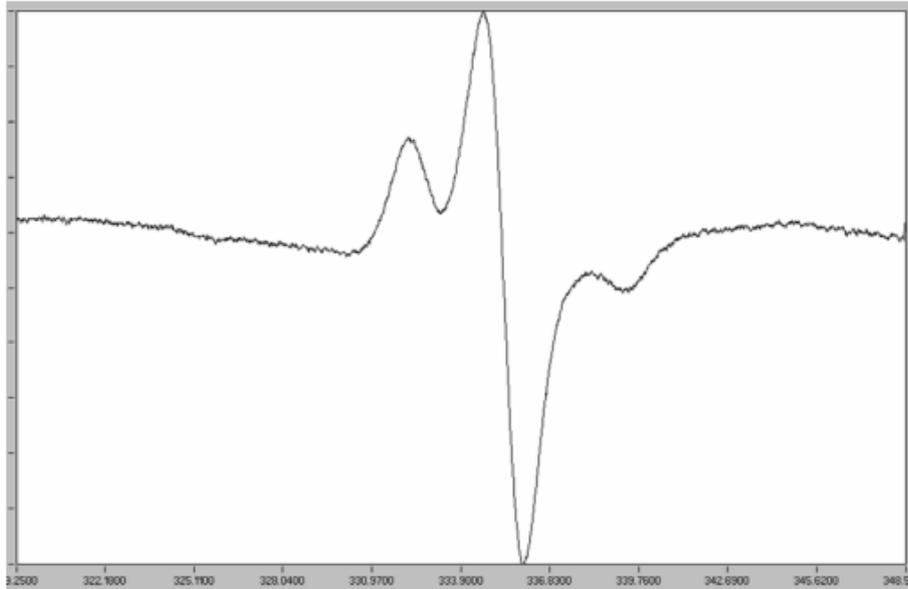


Figure 50: Spectre d'absorption du radical nitroxyde (CM[•]) obtenu sur un échantillon d'artère pulmonaire de rat.

L'axe des abscisses représente le champ magnétique B_0 exprimé en milliTesla (mT).

VI.8 Mesure de l'O₂⁻

VI.8.1 Préparation des échantillons

Chaque moitié d'arbre artériel pulmonaire est placée dans un puits d'une plaque de 24 puits contenant 500 μ l de solution KHB filtrée et bullée avec 100 % d'azote. Les AIP sont ensuite incubées dans la solution KHB filtrée et bullée en présence des inhibiteurs pendant 30 minutes à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Après cette première incubation, le mélange d'incubation est remplacé par 500 μ l de mélange « spin trap » contenant du diéthylthiocarbamate (DETC 5 μ M, Sigma), de la deferoxamine (25 μ M, Sigma) et du CMH (500 μ M, Noxygen) préparé dans du KHB filtré et dégazé. Dans ce mélange « spin probe », le CMH est en excès afin de piéger l'O₂⁻ à proximité de son site de formation avant qu'il ait le temps de se complexer au NO endothélial. A ce mélange « spin probe » est ajouté un agoniste contractant : la 5-HT (100 μ M) ou l'ET-1 (0,1 μ M) ou la PHE (10 μ M)) ainsi que les inhibiteurs dans les puits concernés. La plaque est ensuite incubée pendant 45 minutes à 37°C dans une atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Suite à cette incubation, le milieu d'incubation de chaque puits est placé dans des seringues de 1 ml dont l'extrémité a été préalablement coupée et le tissu (AIP) est placé au bout. Pour stopper la réaction, les seringues sont congelées dans de l'azote liquide (77°K) puis stockées à -80°C en attendant la lecture au spectromètre. Une fois la lecture au spectromètre effectuée, les échantillons sont récupérés dans des eppendorfs et conservés dans l'azote liquide puis

stockés à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en attendant le dosage des protéines, permettant de normaliser les résultats de la RPE.

VI.8.2 Rôles du DETC et de la déféroxamine

Les expériences ont lieu en présence de la déféroxamine et du DETC (deux antioxydants) afin que le CMH soit oxydé uniquement par $\text{l'O}_2^{\cdot-}$. La déféroxamine étant un chélateur du fer, elle inhibe l'auto oxydation du CMH catalysée par les traces de métaux de transition présentes dans l'échantillon. Le DETC, étant un chélateur du cuivre, empêche à la fois l'auto oxydation du CMH et la dégradation de $\text{l'O}_2^{\cdot-}$ par la SOD dépendante du Cu/Zn, présente dans les AIP. De plus, les trois substances (CMH, deferoxamine, DETC) composant le mélange « spin probe » doivent être impérativement préparées dans la glace et les poudres dissoutes dans du KHB bullé à l'azote, gaz inerte qui élimine toute trace d' O_2 dans le KHB. Ces précautions permettent d'éviter l'auto oxydation du CMH.

VI.8.3 Dosage de protéines : protocole expérimental

Les AIP sont décongelées puis broyées mécaniquement dans $200\text{ }\mu\text{l}$ de tampon d'extraction RIPA (1% IGEPAL ; 0,5 % Déoxycholate de Na ; 0,1 % SDS à 20 % ; PBS 1x). Puis, ce broyat subit une centrifugation à $15000g$ à 4°C pendant 10 minutes afin de doser les protéines selon le protocole de Lowry dont le principe sera détaillé dans la partie IX.

VI.9 Analyse des résultats

La quantité d' $\text{O}_2^{\cdot-}$ présente dans l'échantillon est proportionnelle à l'intensité d'absorption des photons. On moyenne l'amplitude des 3 pics correspondant au radical nitroxyde (CM^{\cdot}) à l'aide du logiciel analysis 2.0 (Magnettech) (Figure 51). Puis on calcule la moyenne finale correspondant aux 3 lectures. L'amplitude du signal est alors normalisée par rapport à la quantité de protéines présente dans l'échantillon et les résultats sont exprimés en $[A/(\text{mg/ml de protéines})]$ où A correspond à l'amplitude du signal en unité arbitraire.

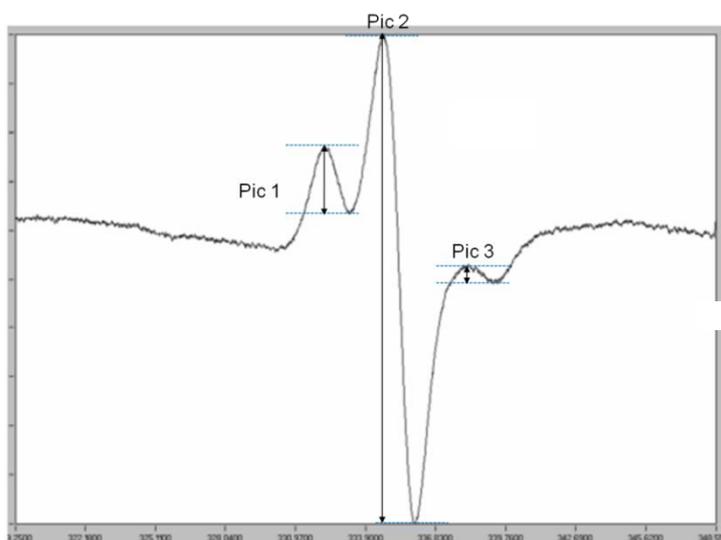


Figure 51: Mesure de l'amplitude des 3 pics correspondant au spectre d'absorption du radical nitroxyde CM^{\cdot} .

VII. Mesure des peroxynitrites (ONOO⁻)

Dans les AIP, le NO peut subir une série de réactions avec diverses molécules présentes telles que l'O₂^{•-}, le dioxygène (O₂) et le dioxyde d'azote (NO₂) selon les trois réactions de la [Figure 52](#). Ainsi, la complexation de l'O₂^{•-} au NO produit des peroxynitrites (ONOO⁻) qui réagissent rapidement avec les ions H⁺ pour produire des nitrates (NO₃⁻).

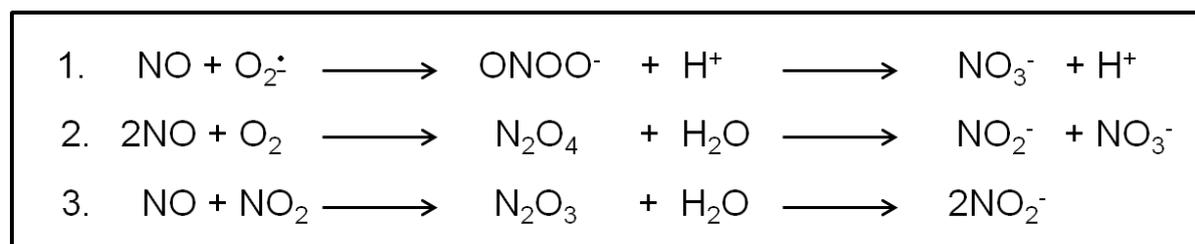


Figure 52: Les différentes réactions de transformations du NO en nitrates (NO₃⁻) et nitrites (NO₂⁻).

En se basant sur la réaction 1, on remarque que la concentration de NO₃⁻ présente dans les AIP est directement proportionnelle à la concentration des ONOO⁻, elle-même dépendante de la concentration d'O₂^{•-} présente dans le milieu. Ainsi, afin de mesurer les concentrations d'ONOO⁻ dans les AIP, nous avons procédé de la façon suivante :

Dans un premier temps, nous avons quantifié les concentrations de NO₂⁻ basales provenant essentiellement des réactions 2 et 3 ([Figure 52](#)) et dans un second temps nous avons utilisé l'enzyme nitrate réductase et le cofacteur de la nitrate réductase (Cayman chemical) afin de transformer les NO₃⁻ provenant des réactions 1 et 2 ([Figure 52](#)) en nitrites (NO₂⁻) ([Figure 53](#)). Cette étape nous permet de quantifier la quantité de NO₂⁻ totaux issus des réactions 1, 2 et 3 et présente dans les AIP.

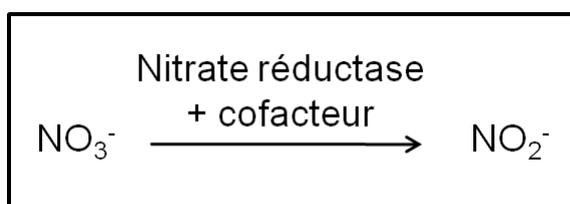


Figure 53: Réaction de transformation des NO₃⁻ en NO₂⁻ par l'enzyme nitrate réductase et le cofacteur.

Enfin, en soustrayant les concentrations de NO₂⁻ totaux (réactions 1, 2 et 3) des concentrations de NO₂⁻ basaux (réactions 2 et 3), nous déterminons de manière indirecte la quantité d'ONOO⁻ et d'O₂^{•-} dans les AIP.

VII.1 Principe du kit de Griess

Le principe du kit (Griess Reagent Kit for nitrite determination, Invitrogen/Molecular Probes) est basé sur une réaction de diazotation en 2 étapes : les NO₂⁻ forment un sel de diazonium avec l'acide sulfanilique qui est ensuite couplé avec la N-(1-naphtyl)éthylène

diamine dichlorohydrate pour donner un colorant mauve azoïque qui absorbe à 550 nm. Des concentrations croissantes de nitrates en présence de l'enzyme nitrate réductase et son cofacteur (Cayman chemical) et de nitrites (0 μM à 25 μM de nitrates et de nitrites) (Invitrogen/Molecular Probes) sont utilisées pour la réalisation des courbes d'étalonnage en présence du réactif de Griess mais sans échantillon.

VII.2 Préparation de l'homogénat de tissu

Pour les dosages des ONOO^- , les AIP sont pré-incubées dans du PBS 1X (filtré et bullé avec 100 % d'azote) pendant 30 minutes, avec ou sans antagonistes, avant une incubation de 45 minutes en présence des agonistes. Suite à cette étape, les AIP sont broyées mécaniquement dans 350 μl de PBS à l'aide d'un piston. Les extraits sont centrifugés à 10500g à 4°C pendant 20 minutes. Les dosages des NO_2^- basaux et NO_2^- totaux sont effectués sur 150 μl pour chaque condition. Les 50 μl restants subissent une centrifugation à 15000g pour le dosage de protéines selon le protocole de Lowry dont le principe sera détaillé dans la partie IX.

VII.3 Expression des résultats

Toutes les réactions ont lieu dans les puits d'une plaque ELISA de 96 puits et la lecture se fait à 550 nm à l'aide d'un spectromètre. Les concentrations des NO_2^- basales et totales dans les échantillons sont ensuite déterminées par comparaison avec les valeurs obtenues pour les courbes standards réalisées en parallèle. Enfin, la concentration de NO_2^- présente dans les échantillons est normalisée par rapport à la quantité de protéines contenue dans les AIP. Les résultats sont exprimés en $\mu\text{M}/(\text{mg}/\text{ml})$ de protéines.

VIII. Mesure de l'activité des superoxyde dismutases (SOD)

L'activité enzymatique des SOD (SOD1, SOD2 et SOD3, voir partie introductive chapitre IV section 5 : dégradation des ERO) dans les AIP est mesurée selon le protocole du constructeur du kit ELISA (SOD Assay Kit-WST, Sigma) et comme réalisé dans de précédentes études (Peskin and Winterbourn 2000).

VIII.1 Principe du kit « SOD Assay Kit-WST »

Le principe du kit est basé sur la réaction d'inhibition de l'activité de la SOD en présence du sel de tétrazolium WST-1 (sel monosodique de 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H tétrazolium) qui a pour but d'oxyder l' $O_2^{\cdot -}$ en O_2 (Figure 54). La réduction du sel WST-1 entraîne alors la formation d'un composé coloré, le WST1-formazan (Figure 54). L'inhibition de l'activité de la SOD est quantifiée en mesurant la hausse de la couleur développée par le composé WST1-formazan à 450 nm. Des concentrations croissantes de SOD (0,001 U/ml à 200 U/ml) sont utilisées pour la réalisation de la courbe d'inhibition de référence en présence de WST-1 mais sans échantillon. Ainsi, en reportant le pourcentage (%) d'inhibition obtenu pour chaque échantillon sur la courbe d'inhibition de référence, nous déterminons l'activité correspondante de la SOD.

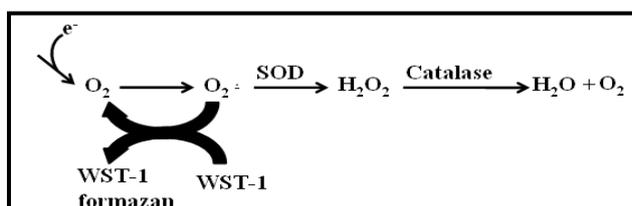


Figure 54: Réaction chimique à la base du principe du kit « SOD Assay-WST ».

VIII.2 Préparation de l'homogénat de tissu

Après traitement pendant 45 minutes avec la 5-HT, les AIP sont broyées mécaniquement dans 300 μ l de tampon HEPES (composition en mM : HEPES 20 ; EGTA 1 ; mannitol 210 ; sucrose 70 ; pH 7,2). Les extraits sont centrifugés à 1500g à 4°C pendant 5 minutes. 20 μ l du surnageant de chaque échantillon est récupéré pour le dosage de l'activité de la SOD selon le protocole du kit. Les réactions ont lieu dans les puits d'une plaque ELISA 96 puits et la lecture se fait à 450 nm. Afin de normaliser l'activité enzymatique de la SOD dans les AIP, le volume restant est centrifugé à 15000g pour le dosage de protéines selon le protocole de Lowry.

VIII.3 Expression des résultats

Le pourcentage (%) d'inhibition de la SOD est calculé selon la formule ci-dessous fournie par le fabricant du kit « SOD assay-WST ».

$$\text{Activité de la SOD (\% d'inhibition)} = \frac{[(A_{\text{blanc1}} - A_{\text{blanc3}}) - (A_{\text{échantillon}} - A_{\text{blanc2}})]}{(A_{\text{blanc1}} - A_{\text{blanc3}})} \times 100$$

Le blanc 1 correspond à l'absorption de l'enzyme, le blanc 2 à l'absorption du tampon dans lequel l'enzyme a été diluée et le blanc 3 correspond à l'absorption de l'eau.

En reportant le pourcentage (%) d'inhibition obtenu pour chaque échantillon sur la courbe d'inhibition de référence de la SOD (Figure 55), on détermine l'activité enzymatique correspondante de la SOD, exprimée en U/ml.

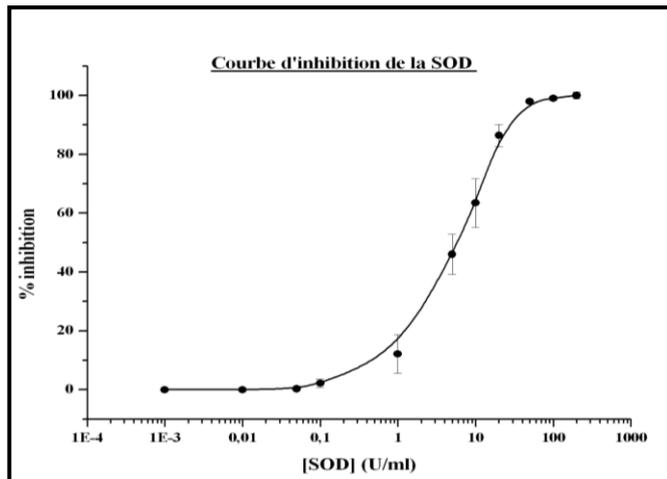


Figure 55: Courbe d'inhibition de la SOD.

IX. Dosage de protéines : Principe de Lowry

IX.1 Méthode de dosage

Les protéines sont dosées dans les surnageants selon le principe de Lowry à l'aide de la solution commerciale « Bio-Rad DC protein Assay » (Biorad). Cette technique est basée sur la réaction de 5 μl de protéines de chaque échantillon avec 25 μl d'une solution alcaline de Cu^{2+} , stabilisée par du tartrate contenant du SDS (réactif A'). La chélation des ions Cu^{2+} par les protéines provoque leur réduction en Cu^+ . Puis ce milieu est mis en présence de 200 μl du réactif acide de Folin (réactif B). La présence des protéines contenant des acides aminés tryptophane, tyrosine, cystéine et histidine et du Cu^+ en milieu acide induit la réduction du réactif B en espèces moléculaires colorées en bleu possédant une absorbance maximale à 750 nm.

L'albumine de sérum de bœuf (Bovine Serum Albumine ou BSA) sert à la réalisation de la gamme étalon (de 0 à 2 mg/ml de BSA). La lecture se fait à 750 nm à l'aide du spectromètre SPECTROstar^{Nano} (BMG LABTECH). La détermination des concentrations en protéines des échantillons se fait par comparaison avec la gamme étalon grâce au logiciel informatique MARS data analysis software.

X. Géotypage

X.1 Extraction d'ADN

Les fragments de queue issus des souris sont incubés à 65 °C pendant toute la nuit dans une solution de lyse (Nuclei Lysis solution) contenant de l'EDTA (0,5 M, pH8) et de la protéinase K. Suite à cette étape, l'ADN des échantillons est extrait en suivant les instructions du kit Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega).

X.2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Le mélange de réaction de PCR comprend un tampon d'activité contenant les dNTPs (désoxy-nucléotide tri-phosphate) (DSBIO), des paires d'amorces spécifiques du fragment d'ADN à amplifier (Tableau 9) et de la Taq Titanium polymérase (Clontech) selon les quantités recommandées par le fournisseur. Les paires d'amorces spécifiques ont été synthétisées par Sigma (Tableau 9). La PCR est réalisée à l'aide du thermocycleur UNOII (Biometra). Elle comprend une étape de dénaturation initiale de l'ADN de 4 minutes à 94 °C, 38 cycles comprenant une phase de dénaturation de 20 secondes à 94 °C, 20 secondes d'hybridation à 63 °C, une phase d'élongation d'1 minute à 72 °C et une phase d'élongation finale pendant 4 minutes à 72 °C.

Gène	Séquence des amorces (F : forward, R : reverse)	Taille de l'amplicon en pb	Concentration d'amorce utilisée (nM)
Cx43	F : 5'-CCCCACTCTCACCTATGTCTCC	520	100
	R : 5'-ACTTTTGCCGCTAGCTATCCC		
NEO	F : 5'-GGCCACAGTCGATGAATCCAG	294	100
	R : 5'-TATCCATCATGGCTGATGCAA		

Tableau 9: Détails des amorces utilisées. Cx43 : connexine 43, NEO : néomycine

A la fin de la PCR, la taille des produits d'amplification est vérifiée sur un gel à 2 % d'agarose et leur taille est comparée à un marqueur de taille de 50 bp (Sigma). Avant la migration sur gel, les échantillons d'ADN amplifiés sont mélangés avec du SybR green, un agent intercalant d'ADN fluorescent et de l'orange G, à base de glycérol qui est un colorant de charge permettant le suivi visuel du front de migration durant l'électrophorèse.

L'électrophorèse a lieu à 50 V pendant 30 minutes à l'aide de la cuve RunOne™ Cell dans du tampon Tris, Borate, EDTA (TBE) 1X.

X.3 Analyse des résultats

Les échantillons qui présentent une seule bande aux alentours de 520 pb correspondent à des souris sauvages ($Cx43^{+/+}$). En revanche, les échantillons qui présentent à la fois la bande à 520 pb et la bande néomycine (NEO) de 294 pb correspondent à des souris hétérozygotes déficientes pour la $Cx43$ ($Cx43^{+/-}$) (Figure 56) (Geneau, Lamiche *et al.*, 2010).

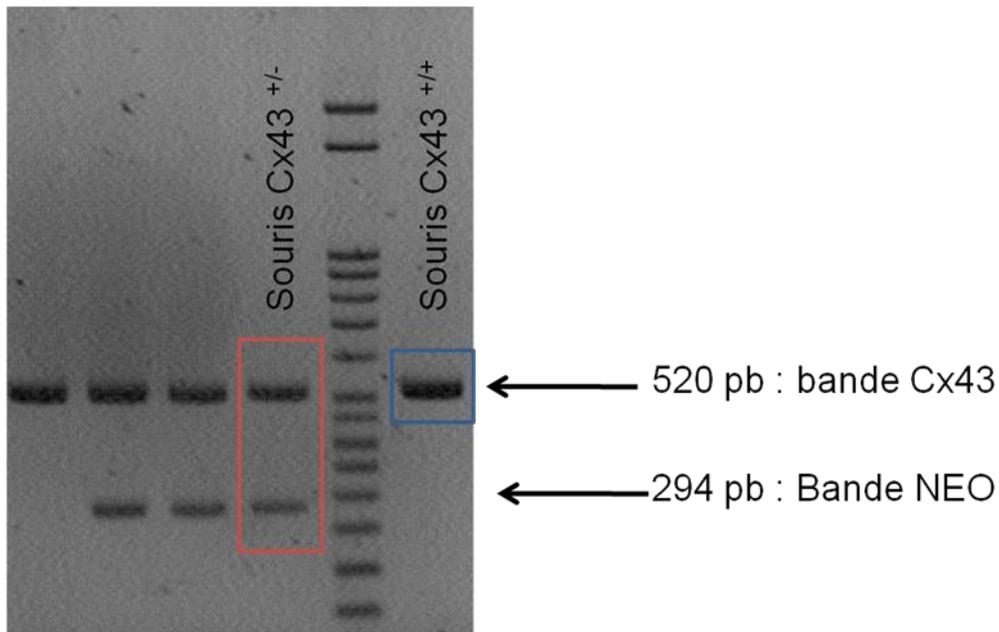


Figure 56: Gel d'agarose (2 %) montrant les bandes d'ADN pour la $Cx43$ et la NEO.

Les échantillons à deux bandes correspondent à des souris $Cx43^{+/-}$ et les échantillons à une bande à des souris $Cx43^{+/+}$.

XI. Myographe : Étude de la contraction isométrique chez la souris

La réactivité des AIP de souris a été effectuée comme précédemment décrit au sein du laboratoire (Leblais, Delannoy *et al.*, 2008).

XI.1 Dispositif expérimental

Les AIP de 1^{er} ordre sont disséquées et montées dans des cuves à organe isolé d'un myographe de type Mulvany (Multi Myograph System, Model 610 M, J.P. Trading, Aarhus, Denmark) contenant une solution de Krebs (pH 7.4) à 37 °C qui est bullée avec un mélange carbogène.

Le montage des AIP dans ces cuves consiste à passer dans la lumière du vaisseau deux fils de tungstène de 40 µm de diamètre. Les extrémités des fils sont fixées au niveau des mâchoires dont l'une est reliée à un capteur de force et l'autre, mobile, à une vis micrométrique permettant d'étirer les vaisseaux sur un plan horizontal ([Figure 57](#)).

La force développée par l'artère (F, en mN) est mesurée par le capteur et traitée par le logiciel d'acquisition Myodaq 2.04 qui donne la tension pariétale de l'artère (T, en mN/mm) en fonction du temps, selon la formule suivante : $T = F / 2l$, avec l : longueur du vaisseau en mm.

XI.2 Protocole expérimental

Avant le début des expériences, chaque artère subit une étape de normalisation. Cette étape détermine l'étirement qui doit être appliqué pour obtenir la tension optimale de repos et permet d'estimer la valeur du diamètre interne des vaisseaux. Chaque vaisseau est alors soumis à un premier étirement rapide et continu jusqu'à obtenir une tension pariétale de 1,2 mN/mm afin de permettre l'allongement des fibres musculaires dans le même sens. Puis, des étirements par paliers successifs sont effectués sur le vaisseau. Pour chaque étirement, la valeur de la tension pariétale est enregistrée et la pression intra-luminale correspondante est calculée par le logiciel d'acquisition selon la formule : $ERTP = T/r$, où ERTP correspond à la pression effective en mN/mm², T correspond à la tension en mN/mm et r au rayon en mm. Ces données permettent de tracer une courbe d'extension représentant la tension pariétale en fonction du diamètre interne pour une ERTP donnée. La tension de repos est optimale pour une pression intra-luminale (ERTP) équivalente à 2 mN/mm² pour les AIP de souris normoxiques et de 3,99 mN/mm² pour celles provenant de souris hypoxiques.

Suite à cette étape de normalisation, des lavages avec la solution de Krebs sont effectués et une étape de contraction au KCl 80 mM est réalisée pour évaluer la fonctionnalité des artères. Puis, le KCl 80 mM est lavé avec du Krebs et les vaisseaux sont soumis à une période de repos d'une heure. Par la suite, les études des réponses contractiles en réponses aux doses cumulatives d'agonistes sont effectuées. Pour le protocole évaluant la relaxation induite par le carbachol, les artères sont précontractées par une concentration submaximale de Phényléphrine 1 μ M (concentration induisant une contraction équivalente à 70 % de celle obtenue en réponse au KCl (80 mM)).

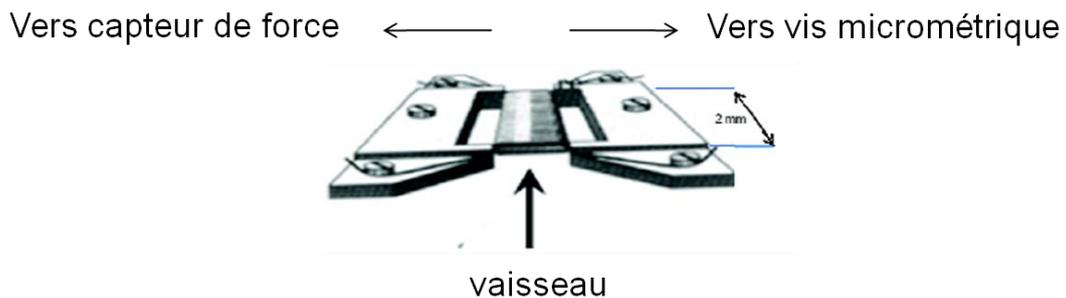


Figure 57: Représentation schématique du montage permettant la mesure de la contraction isométrique des anneaux d'AIP de 1^{er} ordre de souris.

XII. Immunohistologie

XII.1 Fixation

Chez la souris, le protocole de fixation est effectué juste après l'injection de pentobarbital et la mesure de pression intracardiaque pour que le cœur batte encore. Les souris sont alors perfusées de manière transcardiaque avec 10 ml de KHB sans calcium, 2 mM d'éthylène glycol acide tétraacétique (EGTA), nitroprusside de sodium (SNP, 10 μ M) et de l'héparine (10 U/ml). Par la suite, le cœur est perfusé de la même manière avec 10 ml de paraformaldéhyde (PFA) 4 % dilué dans du KHB sans calcium. La fixation est correcte lorsque la souris devient rigide (au bout de 5 minutes). Le poumon est alors isolé et placé dans de l'éthanol 70 % pendant 30 minutes avant l'inclusion en paraffine.

XII.2 Inclusion et coupe au microtome

Différents bains successifs sont alors effectués pour déshydrater les tissus fixés. D'abord, trois bains de 30 minutes dans de l'alcool 95 %, puis trois bains de 30 minutes dans l'alcool 100 %. Ensuite, deux bains de xylène de 30 minutes sont réalisés sous la hotte afin d'éliminer l'alcool des tissus. Pour finir, les poumons subissent trois bains de 30 minutes dans de la paraffine chauffée à 60°C afin d'éliminer le xylène. La paraffine est ensuite coulée en bloc sur les poumons pour les inclure dans une cassette. Ces blocs sont ensuite placés à 4 °C pour les refroidir.

A partir de ces blocs, des coupes au microtome (LEICA) de 3 μ m d'épaisseur sont réalisées. Les coupes sont déposées sur des lames de verre puis fixées à la chaleur pendant une journée dans une étuve à 37°C.

XII.3 Coloration hématoxyline – éosine

Avant de colorer les coupes, il est nécessaire de déparaffiner les tissus. Par conséquent, différents bains sont à nouveau réalisés. Deux bains de 10 minutes au xylène sont effectués, puis deux bains de 5 minutes dans l'alcool 100 %, suivis d'un bain de 5 minutes dans l'alcool 95 % et d'un bain de 5 minutes dans l'alcool 80 %, pour finir avec un bain de 5 minutes dans l'alcool 50 %. Les lames sont alors rincées à l'eau pendant 5 minutes.

Les tissus sont prêts à être colorés. Les coupes sont placées 1 minute dans de l'éosine (coloration rose du cytoplasme) à partir d'une solution d'érythrosine 2 % dans de l'alcool 80 %, puis rincées à l'eau. Elles sont ensuite placées 2 secondes dans une solution d'hémalumayer (coloration bleue des noyaux) et de nouveau rincées à l'eau. Les coupes sont ensuite montées entre lame et lamelle avec une solution de Glycérine Glycérol chauffée à 50 °C.

Par la suite, les coupes de poumon sont observées en lumière blanche au microscope optique et photographiées à l'aide d'une caméra (Nikon).

XII.4 Analyse des résultats

Dix vaisseaux de diamètre inférieur à 100 μm (diamètre moyen de $78 \pm 13 \mu\text{m}$) sont photographiés au microscope optique pour 2 à 5 souris par condition expérimentale. L'épaisseur de la média par rapport au vaisseau entier est déterminée par la formule :

$$\% \text{ épaisseur média} = [(aire \text{ externe} - aire \text{ interne}) / aire \text{ externe}] \times 100$$

XIII. Western blot

XIII.1 Extraction des protéines

Les AIP provenant des souris CD1 sont broyées mécaniquement dans la glace à l'aide d'un piston (Tissue Grind Micro PKG, KIMBLE-CHASE) dans un tampon de lyse RIPA (Sigma) supplémenté d'inhibiteurs de protéases (Sigma) (8 μ l pour un 1ml de RIPA). L'homogénat subit ensuite une étape de centrifugation à 15000g pendant 10 minutes à 4 °C. Les protéines récupérées dans le surnageant sont ensuite dosées par la méthode de Lowry en comparaison avec une gamme étalon de BSA. Les protéines sont ensuite diluées dans du tampon Laemli 5X contenant : 312 mM tris-HCl pH 8,8 ; 5 % SDS ; 125 mM DTT ; 0,5 mM EDTA ; 12,5 % glycérol ; 0,005 % bleu de bromophénol dilué dans de l'eau bi distillée. Les protéines sont ensuite dénaturées à 90 °C pendant 6 minutes.

XIII.2 Électrophorèse

Ensuite 20 μ g de protéines sont déposées sur un gel à 10 % d'acrylamide, la migration des protéines est alors réalisée par une électrophorèse conduite à 140 V pendant 1 heure 30 minutes. Une fois la migration achevée, les protéines sont transférées sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF) dans du tampon de transfert contenant du Tris-glycine et 20 % d'éthanol pendant 1 heure à 150 V, à 4 °C. La membrane est ensuite saturée pendant 1 heure à température ambiante dans du PBS 1X, tween 0,1 %, contenant 4 % de lait. Puis la membrane est mise en présence de l'anticorps primaire dirigé contre la Cx43 (Tableau 10) pendant toute la nuit à 4 °C sous agitation. Après 3 lavages à l'aide du PBS 1X, tween 0,1 %, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à l'enzyme horse radish peroxydase (HRP) pendant 2 heures sous agitation à température ambiante. Enfin, la membrane est révélée à l'aide du kit de chimioluminescence (Millipore). L'acquisition de la chimioluminescence se fait grâce à une caméra Fujifilm LAS-3000.

En parallèle, la quantité de protéine déposée est contrôlée par la mesure de la quantité de β -actine présente sur la membrane, car il s'agit d'une protéine dont la quantité ne varie pas lors de l'hypertension pulmonaire. Cependant, le poids moléculaire de la β -actine (42 kDa) étant proche de celui de la Cx43, on procède à une étape de « stripping » après la révélation des Cx afin de décrocher le marquage des Cx. La membrane est rincée deux fois pendant 10 minutes dans du PBS1X puis incubée dans du stripping buffer (« Restore™ Western Blot Stripping Buffer » ThermoScientific) sous agitation à température ambiante pendant 15 minutes. Suite à cette étape, la membrane est incubée dans l'anticorps primaire dirigé contre la β -actine pendant 1 heure et rincée deux fois pendant 10 minutes dans du PBS1X. On procède alors à une nouvelle révélation immunologique selon le même protocole que celui de la Cx43.

Anticorps primaire	Dilution	Hôte	Anticorps secondaire	Hôte	Dilution
Anti Cx 43 (Invitrogen)	1/500	Souris	Anti IgG de souris couplé HRP (BioRad)	Chèvre	1/10000
β -actine (Sigma)	1/10000				

Tableau 10: Récapitulatif des anticorps utilisés pour le Western Blot.

XIII.3 Analyse des résultats

La densité des bandes est mesurée à l'aide du logiciel Image J. Les résultats sont ensuite exprimés en rapportant la densité des bandes des Cx à la densité des bandes de la β -actine.

XIV. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard à la moyenne. n indique le nombre de rats pour la RPE, la mesure des peroxy-nitrites et l'activité de la SOD, l'activité de la respiration mitochondriale et l'immunofluorescence. Pour l'étude des réponses calciques et contractiles isométriques, n représente le nombre de cellules et le nombre d'anneaux d'AIP respectivement. Les expériences ont été réalisées sur au moins 3 à 4 rats. Concernant l'étude chez la souris, n représente le nombre de vaisseaux pour l'immunohistologie, la réactivité et le nombre de souris pour les mesures de pression et le Western Blot.

Le test t de Student pour échantillons non appariés a été utilisé pour comparer les données obtenues pour les différentes conditions testées concernant l'étude du calcium cytosolique et mitochondrial.

Les comparaisons statistiques entre les CCRC aux agonistes sont réalisées avec une analyse globale de la variance (« two-way » ANOVA) grâce au logiciel SPSS 9.0.

Le test Kruskal-Wallis non paramétrique pour échantillons indépendants (comparaison de plus de deux groupes) suivi du test de comparaison multiple de Dunn a été utilisé pour comparer : (1) les mesures de respiration mitochondriale et les % d'inhibition de la respiration en réponse aux agonistes et (2) les E_{max} et EC_{50} des CCRC effectuées sur les AIP issues de souris contrôles et hypoxiques chroniques.

Pour les réponses contractiles sur les AIP de souris, les CCRC aux agonistes ont été lissées grâce au logiciel Origin 6.0, selon l'équation logistique :

$$E = \frac{E_0 - E_{max}}{1 + (x / EC_{50})^p} + E_{max}$$

Où E , E_{max} et E_0 représentent respectivement l'amplitude de l'effet, l'effet maximal et minimal pour une concentration d'agoniste donnée, notée x . EC_{50} est la concentration d'agoniste qui produit la moitié de l'effet maximal et p est la pente de la sigmoïde.

Les analyses statistiques de toutes les autres données (comparaison de deux groupes) ont été réalisées en utilisant un test Mann et Whitney non paramétrique pour échantillons indépendants.

Tous les histogrammes ont été réalisés à l'aide du logiciel GrapPad Prism 5.0. Les différences sont considérées comme significatives lorsque $P < 0.05$, quel que soit le test statistique utilisé.

OBJECTIFS DE LA THÈSE

Il a été précédemment montré au laboratoire que la sérotonine (5-HT) induit une augmentation de la quantité d'O₂^{•-} et du monoxyde d'azote (NO) au niveau (respectivement) du muscle lisse et de l'endothélium des artères intrapulmonaires (AIP) de rats (Billaud, Marthan *et al.*, 2009). De plus, la dégradation de l'O₂^{•-} à l'aide de la superoxyde dismutase (SOD) induit une augmentation de la production de GMP_c au niveau du muscle lisse et par conséquent diminue la contraction à la 5-HT. D'autre part, de manière intéressante, l'inhibition de la formation des jonctions gap composées de Cx43 diminue la contraction à la 5-HT (Billaud, Marthan *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que l'O₂^{•-} passerait via les jonctions gap myoendothéliales de type Cx43 pour interagir avec le NO et ainsi diminuer la production du GMP_c dépendante du NO. Ce phénomène induit une augmentation de la vasoconstriction des AIP à la 5-HT via une régulation négative de la relaxation dépendante de l'endothélium (Billaud, Marthan *et al.*, 2009).

Cependant, à l'heure actuelle, le lien entre la 5-HT ainsi qu'entre les autres agonistes vasocontractants (l'endothéline-1 et la phényléphrine) et l'augmentation de la quantité d'O₂^{•-} n'est pas établie dans la circulation pulmonaire de rat. L'objectif de ce travail a donc été de disséquer les voies de signalisation impliquées dans l'augmentation de la quantité d'O₂^{•-} en réponse aux agonistes vasocontractants dans les AIP de rats sains.

Par ailleurs, aucune étude ne s'est focalisée sur le rôle des jonctions communicantes, et notamment la connexine 43 (Cx43) dans la circulation pulmonaire saine et pathologique de souris. De plus, les résultats antérieurs du laboratoire ont montré l'implication de la Cx43 dans la réponse contractile induite par la 5-HT dans la circulation pulmonaire saine de rat. D'autre part, les rats souffrant d'une HTP hypoxique chronique présentent une augmentation du taux d'expression de l'ARN_m et protéique de la Cx43 (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Ainsi, à l'aide d'un modèle de souris déficiente hétérozygote pour la Cx43 (souris Cx43^{+/-}), nous avons caractérisé le rôle de la Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et HTP hypoxique chronique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les principaux résultats de ce travail de thèse sont composés : d'une **première étude** réalisée chez le rat en conditions physiologiques sur la production d'O₂^{•-} en réponse aux agonistes vasoconstricteurs et d'une **deuxième étude** réalisée chez la souris sur le rôle de la Cx43 dans la paroi artérielle pulmonaire et ses implications en physiopathologie : l'hypertension pulmonaire hypoxique chronique (groupe 3).

L'étude réalisée chez le rat sur la production d'O₂^{•-} en réponse à la 5-HT est présentée sous forme d'un article en révision au journal *Cardiovascular Research* et intitulé « **Signalling pathways linked to serotonin-induced superoxide anion production: a new physiological role for mitochondria** ».

I. Voies de signalisation impliquées dans la production d'O₂^{•-} en réponse à la sérotonine

I.1 Objectifs

Une étude antérieure réalisée au laboratoire a montré que la 5-HT augmente la quantité d'O₂^{•-} dans le muscle lisse et diminue le taux de GMP_c dans les AIP de rat (Billaud, Marthan *et al.*, 2009). Cependant, le lien entre la 5-HT et l'augmentation de la quantité d'O₂^{•-} n'est pas connu. Ainsi, l'objectif principal de ce travail était de disséquer les voies de signalisation impliquées dans la production d'O₂^{•-} en réponse à la 5-HT et d'autres agonistes vasocontractants tels que la phényléphrine et l'endothéline-1 dans la circulation pulmonaire de rat en conditions physiologiques.

Nous avons d'une part recherché si les récepteurs et/ou le transporteur à la 5-HT étaient impliqués dans ce phénomène, puis l'origine de l'augmentation d'O₂^{•-} (augmentation de production et/ou diminution de dégradation) et les sources de production d'O₂^{•-}. Nous avons d'autre part caractérisé le rôle du calcium dans ce mécanisme. Enfin, nous avons souligné la présence des différents acteurs de cette voie de signalisation au sein des microdomaines de signalisation tels que les jonctions myoendothéliales et/ou cavéoles.

I.2 Résultats

Les résultats sont détaillés dans l'article joint.

Signalling pathways linked to serotonin-induced superoxide anion production: a new physiological role for mitochondria.

Nafiisha Khoyarattee^{1,2}, Marie Billaud³, Rodrigue Rossignol⁴, Jennifer Gillibert-Duplantier^{1,2}, Brant E. Isakson³, Roger Marthan^{1,2}, Jean-Pierre Savineau^{1,2}, Christelle Guibert^{1,2}

Short title: mitochondrial O₂⁻ production in response to 5-HT

1 INSERM, U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

2Univ-Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, F-33076 Bordeaux, France

3 Robert M. Berne Cardiovascular Research Center, Charlottesville, VA 22908, USA

4 Univ-Bordeaux, Maladies rares : génétique et métabolisme, F-33076 Bordeaux, France

Key words: Superoxide anion, 5-HT, mitochondria, pulmonary artery, caveolae

Author for correspondence Dr C. Guibert

INSERM U 1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux

146, rue Léo Saignat, F33076 Bordeaux;

Université Bordeaux, F33076 Bordeaux, France.

tel (33) 5 57 57 56 58 - fax (33) 5 57 57 16 95 - e-mail: christelle.guibert@u-bordeaux.fr

Signalling pathways linked to serotonin-induced superoxide anion production: a new physiological role for mitochondria.**Nafiisha Khoyarattee, Marie Billaud, Rodrigue Rossignol, Jennifer Gillibert-Duplantier, Brant E. Isakson, Roger Marthan, Jean-Pierre Savineau, Christelle Guibert****Abstract*****Aims***

Serotonin (5-HT) is a potent vasoconstrictor agonist under physiological conditions and contributes to several vascular diseases. Although superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) is usually associated to cellular damages due to $O_2^{\cdot-}$ overproduction, we previously demonstrated that 5-HT, in physiological conditions, produces $O_2^{\cdot-}$ which is associated to contraction. $O_2^{\cdot-}$ signalling and 5-HT_{2A} receptors are known to be localized in caveoli. Here, we addressed the signaling pathways linking $O_2^{\cdot-}$ production to 5-HT-induced contraction in physiological conditions.

Methods and Results

Using electron paramagnetic resonance on rat intrapulmonary arteries (IPA), we showed that 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production was inhibited by ketanserin (an inhibitor of the 5-HT_{2A} receptor), absence of extracellular calcium, two blockers of potential-independent calcium permeable channels (RHC80267 and LOE-908), a blocker of the mitochondrial complex I (rotenone), a NADPH oxidase (Nox) inhibitor (apocynin) and a blocking peptide of PKC ϵ . 5-HT also induced $O_2^{\cdot-}$ production in rat aorta. In isolated smooth muscle cells, 5-HT increased mitochondrial calcium concentration, depolarized mitochondria and decreased mitochondrial respiratory rate. Fluorescent immunolabeling on transversal sections and whole IPA highlighted the localization of 5-HT_{2A} receptors and caveolin-1 (specific protein of caveoli) in smooth muscle, endothelium and fenestrae of the internal elastic lamina. Moreover, Caveoli disruption with methyl- β -cyclodextrin, significantly decreased the contraction to 5-HT.

Conclusions

Our findings indicate that 5-HT acts on 5-HT_{2A} receptors to activate a calcium influx responsible for mitochondrial calcium increase leading to $O_2^{\cdot-}$ production via the mitochondrial complex I and Nox. Caveoli are also involved in the contraction to 5-HT.

Introduction

Agonists acting on seven transmembrane domain receptors (G-protein coupled receptors) are involved in vascular tone. Serotonin (5-HT) is a potent vasoconstrictor agonist under physiological conditions and contributes to several vascular diseases (namely systemic and pulmonary hypertension and atherosclerosis). 5-HT is mainly produced by enterochromaffin cells of the intestine and then stored in platelets. 5-HT is also locally released by pulmonary neuroendocrine cells, endothelial cells and neuroepithelial bodies distributed throughout the airways.^{1, 2} In the cardiovascular system, 5-HT has a potent mitogenic and contractile effect and its concentration is increased in pulmonary hypertension^{1, 3-5} The mitogenic effect of 5-HT in the pulmonary artery (PA) is dependent on 5-HT internalization through the 5-HT transporter² and the activation of 5-HT receptors whereas the contractile effect of 5-HT is mainly dependent on 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B/D} receptors⁵.

We previously demonstrated, in rat intrapulmonary arteries (IPA), that 5-HT increases superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$) level in the smooth muscle while it produces NO in the endothelial cells⁶. Our results showed that the degradation of the $O_2^{\cdot-}$ leads to increased cGMP production and decreased the contraction to 5-HT⁶. This process was dependent on the presence of the endothelium. Interestingly, inhibition of gap junctions containing connexin 43 (Cx 43) decreased the 5-HT-induced contraction, which led us to hypothesize that $O_2^{\cdot-}$ may pass through myoendothelial gap junctions (containing Cx 43) to scavenge endothelial NO, decrease cGMP production and thus negatively control endothelial relaxation and strengthen pulmonary vasoconstriction⁶. Nevertheless, the signaling pathways involved in this process remain unknown. In addition to the pulmonary circulation, this process is also present in the systemic circulation as the inhibition of Cx 43 decreased the contraction to 5-HT in rat aorta.⁶

5-HT is known to stimulate reactive oxygen species (ROS) production also in human, bovine and mice pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and the production of $O_2^{\cdot-}$ facilitates 5-HT-induced pulmonary vasoconstriction as well as smooth muscle cells proliferation.⁷⁻¹³ While the role of ROS in 5-HT-induced PASMC proliferation has been extensively studied, only one study on mice PA addressed the role of ROS in 5-HT-induced contraction.¹¹ Indeed, Liu and Folz showed that 5-HT enhances $O_2^{\cdot-}$ levels from the smooth muscle via NADPH oxidase (Nox) stimulation.¹¹ This increased $O_2^{\cdot-}$ was localized in the extracellular space and further increased the contraction to 5-HT. The precise mechanism involved in the enhanced contraction to 5-HT by $O_2^{\cdot-}$ in mice PA has not been addressed nor the role of 5-HT_{2A} receptors, 5-HT transporter or that of mitochondria, another important source of $O_2^{\cdot-}$ in PA.^{13, 14}

In human as in rats, the PA contraction to 5-HT is dependent on myofilament Ca^{2+} -sensitisation and cytosolic calcium concentration.^{3, 5, 15} Intracellular calcium is modulated by the activity of calcium permeable channels localized in the plasma membrane and in the sarcoplasmic reticulum. Since the mitochondrial electron transport chain (METC) and some Nox are known to be sensitive to calcium to produce $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^{16, 17}, we first addressed the role of calcium in the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ by 5-HT.

Moreover, since the main role of the pulmonary circulation is to control the supply of blood/oxygen to the organs, hypoxic pulmonary vasoconstriction occurs in case of reduced alveolar oxygen, in order to ensure optimal gas exchange.¹⁸ Hypoxic pulmonary vasoconstriction is strongly dependent on mitochondrial derived ROS production which reduces voltage-dependent potassium channels current and thus increases intracellular calcium in smooth muscle.^{16, 19} So far, no study has demonstrated any role of mitochondrial ROS (namely $\text{O}_2^{\cdot-}$) in the PA responses to vasoconstrictors therefore we focused our attention on the role of mitochondria in the production of $\text{O}_2^{\cdot-}$ by 5-HT in IPA.

It is now recognised that, due to ROS short half-life and diffusion, ROS signaling is localized at precise specialized microdomains such as caveoli/lipid rafts.²⁰ Interestingly, in rat PASMC, the voltage-gated potassium channel (Kv1.5) co-immunoprecipitates with caveolin-1 (cav-1, a specific protein of caveolae) and the 5-HT_{2A} receptor suggesting that the 5-HT signaling pathway is localized in caveoli.¹⁴

In the present study, we thus have investigated the signaling pathways involved in 5-HT-induced $\text{O}_2^{\cdot-}$ increase in rat IPA by focusing on the sources of ROS (including Nox and METC), the role of intra and extracellular calcium and the role of the vascular micro-organisation implicating myoendothelial junctions (MEJ), gap junction containing Cx 43 and caveoli.

Materials and Methods

A supplementary material is available online.

Tissue preparation. Male Wistar rats (weighing 300–400 g) were sacrificed using an intraperitoneal injection of pentobarbital (150 mg/kg) according to the animal care and use local committee (Comité d'éthique régional d'Aquitaine – No. 50110016-A). The left lung was rapidly removed and rinsed in Krebs–HEPES–bicarbonate (KHB) containing (in mmol/L): 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO₄, 4 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 2 CaCl₂, 10 N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) and 6 D-glucose, pH 7.4 with NaOH. Intrapulmonary arteries (IPA) of first, second and third order with an external diameter of 2 mm to less than 300 µm were then dissected free from surrounding connective tissues under binocular control.

Electronic Paramagnetic Resonance (EPR) recordings. EPR recordings were performed as previously described.⁶ IPA were incubated in the spin trap solution containing 500 µmol/L 1-hydroxy-3-methoxycarbonyl-2,2,5,5-tetramethylpyrrolidin (CMH, Noxygen), 25 µmol/L deferoxamine (Sigma) and 5 mmol/L N,N-diethyldithiocarbamate (DETC, Sigma) in KHB at 37 °C for 45 min. 5-HT and/or pharmacological inhibitors were added during the spin trap incubation. Pharmacological inhibitors were also incubated during 30 min prior to spin trap incubation. Reaction was stopped by freezing the sample in liquid nitrogen. Samples were then analyzed by EPR spectrometry on a tabletop x-band spectrometer miniscope (MS200, Magnettech). Spectra of the oxidized product of CMH (CM[•]) were recorded at 77 °K using a flask Dewar. Acquisition parameters were as followed: Bo Field: 3341±150 G, microwave power: 10 dB, amplitude modulation: 5 G, sweep time: 60 sec, gain: 300 and 3 scans. Signals were quantified by measuring the total amplitude, after correction of baseline and normalized to the protein quantity of the sample in mg/ml. O₂^{•-} level is expressed in [A/(mg/ml) of proteins], where A corresponds to arbitrary units.

Peroxynitrites quantifications. IPA were incubated with or without 5-HT 100 µmol/L in phosphate buffer saline solution during 45 minutes. Arteries were then homogenized in this incubation medium and centrifuged (10 500g, 20 minutes at 4°C). Supernatants were used for the measurement of peroxynitrites. As peroxynitrites are rapidly transformed to its more stable structural isomer, nitrates, supernatants were first incubated with nitrate reductase (Cayman chemicals) to convert nitrates into nitrites and levels of peroxynitrites were then quantified from nitrites with Griess reagent as described in the procedure of an

ELISA kit obtained from Molecular Probes (Invitrogen). Peroxynitrites levels were normalized to tissue protein content in mg/ml. Results are expressed in [$\mu\text{mol/L}/(\text{mg/ml})$ of proteins].

Superoxide dismutase (SOD) activity measurement. IPA treated or not with 5-HT were homogenized in HEPES buffer containing (in mmol/L): 20 HEPES, 1 EGTA, 210 mannitol, 70 sucrose, pH 7.2 with NaOH. Homogenized samples were centrifuged (4300g, 5 minutes at 4°C) and supernatants were used for the determination of superoxide dismutase (SOD) activity. SOD enzyme activity was then determined as described in the procedure of the SOD Assay Kit-WST from Sigma and as carried out in previous studies.²¹ Tissue protein content of each sample was also quantified in mg/ml to normalize SOD enzyme activity, expressed in U/mg of proteins.

Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cells culture. Smooth muscle cells from pulmonary arteries (PASMC) were obtained as previously described.²² Briefly, IPA from the rat left lung were dissected free from surrounding connective tissues. IPA were cut into small pieces and placed in Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) containing 50 mmol/L CaCl_2 , 0.5 mg/ml papain, 0.3 mmol/L dithioerythritol and 0.3 mg/ml collagenase for 10 min at 37°C. IPA were then mechanically and gently agitated using a polished wide-bore Pasteur pipette to release the cells. PASMC were seeded on 14 mm round glass coverslips, stored in culture medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin–streptomycin, 1% sodium pyruvate and 1% non essential amino acids enriched with 10% fetal calf serum and maintained at 37°C in a humidified atmosphere gassed with 5% CO_2 . When the PASMC reached 80% confluence, they were growth arrested for 48 h by using serum-free culture medium supplemented with 1% insulin–transferrin–selenium before they were used for cytosolic and mitochondrial calcium and mitochondrial membrane potential measurements with fluorescent dyes. For mitochondrial respiration assessment, PASMC were seeded in 175- mm^2 flasks and grown until 100 % confluence.

Recording of cytosolic and mitochondrial calcium and mitochondrial membrane potential with fluorescent dyes. Cytosolic and mitochondrial calcium were assessed by simultaneously loading PASMC with the fluo4-AM probe (2 $\mu\text{mol/L}$) and Rhod-2AM probe (1 $\mu\text{mol/L}$) respectively. For mitochondrial membrane potential, PASMC were loaded with tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM) (100 nmol/L). PASMC fluorescence was visualized with a laser scanning confocal microscope (TE2000, Nikon, Champigny-Sur-Marne, France). Experiments were performed at room temperature. The fluorescence values (F) were then normalized to the basal fluorescence (fluorescence before application of the agonists or F_0) to obtain the fluorescence ratio (F/ F_0). The area under the curve was

calculated with Origin 6.0 software (Microcal). The area under the curve was calculated with y values between time 45 seconds and time 120 seconds (75 seconds duration). Time 45 seconds is the time when the agonist arrives in the bath. Results are expressed as $(F/F_0) \cdot \text{sec}^{-1}$.

Mitochondrial respiration measurements. Endogenous cellular oxygen consumption was monitored on a suspension of intact PASMC at 37 °C in a 1 ml thermostatically controlled chamber (1.0×10^6 cells/ml/run) equipped with a Clark oxygen electrode (Oxygraph system, Hansatech) as previously described.²³ The respiratory buffer was the DMEM growth medium without serum. Cumulative concentrations of agonists were added to the chamber when indicated. The basal respiratory rate is expressed as $\text{nmol O}_2/\text{min}/10^6$ cells and then the results are expressed as a % of the basal respiratory rate.

Immunofluorescence. IPA were fixed in formalin and either directly labeled or embedded in OCT-compound, frozen at -20 °C and cut in 14 μm sections with a cryostat (LEICA). Labeling was performed with a primary antibody and the appropriate secondary antibody coupled to Alexa 555 (red) or Alexa 488 (green) and sections or whole IPA were then observed with a laser scanning confocal microscope TE2000 (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France).

Transmission electron microscopy (TEM). Rats were deeply anesthetized with an intraperitoneal injection of pentobarbital (100 mg/kg) and perfused transcardially with 10 ml of heparinized phosphate-buffered saline (PBS) solution (10 u/ml) followed by 10 ml with paraformaldehyde 4 % and 2.5 % glutaraldehyde in PBS. IPA were then isolated as described in paragraph tissue preparation and ultrastructure. TEM images were obtained as previously described.²⁴

Isometric tension measurements. IPA of first order were divided into short tubular segments and used for isometric contraction measurement as reported previously.⁵ Arterial rings were mounted in an organ bath system, containing Krebs's solution at 37°C and bubbled continuously with 15% O_2 , 5% CO_2 . Krebs's solution contains in mmol/L: 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 1.2 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 , 1.2 KH_2PO_4 , 2.5 CaCl_2 , and 11.1 D-glucose, pH 7.4 with NaOH. An initial load of 0.8 g was applied to arterial rings. Tissues were allowed to equilibrate for 1 h in Krebs solution and washed out every 15 min. A high KCl solution (80 mmol/L) was applied in order to obtain a reference contraction used to normalize subsequent contractile responses. Contractile responses to different agonists were then tested by constructing a cumulative

concentration-response curve (CCRC) to 5-HT (10 nmol/L to 100 μ mol/L) or high KCl solutions (4.7 to 100 mmol/L). When indicated, the caveolae destroyer, methyl- β -cyclodextrin (7 mmol/L) was preincubated during 30 minutes, before CCRC to agonist was performed still in the presence of the drug. High potassium solutions were obtained by substituting an equimolar amount of KCl for NaCl from Krebs's solution. Experiments were performed on vessels with intact endothelium and endothelial function was tested on each ring by examining the relaxation induced by 10 μ M carbamylcholine on pulmonary arterial rings precontracted with 0.3 μ mol/L of PHE. Passive and active mechanical properties were assessed using transducer systems, coupled to IOX software (EMKA technologies, Paris, France) in order to facilitate data acquisition and analysis.

Data analysis and statistics. Results are expressed as mean \pm SEM; *n* indicates the number of rats for EPR, peroxyntrites measurements, SOD activity, mitochondrial respiratory activity and immunofluorescence, the number of cells for cytosolic, mitochondrial calcium and mitochondrial membrane potential recordings and the number of arterial rings for the contractile studies. Experiments were performed on at least 3 to 4 rats. CCRC for the contraction to agonists were fitted to the logistic equation with Origin 6.0 software (Microcal). Statistical analyses were performed using two ways ANOVA for global comparisons of the CCRC. Unpaired *t*-test was used to compare data obtained for the different conditions tested for cytosolic, mitochondrial calcium and mitochondrial potential measurements. One way ANOVA (non parametric Kruskal-Wallis followed by Dunn's multiple comparison tests) was used to compare mitochondrial respiration measurements and its % of inhibition in the presence of agonists. All other data were analyzed using a non parametric test for unpaired samples (Mann-Whitney test). All bar graphs and statistics were done with GraphPad Prism 5. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Agonists-induced production of $O_2^{\cdot-}$ in rat IPA. We previously demonstrated that 5-HT had a maximal contractile effect at the dose of 100 $\mu\text{mol/L}$ in rat IPA.⁶ Moreover, the maximal effect of the anti-oxidant PEG-SOD and PEG-catalase was observed on the contraction to 5-HT 100 $\mu\text{mol/L}$.⁶ Therefore we focused our study on $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT 100 $\mu\text{mol/L}$. Indeed, as previously demonstrated⁶, electron paramagnetic resonance (EPR) recordings showed that 5-HT (100 $\mu\text{mol/L}$) significantly increased $O_2^{\cdot-}$ levels in rat IPA ($n = 12$) (Figure 1A). Similarly, 5-HT (100 $\mu\text{mol/L}$) also significantly increased $O_2^{\cdot-}$ levels in rat aorta ($n = 7$) (Figure S1). Since $O_2^{\cdot-}$ can be scavenged by NO to form peroxynitrites ($\text{ONOO}^{\cdot-}$), we measured $\text{ONOO}^{\cdot-}$ concentration in rat IPA with Griess reagent as an alternative means to investigate 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase. 5-HT significantly increased $\text{ONOO}^{\cdot-}$ levels (Figure 1B). Moreover, 5-HT had no significant effect on the activity of superoxide dismutase, an anti-oxidant enzyme responsible for $O_2^{\cdot-}$ degradation (Figure 1C). Altogether, 5-HT produces $O_2^{\cdot-}$ in IPA and aorta and modification of superoxide dismutase activity cannot explain 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase in IPA.

Role of 5-HT receptors, 5-HT transporter and calcium in 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase. Pulmonary arterial contraction in response to 5-HT is known to be mediated by $O_2^{\cdot-}$, 5-HT receptors (5-HT_{2A} and 5-HT_{1B/D}) and, to a lesser extent, by the 5-HT transporter.^{2, 6} We thus used selective pharmacological inhibitors to study the role of the 5-HT transporter, 5-HT_{2A} and 5-HT_{1B/D} receptors involved in IPA contraction. EPR recordings showed that ketanserin, a 5-HT_{2A} receptor antagonist significantly decreases the amount of $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT ($n = 9$) (Figure 2A) whereas blocking the 5-HT_{1B/D} receptors or the 5-HT transporter by GR 127935 (1 $\mu\text{mol/L}$) or citalopram (1 $\mu\text{mol/L}$), respectively has no effect ($n = 11-12$) (Figure 2A).

Upon binding to its 5-HT_{2A} receptor, 5-HT induces a rise in cytosolic calcium coming from both (i) the intracellular compartment, mainly the sarcoplasmic reticulum, and (ii) an influx of extracellular calcium.³ We thus studied the role of intracellular calcium in rat IPA by depleting the calcium from the sarcoplasmic reticulum with a calcium free Krebs-Hepes-bicarbonate solution containing a calcium chelator (0.4 mmol/L EGTA), an activator of ryanodine receptors (caffeine 5 mmol/L) and an inhibitor of the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase to prevent calcium re-uptake in the sarcoplasmic reticulum (thapsigargin 1 $\mu\text{mol/L}$). Once the sarcoplasmic reticulum was depleted, extracellular calcium was reintroduced in the incubation medium thus allowing the activation of Store-Operated calcium permeable Channels in the plasma membrane. The implication of extracellular calcium was studied by incubating IPA in calcium free Krebs solution containing 0.4 mmol/L EGTA. Unlike in the absence of intracellular calcium, absence of extracellular calcium significantly reduced 5-HT-

induced $O_2^{\cdot-}$ increase ($n = 12-13$) (Figure 2B). Moreover, absence of both intra and extracellular calcium was not significantly additive ($n = 7$) (Figure 2B).

In smooth muscle, calcium influx is due to the activation of voltage-dependent calcium channels and voltage-independent calcium channels.^{3, 5, 25} We investigated the role of those channels on 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase by using their respective antagonists in rat IPA. Nicardipine (1 $\mu\text{mol/L}$), an L-type voltage-dependent calcium channels blocker did not inhibit $O_2^{\cdot-}$ level in response to 5-HT (Figure 2C) whereas LOE-908 (10 $\mu\text{mol/L}$) and RHC-80267 (50 $\mu\text{mol/L}$), two voltage-independent calcium channels antagonists already known to decrease contraction and calcium response to 5-HT in rat IPA³ significantly decreased 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ increase (Figure 2D). Altogether, 5-HT produced $O_2^{\cdot-}$ via the activation of the 5-HT_{2A} receptors and a calcium influx through voltage-independent calcium channels.

Role of ROS sources in the production of $O_2^{\cdot-}$ by 5-HT in rat IPA. METC and Nox are known to be important sources of $O_2^{\cdot-}$.¹³ With EPR recordings, we showed that rotenone (5 $\mu\text{mol/L}$), an inhibitor of electron transfer of the complex I of the METC and apocynin (30 $\mu\text{mol/L}$), a Nox inhibitor, significantly decrease the amount of $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT (100 $\mu\text{mol/L}$) (Figure 3A). However, antimycin A (10 $\mu\text{mol/L}$), a complex III cytochrome b_H inhibitor does not exhibit any significant effect on 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production (Figure 3A). All these inhibitors of ROS sources have been commonly used including in pulmonary arteries.^{11, 26} Rotenone or apocynin do not modify basal $O_2^{\cdot-}$ level (Figure S2). Since rotenone or apocynin both suppressed the level of $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT, we hypothesized that the METC and Nox are interconnected in this process. A potential candidate for this interconnection is protein kinase C ϵ (PKC ϵ) which is known to (i) be activated by $O_2^{\cdot-}$ from the mitochondria and (ii) induce the production of $O_2^{\cdot-}$ by Nox.²⁷ Indeed, our results showed that inhibition of PKC ϵ by its inhibitor peptide (10 $\mu\text{mol/L}$) significantly decreases 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production to its basal level (Figure 3B) suggesting that PKC ϵ is involved in the 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production.

Since extracellular calcium influx and mitochondria play a key role in the production of $O_2^{\cdot-}$ by 5-HT (Figure 2B, 2D, 3A), we hypothesized that calcium influx induced by 5-HT would stimulate calcium uptake by the mitochondria. We thus simultaneously measured cytosolic and mitochondrial calcium levels in PASMC, in response to 5-HT in the presence and in the absence of extracellular calcium. Fluorescent labelings of PASMC with Mitotracker green, a mitochondrial marker, and Rhod-2, a mitochondrial calcium dye, show a high level of colocalization demonstrating the specific targeting of Rhod-2 to the mitochondrial network (Figure S3). 5-HT (100 $\mu\text{mol/L}$) increased both cytosolic and mitochondrial calcium levels in the presence of extracellular calcium (Figure 3C and 3E). In the absence of extracellular calcium, the rise in cytosolic calcium was significantly decreased and the rise in mitochondrial calcium almost disappeared (Figure 3D and 3E). It should be noted that

mitochondrial calcium increase is slightly delayed compared to cytosolic calcium increase suggesting that calcium influx may be uptaken by the mitochondria. We then investigated the effect of 5-HT on the mitochondrial respiratory rate and on the mitochondrial membrane potential. 5-HT significantly decreased the mitochondrial respiratory rate (Figure 3F). The mitochondrial membrane was transiently depolarized in response to 5-HT 100 $\mu\text{mol/L}$ in the presence of extracellular calcium (Figure 4B) whereas in its absence, the depolarization was strongly delayed and sustained (Figure 4B and 4C). Altogether, these results confirm the role of mitochondria in the signaling pathways involved in response to 5-HT.

Caveoli and myoendothelial gap junctions in the 5-HT-induced O_2^- production process. Our previous studies suggested that O_2^- produced in the smooth muscle may pass through myoendothelial gap junctions, with Cx 43 being mainly involved, to scavenge endothelial NO and thus strengthen IPA vasoreactivity.⁶ However, O_2^- is a highly reactive species whose half-life is very small (in the μs range).²⁸ Based on these two properties, we hypothesized that 5-HT-induced O_2^- production should occur in a confined environment very close to Cx 43 in order to allow O_2^- to rapidly react with endothelial NO. Since it has been suggested that 5-HT_{2A} receptor as well as endothelial NO synthase are localized at the site of the caveolae¹⁴, we labeled 5-HT_{2A} receptor compared to (i) cav-1, the main protein of caveolae and (ii) Cx 43 in rat IPA. Cav-1 labeled in green is expressed in both PASMC and endothelial cells (Figure 5A, 5B, 5C, and 5D) as well as in specialized microdomains such as fenestrae of the internal elastic lamina (Figure 5E and 5F). Numerous caveoli are also visible in both PASMC and endothelial cells on transmission electron microscopy images (Figure 5G and 5H, blue dashed arrow). 5-HT_{2A} receptors are expressed both in PASMC and endothelial cells (Figure S4A, S4B, S4E and S4F red labeling) and also in the internal elastic lamina fenestrae (Figure S4G and S4H). As shown in previous studies^{6, 29}, Cx 43 is mainly expressed in endothelial cells (Figure S4C, S4D, S4E and S4F) and also in the internal elastic lamina fenestrae (Figure S4G and S4H). Interestingly, some colocalization between cav-1 and 5-HT_{2A} receptors as well as Cx 43 and 5-HT_{2A} receptors can be observed (Figure 5E, 5F, S4G and S4H respectively - white arrows – yellow color). In conclusion, 5-HT_{2A} receptors, cav-1 and Cx 43 are present in the internal elastic lamina fenestrae of the IPA and could thus be potentially involved in the signaling pathways associated to 5-HT-induced O_2^- production.

Role of caveoli in the contractile response in rat IPA. Since in rat IPA, (i) 5-HT_{2A} receptors are localized in caveoli and involved in the contraction to 5-HT^{3, 6, 14} (ii) caveoli are abundantly expressed in both endothelium and smooth muscle (Figure 5) and (iii) O_2^- is involved in the contraction to 5-HT⁶, we thus investigated the functional role of caveoli in the-

contraction induced by 5-HT or high potassium solutions in rat IPA. Methyl- β -cyclodextrin is commonly used as a caveolar-disrupting agent.^{30, 31} Depletion of caveolae lipid rafts with methyl- β -cyclodextrin (7 mmol/L) significantly reduces 5-HT-induced vasoconstriction in rat IPA (Figure 6A). The methyl- β -cyclodextrin has no effect on the contraction induced by high potassium solution (Figure 6B) demonstrating that the effect of this pharmacological compound is not a non specific effect. These results indicate that caveoli are strongly involved in the contractile response to 5-HT.

Discussion

Our findings provide the first comprehensive description of the signaling pathway linking $O_2^{\cdot-}$ production to 5HT-induced contraction in rat IPA. Our data indicate that 5-HT acts on $5-HT_{2A}$ receptors to activate a calcium influx responsible for mitochondrial calcium increase leading to a mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ production via the complex I of the METC (Figure 7). Since our data also indicate a role for Nox, we believe that the $O_2^{\cdot-}$ produced by the mitochondria may stimulate an $O_2^{\cdot-}$ -induced $O_2^{\cdot-}$ release mechanism via the activation of $PKC\epsilon$ and, conceivably, Nox as previously described.²⁷ Our results also demonstrate that $O_2^{\cdot-}$ reacts with NO in the endothelium to produce $ONOO^-$ thus reducing the bioavailability of the endothelial NO produced in response to 5-HT resulting in a potentiated 5-HT-induced vasoconstriction. Lastly, we found that caveoli are important for 5-HT-induced contraction.

In the present study, we first confirmed that 5-HT produces $O_2^{\cdot-}$ by means of: (i) EPR recordings and, (ii) measurement of $ONOO^-$ which, indirectly, quantifies $O_2^{\cdot-}$. Interestingly, the production of $ONOO^-$ was consistent with our previous study, in which we demonstrated that $O_2^{\cdot-}$ negatively controls endothelial-induced relaxation by reducing cGMP production, likely due to scavenging of the endothelial NO.⁶

In the present manuscript, we have demonstrated that 5-HT-increased $O_2^{\cdot-}$ level is sensitive to inhibition of $5-HT_{2A}$ receptors with ketanserin, extracellular calcium removal and inhibition of voltage-independent calcium channels with RHC-80267 and LOE-908 (Figure 2). On the other hand, we previously demonstrated that the contraction to 5-HT is (i) sensitive to the same blockers (ketanserin, calcium free solution, RHC-80267 and LOE 908)³⁻⁵ and (ii) implicates $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT⁶, thus confirming that 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production is involved in the contraction under physiological conditions in rat IPA. Consistently, other groups have also demonstrated that the contraction to 5-HT is dependent on stimulation of $5-HT_{2A}$ receptors and extracellular calcium in rat.^{32, 33}

Extensive studies have been performed on ROS production and on the sources involved in such production in the pulmonary circulation, especially in the case of hypoxic pulmonary vasoconstriction or pulmonary hypertension^{16, 27} but only one study addressed the issue of ROS production in response to vasocontractile agonist stimulation.¹¹ Liu and Folz¹¹ have shown the role of Nox in the production of $O_2^{\cdot-}$ by 5-HT in mice PA by using pharmacological and genetic approaches (apocynin and $gp91^{phox}$ knock-out mice, respectively) but they did not address the role of mitochondria. Here, we show that $O_2^{\cdot-}$ produced by 5-HT was fully blocked by both apocynin and rotenone indicating that Nox is not the only source involved in this process but also that Nox and METC may be interconnected. A similar pathway has been highlighted in hypoxic pulmonary vasoconstriction.²⁷ Indeed, acute hypoxia increases mitochondrial ROS (specifically H_2O_2), which, in turn, activate $PKC\epsilon$ leading to a further increase in intracellular ROS generation by Nox.²⁷ These phenomena

provide a positive feedback mechanism contributing to hypoxic increase in intracellular calcium and contraction in PA.²⁷ Since a PKC ϵ peptide blocker inhibited O₂⁻ produced by 5-HT in rat IPA (Figure 3B), we suggest the presence of such a ROS-induced ROS release mechanism via PKC ϵ stimulation.

Under pathophysiological conditions, NO reduction by O₂⁻ has already been observed in systems that overproduce ROS such as pulmonary and systemic hypertension.^{34, 35} However, so far no study has demonstrated any role of mitochondrial O₂⁻ in the vascular responses to 5-HT or any other vasoconstrictor in control conditions. We have several lines of evidence arguing in favor of a role of mitochondria in the production of O₂⁻ by 5-HT under physiological conditions. First of all, O₂⁻ produced by 5-HT is blocked by rotenone (Figure 3A), 5-HT increases the mitochondrial calcium concentration (Figure 3C and 3E), significantly decreases mitochondrial respiratory rate (Figure 3F) and, finally, significantly depolarizes mitochondrial membrane (Figure 4). Interestingly, in the absence of extracellular calcium, the increase in mitochondrial calcium concentration is almost suppressed (Figure 3D and 3E) and change in mitochondrial membrane potential is strongly delayed (Figure 4B and 4C) which is in accordance with data from the literature demonstrating that calcium influxes are buffered by mitochondria positioned close to the plasma membrane.³⁶ According to our results, we thus suggest that extracellular calcium may be taken up by the mitochondria to depolarize mitochondrial membrane in order to produce O₂⁻. Consistently with our previous report, we think that O₂⁻ then passes through Cx 43-based gap junction present at the MEJ to decrease endothelial NO bioavailability thus increasing the contraction to 5-HT.

Transmission electron microscopy images evidenced (i) an abundance of caveoli in smooth muscle and endothelium, (ii) the proximity of the endothelium with adjacent PASMC via endothelial cell protrusions which correspond to MEJ and (iii) that MEJ are localized very close to caveoli (Figure 5G and 5H). Along the same line, we demonstrated that disruption of caveoli strongly inhibited the contraction to 5-HT (Figure 6A). Few studies, carried out in different vascular models, support the importance of caveoli in vascular signaling pathways involving 5-HT, NO and Cx 43: (i) Saliez et al., evidenced the interaction between cav-1 and Cx 43 in mice mesenteric arteries³⁷; (ii) Banquet et al., showed a negative regulation by cav-1 of the eNOS dependent vasorelaxation in mice PA³⁰ and (iii) Cogolludo et al. reported the co-immunoprecipitation of voltage-gated K⁺ channels type 1.5 with 5-HT_{2A} receptors and cav-1 in rat PASMC.¹⁴ Interestingly, in the present study, we also highlighted the presence and some colocalization of the 5-HT_{2A} receptors, Cx 43 and caveoli in the internal elastic lamina fenestrae thereby the MEJ (Figure 5E, 5F, S4G, S4H) thus confirming the close location of these structures.

In conclusion, 5-HT-induced production of $O_2^{\cdot-}$ is mediated by 5-HT_{2A} receptors and dependent on the complex I of the METC and Nox. Extracellular calcium influx plays an important role and this process may be localized in caveoli. Our study emphasized the presence of a mitochondrial calcium-dependent $O_2^{\cdot-}$ production by 5-HT under physiological conditions thus revealing a new unexpected physiological role for mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ in PA. So far, only H_2O_2 , product of the $O_2^{\cdot-}$ dismutation by the superoxide dismutase, has been shown to be the main ROS involved in the normal vascular tone essential to control blood flow and nutrients/oxygen supply to the organs. In the present study, we thus described an alternative mechanism to regulate vascular tone via the action of $O_2^{\cdot-}$.

Funding

This work was supported by Conseil Régional d'Aquitaine (20111302006).

Conflict of Interest: none declared.

References

1. Dempsie Y, MacLean MR. Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system. *Br J Pharmacol* 2008;**155**:455-462.
2. Maclean MR, Dempsie Y. The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited. *Adv Exp Med Biol* 2010;**661**:309-322.
3. Guibert C, Marthan R, Savineau JP. 5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;**286**:L1228-1236.
4. Rodat L, Savineau JP, Marthan R, Guibert C. Effect of chronic hypoxia on potential-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries. *Pflugers Arch* 2007;**454**:41-51.
5. Rodat-Despoix L, Crevel H, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed. *J Vasc Res* 2008;**45**:181-192.
6. Billaud M, Marthan R, Savineau JP, Guibert C. Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications. *PLoS One* 2009;**4**:e6432.
7. Lawrie A, Spiekerkoetter E, Martinez EC, Ambartsumian N, Sheward WJ, MacLean MR, Harmar AJ, Schmidt AM, Lukanidin E, Rabinovitch M. Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease. *Circ Res* 2005;**97**:227-235.
8. Lee SL, Simon AR, Wang WW, Fanburg BL. H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001;**281**:L646-652.
9. Lee SL, Wang WW, Fanburg BL. Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**:855-858.
10. Lee SL, Wang WW, Finlay GA, Fanburg BL. Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion. *Am J Physiol* 1999;**277**:L282-291.
11. Liu JQ, Folz RJ. Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;**287**:L111-118.
12. Pena-Silva RA, Miller JD, Chu Y, Heistad DD. Serotonin produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;**297**:H1354-1360.

13. Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, Moreno L. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;**174**:212-220.
14. Cogolludo A, Moreno L, Lodi F, Frazziano G, Cobeno L, Tamargo J, Perez-Vizcaino F. Serotonin inhibits potential-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization. *Circ Res* 2006;**98**:931-938.
15. Rodat-Despoix L, Aires V, Ducret T, Marthan R, Savineau JP, Rousseau E, Guibert C. Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery. *Eur Respir J* 2009;**34**:1338-1347.
16. Dromparis P, Michelakis ED. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol* 2013;**75**:95-126.
17. Shimoda LA, Udem C. Interactions between calcium and reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle responses to hypoxia. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;**174**:221-229.
18. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP. Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 2012;**92**:367-520.
19. Ward JP. Point: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species. *J Appl Physiol* 2006;**101**:993-995; discussion 999.
20. Ushio-Fukai M. Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 2009;**11**:1289-1299.
21. Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta* 2000;**293**:157-166.
22. Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau JP, Ducret T. Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 2012;**464**:261-272.
23. Rossignol R, Gilkerson R, Aggeler R, Yamagata K, Remington SJ, Capaldi RA. Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 2004;**64**:985-993.
24. Johnstone SR, Ross J, Rizzo MJ, Straub AC, Lampe PD, Leitinger N, Isakson BE. Oxidized phospholipid species promote in vivo differential cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Am J Pathol* 2009;**175**:916-924.
25. Ducret T, Guibert C, Marthan R, Savineau JP. Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 2008;**43**:315-323.

26. Ahmad M, Kelly MR, Zhao X, Kandhi S, Wolin MS. Roles for Nox4 in the contractile response of bovine pulmonary arteries to hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;**298**:H1879-1888.
27. Rathore R, Zheng YM, Niu CF, Liu QH, Korde A, Ho YS, Wang YX. Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 2008;**45**:1223-1231.
28. Bienert GP, Schjoerring JK, Jahn TP. Membrane transport of hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta* 2006;**1758**:994-1003.
29. 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.
30. Banquet S, Delannoy E, Agouni A, Dessy C, Lacomme S, Hubert F, Richard V, Muller B, 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. *Cell Signal* 2011;**23**:1136-1143.
31. Paffett ML, Naik JS, Riddle MA, Menicucci SD, Gonzales AJ, Resta TC, Walker BR. Altered membrane lipid domains limit pulmonary endothelial calcium entry following chronic hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;**301**:H1331-1340.
32. MacLean MR, Sweeney G, Baird M, McCulloch KM, Houslay M, Morecroft I. 5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats. *Br J Pharmacol* 1996;**119**:917-930.
33. Yuan XJ, Bright RT, Aldinger AM, Rubin LJ. Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;**272**:L44-50.
34. Ago T, Kuroda J, Kamouchi M, Sadoshima J, Kitazono T. Pathophysiological roles of NADPH oxidase/Nox family proteins in the vascular system. -Review and perspective. *Circ J* 2011;**75**:1791-1800.
35. Brennan LA, Steinhorn RH, Wedgwood S, Mata-Greenwood E, Roark EA, Russell JA, Black SM. Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase. *Circ Res* 2003;**92**:683-691.
36. McCarron JG, Olson ML, Chalmers S. Mitochondrial regulation of cytosolic Ca²⁺(+) signals in smooth muscle. *Pflugers Arch* 2012;**464**:51-62.
37. Saliez J, Bouzin C, Rath G, Ghisdal P, Desjardins F, Rezzani R, Rodella LF, Vriens J, Nilius B, Feron O, Balligand JL, Dessy C. Role of caveolar compartmentation in

endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells. *Circulation* 2008;**117**:1065-1074.

Supplementary material

Superoxide dismutase (SOD) activity measurement. IPA treated or not with 5-HT were homogenized in HEPES buffer containing (in mmol/L): 20 HEPES, 1 EGTA, 210 mannitol, 70 sucrose, pH 7.2 with NaOH. Homogenized samples were centrifuged (4300 rpm, 5 minutes at 4°C) and supernatants were used for the determination of superoxide dismutase (SOD) activity. SOD enzyme activity was then determined as described in the procedure of the SOD Assay Kit-WST from Sigma and as carried out in previous studies.¹ Briefly, the principle of the kit is based on the inhibition of the activity of SOD in presence of the highly water-soluble tetrazolium salt WST-1 (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt) that produces a colored water-soluble formazan (WST1-formazan) dye upon reduction with $O_2^{\cdot-}$. The SOD activity as an inhibition activity is therefore determined by measuring the increase in color of the WST1-formazan dye development at 450 nm with a microplate reader (EL808, Bio-Tek instruments). SOD standard solutions ranging from 0.001 U/ml to 200 U/ml were used to perform a calibration curve and SOD activity value was read from this curve and expressed in U/ml for each sample. Tissue protein content of each sample was also quantified in mg/ml to normalize SOD enzyme activity, expressed in U/mg of proteins.

Recording of cytosolic and mitochondrial calcium and mitochondrial membrane potential with fluorescent dyes. Cytosolic and mitochondrial calcium were assessed by simultaneously loading PASMCM with the non ratiometric fluo4-AM probe (2 μ mol/L) and Rhod-2AM probe (1 μ mol/L) respectively. For mitochondrial membrane potential PASMCM were loaded with TMRM (100 nmol/L). PASMCM were also loaded simultaneously with Rhod-2AM (1 μ mol/L) and mitotracker green (400 nmol/L), a mitochondrial marker, for mitochondria labeling. All the fluorescent dyes used were obtained from Molecular probes. For all the above mentioned set of experiments, PASMCM were loaded with the dyes for 30 minutes at 37°C in KHB solution and then washed in KHB solution without the dye for 30 minutes to allow deesterification of the dye. PASMCM were then mounted on the stage of a laser scanning confocal microscope (TE2000, Nikon, Champigny-Sur-Marne, France) with a \times 20, 1.40 NA plan apochromat oil-immersion objective. The cells were under continuous bath perfusion with KHB solution at a rate of 2 ml/min and 5-HT 100 μ mol/L was bath-applied. Fluo-4AM was excited with an argon laser at 488 nm and emitted light was filtered at 515 \pm 30 nm. Rhod-2AM and TMRM were excited with a helium-neon laser at 543 nm and the emitted light was filtered at 605 \pm 75 nm. Regions of interest were drawn around each cell and fluorescence was recorded every 2 seconds by using the EZ-C1 software (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France). Experiments were performed at room temperature. The

fluorescence values (F) were then normalized to the basal fluorescence (fluorescence before application of the agonists or F₀) to obtain the fluorescence ratio (F/F₀). The area under the curve was calculated with Origin 6.0 software (Microcal). The area under the curve was calculated with y values between time 45 seconds and time 120 seconds (75 seconds duration). Time 45 seconds is the time when the agonist arrives in the bath. Results are expressed as (F/F₀).sec⁻¹.

Immunofluorescence. Immunolabelings were performed on isolated IPA. Briefly, IPA were fixed in formalin for 10 minutes and then either embedded in OCT-compound, frozen at -20 °C and cut in 10 µm slices with a cryostat (LEICA) or kept in PBS for “en face” immunolabelings. Cryosections or IPA were treated during 30 minutes with 50 mmol/L glycine in PBS at room temperature to reduce autofluorescence from elastic lamina. Cryosections and IPA were permeabilised in PBS with 0.05% Triton-X100 and 0.25% Triton-X100 respectively, and then incubated in blocking buffer containing 3% bovine serum albumin (BSA) (Sigma, St Quentin Fallavier, France) and 10% fetal calf serum in PBS for 1 h at room temperature. Tissues were then incubated (i) in the primary antibody (table S1) overnight at 4°C and (ii) in the appropriate secondary antibody during 2 hours at room temperature (see table S1). For “en face” co-immunolabelings, IPA were incubated (i) in the above mentioned blocking buffer during 6 hours (ii) in the second primary antibody overnight at 4°C and (iii) in the appropriate secondary antibody (table S1) during 2 hours at room temperature. After incubation with antibodies, IPA were longitudinally opened under binocular control and nuclei of cryosections and IPA were stained with DAPI 2 µg/ml (blue) or Hoechst 10 µg/ml respectively, and then mounted in Dako mounting medium. For negative controls, slices were incubated with blocking solution without primary antibody and then with the appropriate secondary antibody. Slices were observed with a laser scanning confocal microscope TE2000 (Nikon, Champigny-Sur-Marne, France) with a × 60, 1.40 NA plan apochromat oil-immersion objective. All antibodies were diluted in blocking buffer. Excitation was obtained with a diode laser at 408 nm to observe the nuclei, an argon laser at 488 nm to observe connexin 43 (Cx 43) and caveolin-1 (cav-1) and an helium-neon laser at 543 nm to observe Cx 43 and the 5-HT_{2A} receptors. The emitted light was filtered as appropriate: 450 ± 35 nm for nuclei labeling (blue), 515 ± 30 nm for Cx 43 and cav-1 (green), and 605 ± 75 nm for Cx 43 and the 5-HT_{2A} receptors (red).

Table S1: Primary and secondary antibodies used with their concentrations. 5-HT_{2A}: 5-HT_{2A} receptor subtype, Cx 43: connexin 43, cav-1: caveolin 1.

Primary Antibody	Final concentration (µg/ml)	Host	Secondary Antibody	Host	Final concentration (µg/ml)
Anti 5-HT _{2A} (Abcam)	10	rabbit	Alexa fluor® 555 (abcam) – anti-rabbit	Donkey	10
Anti Cx-43 (Zymed)	5	Mouse	Alexa fluor® 568 (Invitrogen) – anti-mouse	Goat	10
Anti Cx-43 (Zymed)	5	Mouse	Alexa fluor® 488 (Invitrogen) – anti-mouse	Goat	10
Anti Cav-1 (Abcam)	0.5				

References of the supplementary material

1. Peskin AV, Winterbourn CC. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clin Chim Acta* 2000;**293**:157-166.

RESULTS

Figure 1

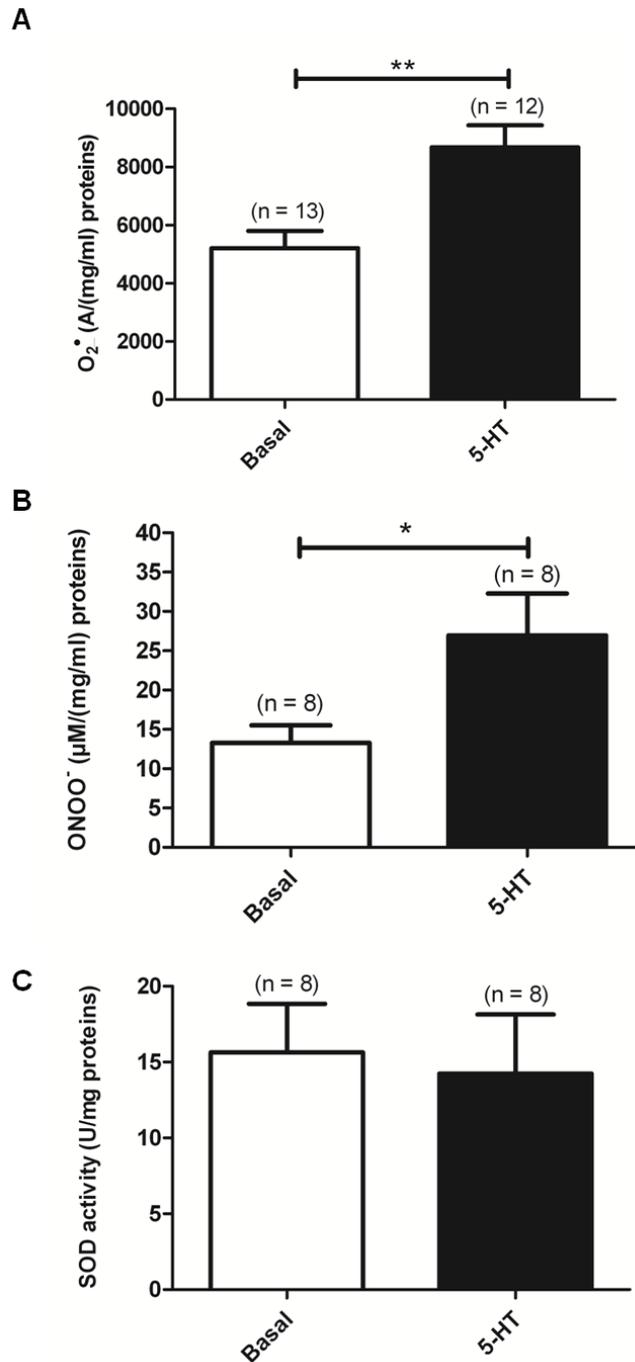


Figure 1. Production of $O_2^{\bullet-}$ by 100 $\mu\text{mol/L}$ 5-HT. **A)** Levels of $O_2^{\bullet-}$ were measured by EPR spectrometry in basal conditions (white column) or in the presence of 5-HT (black column). **B)** 5-HT increases ONOO⁻ levels. **C)** 5-HT do not modify SOD activity measured with the SOD-WST Elisa kit. Data are expressed as mean \pm SEM. ** and * mean a significant difference for $P<0.01$ and $P<0.05$ respectively. n is the number of rats.

Figure 2

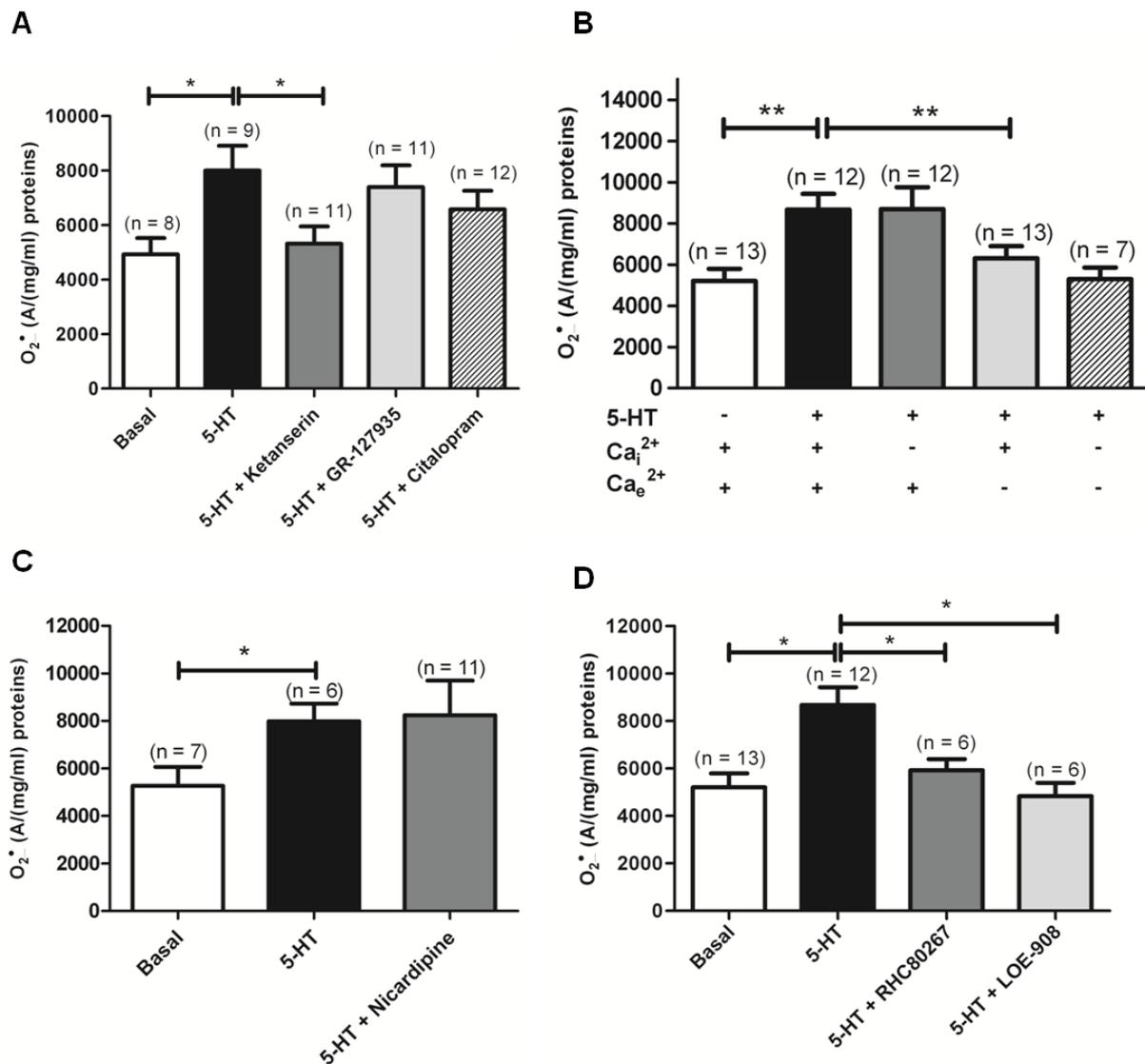


Figure 2. Role of 5-HT receptors, 5-HT transporter, calcium and calcium permeable channels in 5-HT-induced $O_2^{\cdot -}$ increase. **A)** Effect of a 5-HT_{2A} receptor antagonist (ketanserin, 1 μ mol/L, dark grey column), a 5-HT₁ receptor antagonist (GR127935, 1 μ mol/L, light grey column) or a 5-HT transporter antagonist (citalopram, 1 μ mol/L, hatched column) on the $O_2^{\cdot -}$ produced by 100 μ mol/L 5-HT. **B)** Effect of removal of intracellular Ca^{2+} (Ca_i^{2+} , dark grey column) or extracellular Ca^{2+} (Ca_e^{2+} , light grey column), or both Ca_i^{2+} and Ca_e^{2+} (hatched column) on $O_2^{\cdot -}$ produced by 100 μ mol/L 5-HT and measured by EPR spectrometry. Effect of nicardipine (1 μ mol/L), an L-type potential-gated calcium channel inhibitor (dark grey column) or two antagonists of potential-independent calcium permeable channel, RHC-80267 (50 μ mol/L) and LOE-908 (10 μ mol/L) (dark and light grey columns respectively) on the $O_2^{\cdot -}$ produced by 100 μ mol/L 5-HT (**C** and **D** respectively). Data are expressed as mean \pm SEM. ** and * mean a significant difference for $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively. n is the number of rats.

Figure 3

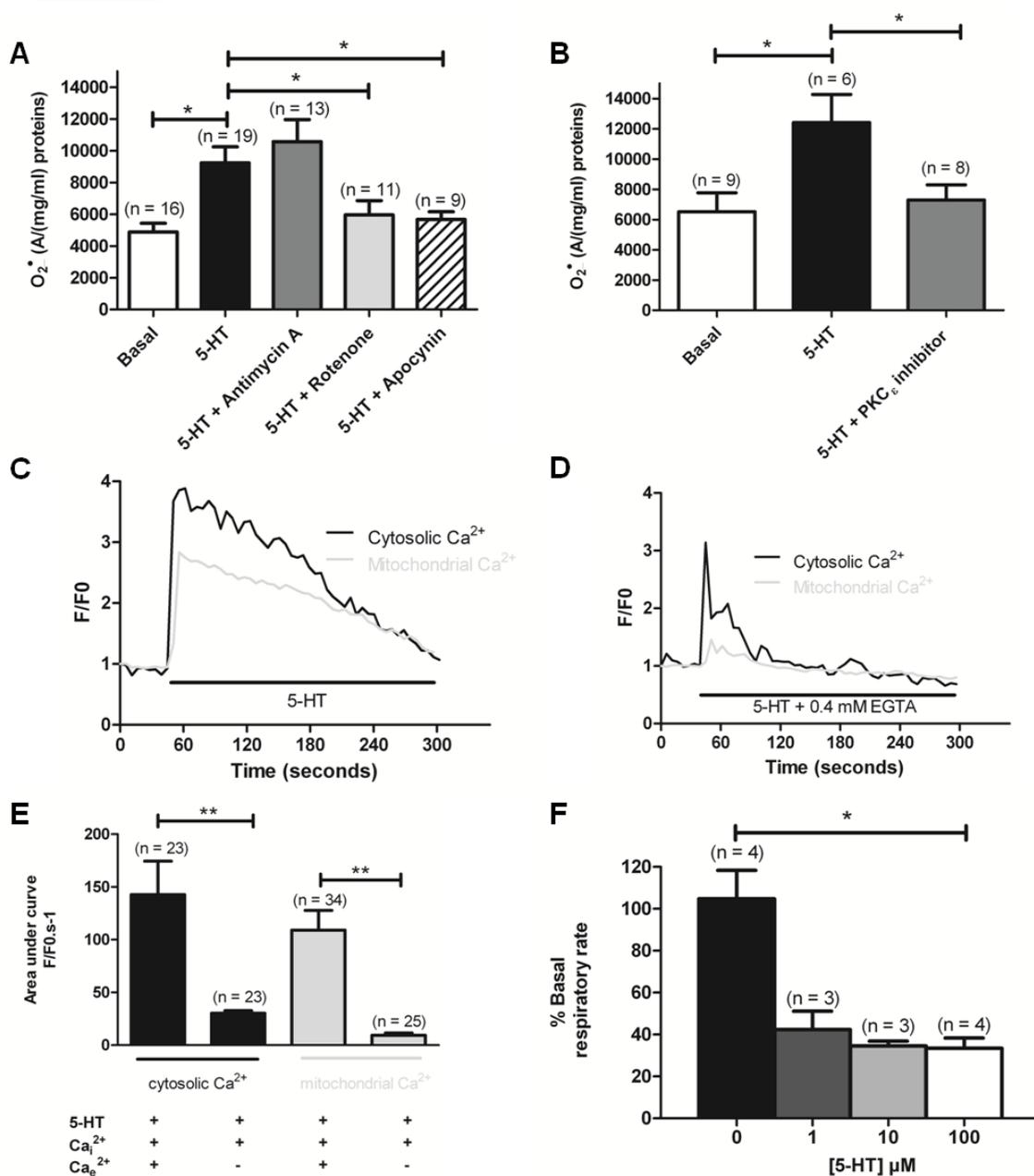


Figure 3. Sources of O_2^- produced by 5-HT. **A)** Effect of inhibitors of the complex III and I of the mitochondrial respiratory chain (Antimycin A, 5 μ mol/L and rotenone, 10 μ mol/L, dark and light grey columns respectively) and an inhibitor of Nox (apocynin, 30 μ mol/L, hatched column) is shown on the O_2^- produced by 100 μ mol/L 5-HT. **B)** Effect of a PKC $_{\epsilon}$ inhibitor peptide (10 μ mol/L, dark grey column) on the O_2^- produced by 100 μ mol/L 5-HT. n is the number of vessels. Typical traces of simultaneous recordings of cytosolic (black lines) and mitochondrial (light grey lines) Ca $^{2+}$ levels in response to 5-HT (100 μ mol/L) in PASMC are shown in the presence or in the absence of extracellular Ca $^{2+}$ (**C** and **D** respectively). **E)** Histograms of cytosolic and mitochondrial calcium variations (black and light grey columns respectively) induced by 5-HT (100 μ mol/L) in the presence and in the absence of extracellular Ca $^{2+}$. **F)** illustrates mitochondrial activity, expressed as a % of basal respiratory rate in response to cumulative concentrations of 5-HT (1 to 100 μ mol/L). n is the number of cells. Data are expressed as mean \pm SEM. ** and * mean a significant difference for $P < 0.01$ and $P < 0.05$ respectively.

Figure 4

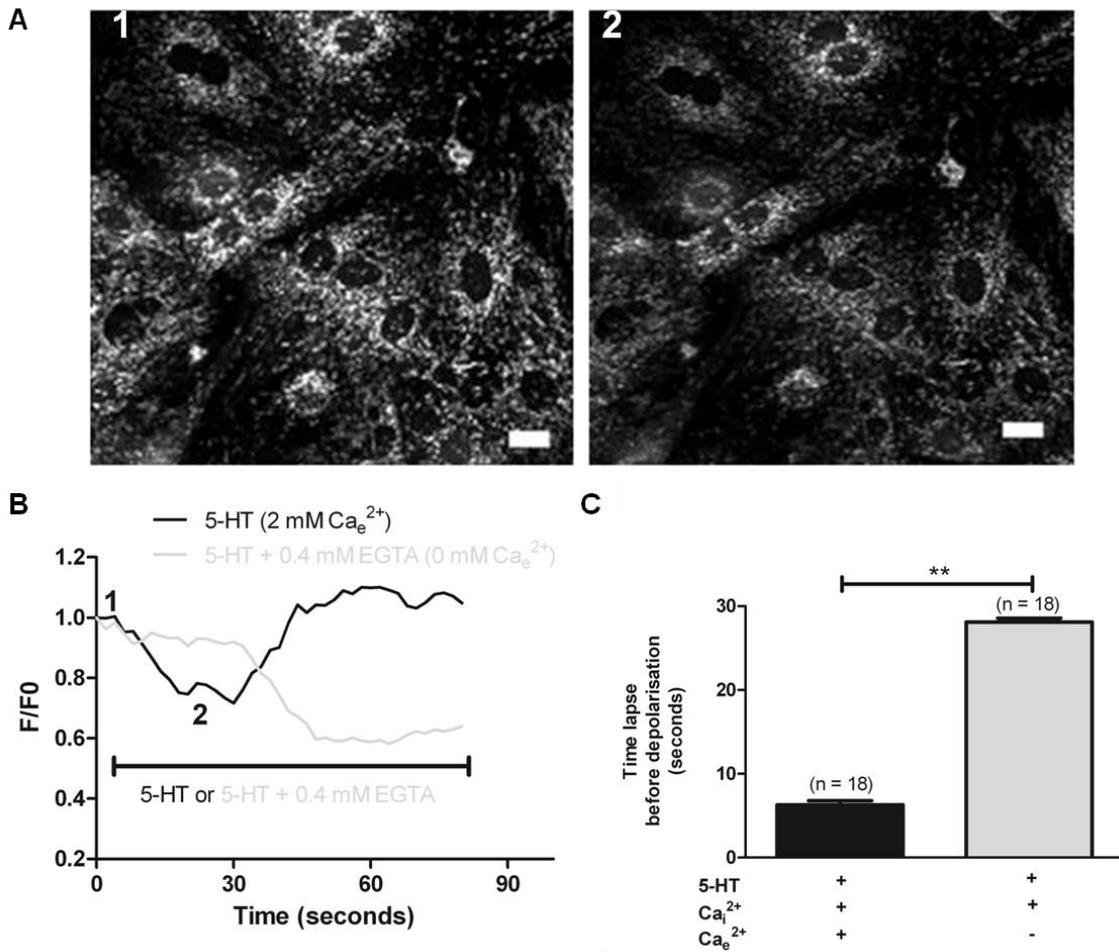


Figure 4. Effect of 5-HT on mitochondrial membrane potential in PASMC. **A)** Images 1 and 2 represent mitochondrial fluorescence density before and after application of 5-HT (100 μ mol/L). **B)** typical traces of mitochondrial membrane potential in response to 5-HT in the presence of 2 mmol/L Ca_e^{2+} (black line) or in the absence of Ca_e^{2+} and the presence of 0.4 mmol/L EGTA (light grey line). 1 and 2 indicate the F/F0 value for the corresponding images shown in A. F/F0 is the ratio of the fluorescence values F on the basal fluorescence F0 (before application of the agonists). **C)** values of the time lapse between bath-application of 5-HT and the beginning of the mitochondrial membrane potential variation in the presence and in the absence of extracellular Ca^{2+} (black and light grey columns respectively). Data are expressed as mean \pm SEM. ** means a significant difference for $P < 0.01$. n is the number of cells tested.

Figure 5

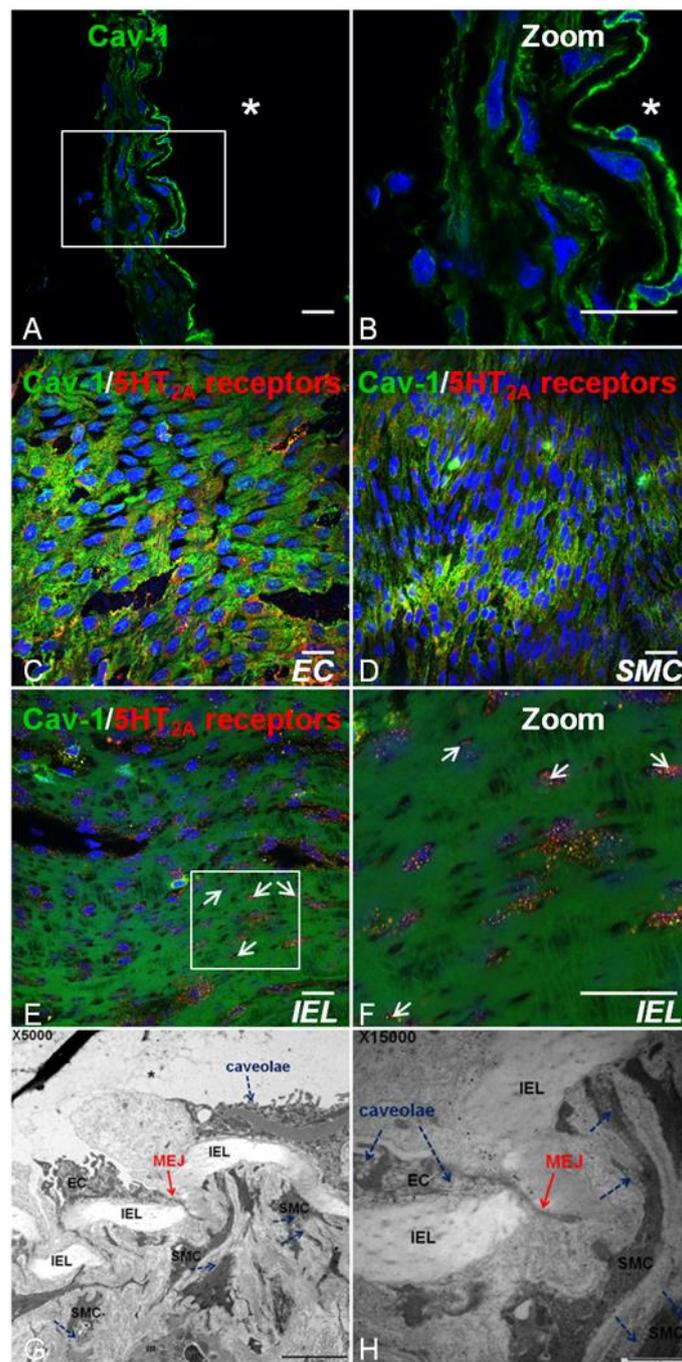
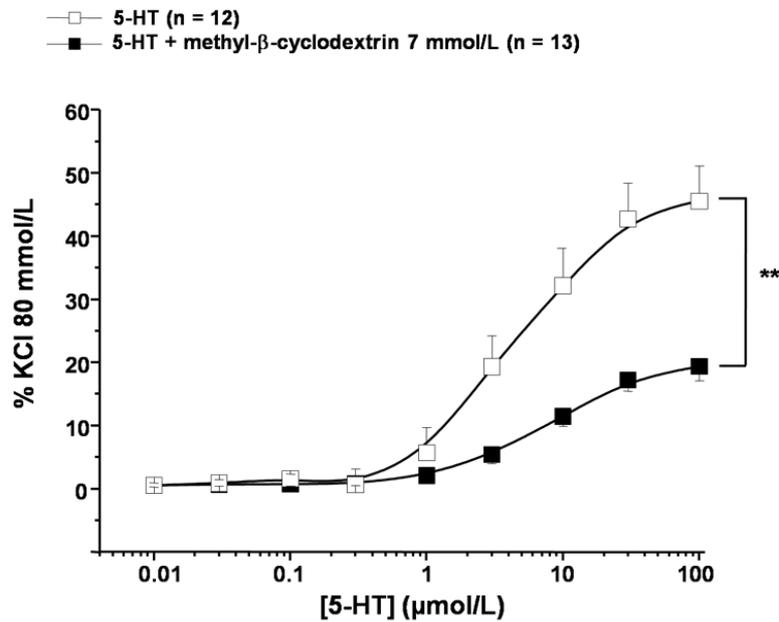


Figure 5. Localization of caveoli and myoendothelial junctions in rat IPA. **A)** IPA transverse section illustrating the localization of cav-1 (green). **B)** zoom of the framed region in A. **C)** and **D)** en face views of the EC or SMC side of opened vessels labeled for cav-1 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). **E)** en face view of the internal elastic lamina of an opened vessel labeled for cav-1 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). **F)** zoom of the framed region in E. White arrows indicate some colocalization (yellow) between cav-1 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). Nuclei are stained with DAPI (blue) in A and B and with Hoechst (blue) in C, D, E and F. **G)** and **H)** are transmission electronic microscopy images of rat IPA showing the presence of caveoli (blue dashed arrows) and myoendothelial junctions (MEJ, red arrow). EC corresponds to endothelial cells, SMC are smooth muscle cells, m is mitochondria, n is the nucleus and IEL is the internal elastic lamina. Image H is the zoom (X 15000) of image G. Scale bars are 20 μ m in A, B, C, D, E and F, 2.5 μ m in G and 1 μ m in H.

Figure 6

A



B

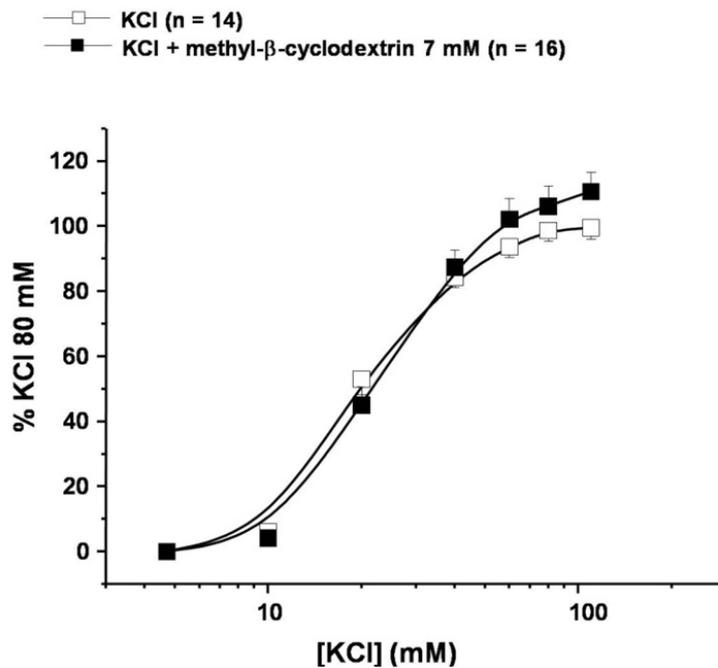


Figure 6. Role of caveoli in the contractile response to cumulative concentrations of 5-HT or high potassium solutions in IPA rings. **A)** Cumulative concentration response curves (CCRC) for the contraction to 5-HT (0.01 to 100 µmol/L) in the presence or in the absence of 7 mmol/L methyl-β-cyclodextrin (black and white squares respectively). **B)** CCRC for the contraction to high potassium solutions (KCl 4.7 to 100 mmol/L) in the presence or in the absence of 7 mmol/L methyl-β-cyclodextrin (black and white squares respectively). Ordinate is contraction expressed as a percentage of the KCl (80 mmol/L)-induced response obtained at the beginning of the experiments. Data are expressed as mean ± SEM. ** means a significant difference for $P < 0.01$. n is the number of IPA rings.

Figure 7

Endothelial cell

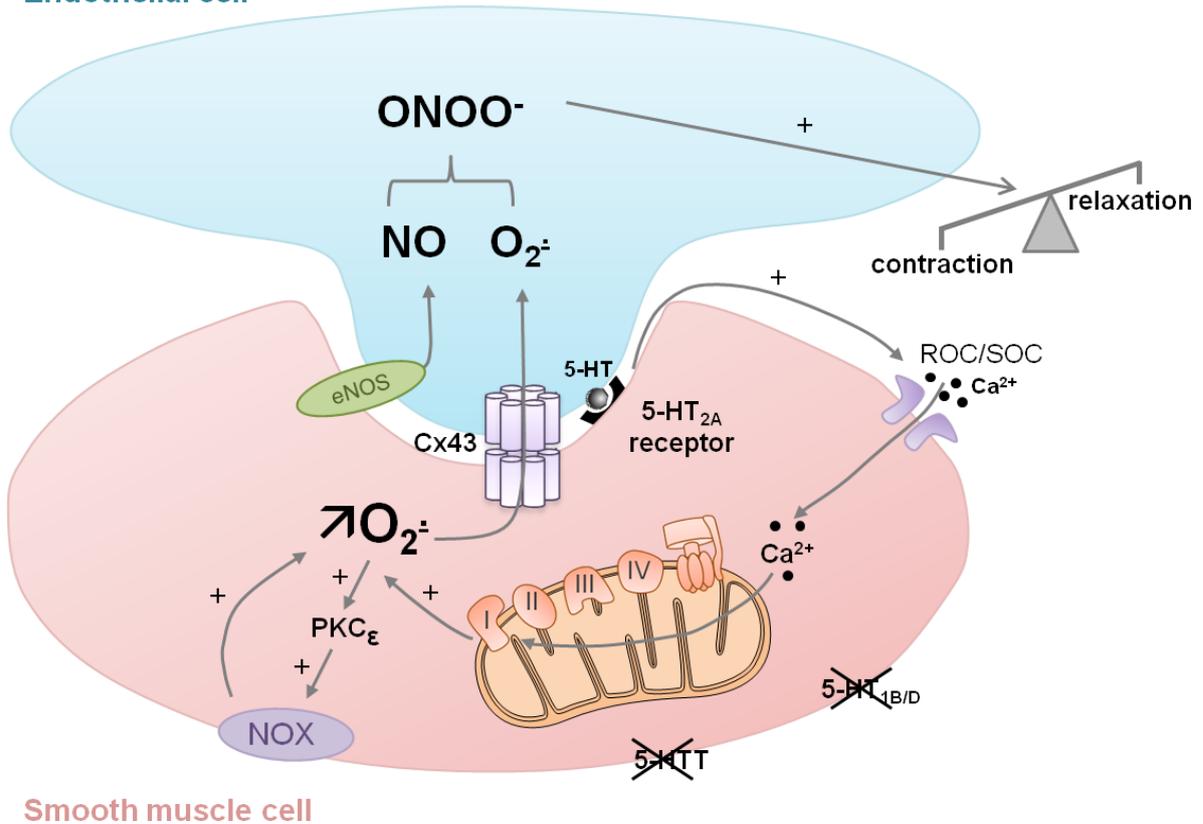


Figure 7. Summary of the signaling pathways involved in the 5-HT-induced $O_2^{\cdot-}$ production. 5-HT produces $O_2^{\cdot-}$ via the complex I of the METC and Nox. Ca^{2+} influx induced by 5-HT increases Ca^{2+} uptake by the mitochondria which stimulates production of mitochondrial $O_2^{\cdot-}$. 5-HT-induced mitochondrial $O_2^{\cdot-}$ activates PKC_{ϵ} which in turn induces $O_2^{\cdot-}$ production by Nox. $O_2^{\cdot-}$ may then pass through MEGJ (Cx43) to decrease the NO bioavailability by the production of $ONOO^-$ and thus reinforce the contractile state of the PA. All this process seems to happen in caveoli.

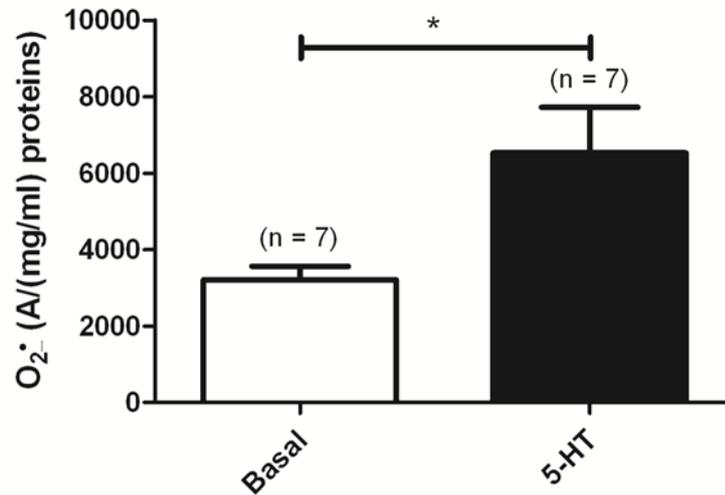
Figure S1

Figure S1. Production of O_2^- by 5-HT in rat aorta. Levels of O_2^- were measured by EPR spectrometry in basal conditions (white column) or in the presence of 5-HT (100 $\mu\text{mol/L}$ black column). Data are expressed as mean \pm SEM. * means a significant difference for $P < 0.05$. n is the number of rats.

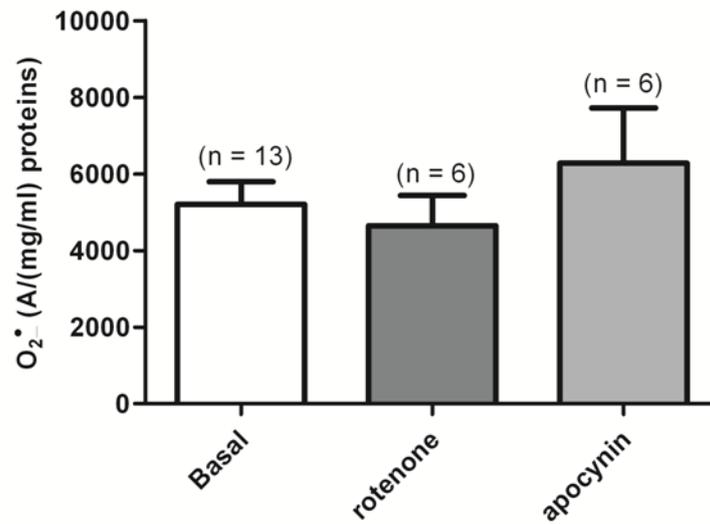
Figure S2

Figure S2. Effects of drugs on the basal O₂⁻ level. Rotenone (5 μmol/L) and apocynin (30 μmol/L) do not have any significant effect on the basal O₂⁻ level in rat IPA. Data are expressed as mean±SEM.n is the number of rats.

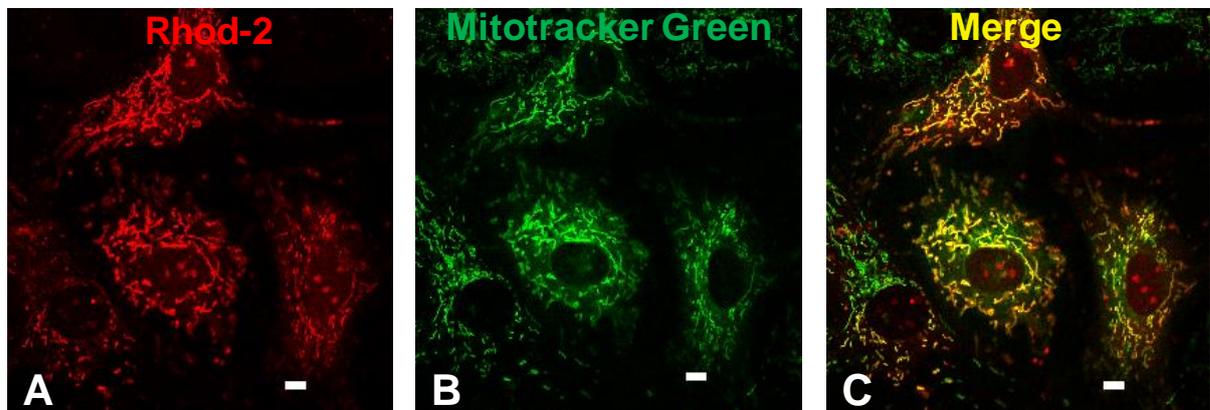
Figure S3

Figure S3. Mitochondrial labelings with fluorescent probes. **A)** and **B)** show PASMC loaded with Rhod-2 (1 $\mu\text{mol/L}$) and mitotracker green (400 nmol/L) respectively. **C)** is the merge of A and B, illustrating colocalization of Rhod-2 and mitotracker green as an index of the mitochondrial network in yellow. Scale bars are 20 μm .

Figure S4

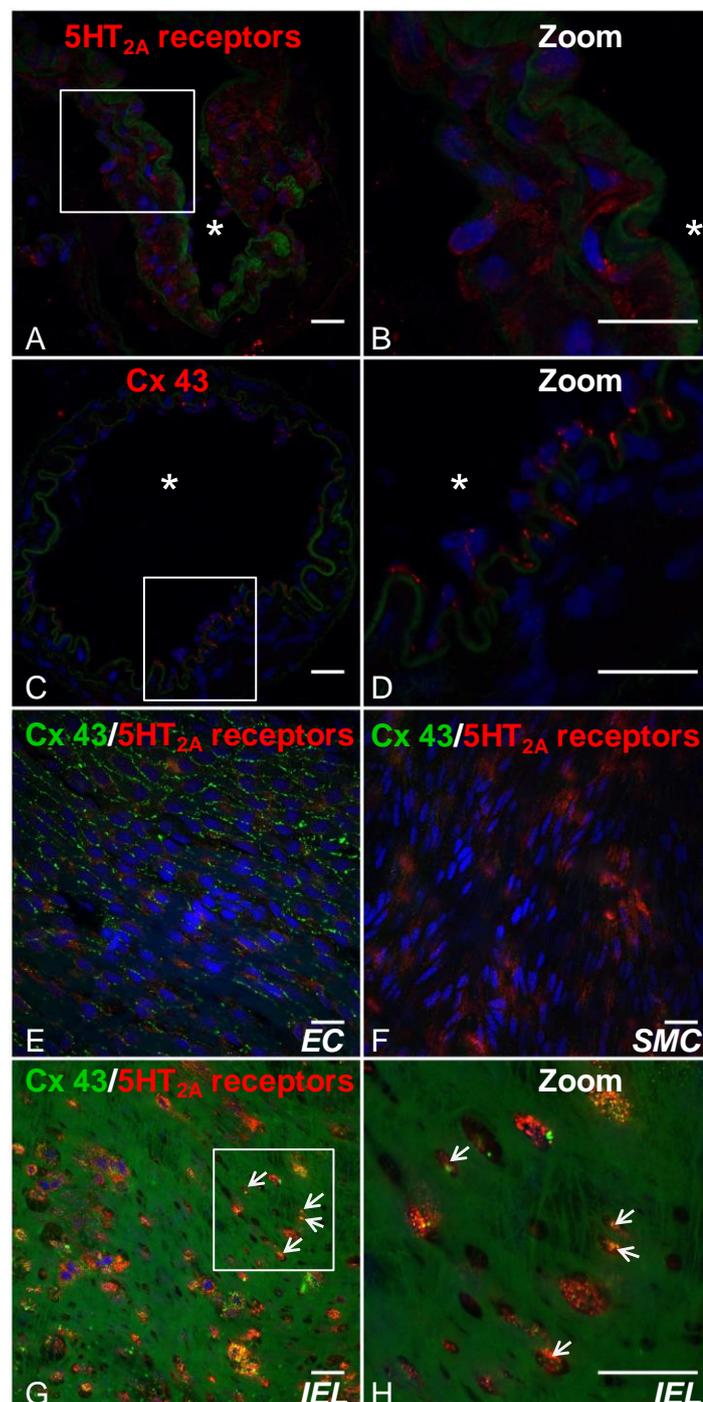


Figure S4. Immuno-localization of 5-HT_{2A} receptors in regard to Cx 43 in rat IPA. **A)** and **C)** are immunofluorescent images of IPA transverse sections labeled for 5-HT_{2A} receptors or Cx 43 (red) respectively. The green color is the autofluorescent signal of the elastic lamina. **B)** and **D)** are the zoom of the framed regions in A and C. **E)** and **F)** are en face views of the endothelial (EC) or smooth muscle cell (SMC) side of opened vessels labeled for Cx 43 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). **G)** en face view of the internal elastic lamina of an opened vessel labeled for Cx 43 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). **H)** zoom of the framed region in G. Nuclei are stained with DAPI (blue) in A, B, C and D and with Hoechst (blue) in E, F, G and H. White arrows indicate some colocalization (yellow) between Cx 43 (green) and 5-HT_{2A} receptors (red). Scale bars are 20 μm. * represents the lumen of the vessel.

I.3 Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis de disséquer la voie de signalisation complète liant la 5-HT à l'augmentation de l' $O_2^{\cdot-}$ dans les AIP de rat. Nos résultats indiquent que la 5-HT agit par le biais des récepteurs 5-HT_{2A} pour induire un influx calcique extracellulaire qui est responsable de l'augmentation de la concentration calcique mitochondriale. Cet événement contribuerait alors à augmenter la production d' $O_2^{\cdot-}$ via le complexe I de la mitochondrie. La 5-HT induit également une diminution de la respiration mitochondriale ainsi qu'une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial.

D'autre part, nous avons montré l'implication des NOX dans l'augmentation de la production d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à la 5-HT. Ainsi, nous proposons que l' $O_2^{\cdot-}$ d'origine mitochondriale active la PKC ϵ puis induit la production d' $O_2^{\cdot-}$ via les NOX.

De plus, nous avons montré que sous l'influence de la 5-HT, l' $O_2^{\cdot-}$ produit dans le muscle lisse réagit avec le NO produit dans l'endothélium pour induire la formation de ONOO \cdot . Cette réaction diminue alors la biodisponibilité du NO vasorelaxant avec, pour conséquence d'induire la potentialisation de la réponse vasoconstrictrice physiologique induite par la 5-HT.

Enfin, nous confirmons : (1) la présence abondante de cavéoles au sein du muscle lisse et de l'endothélium, (2) la communication de l'endothélium avec le muscle lisse adjacent via des protubérances endothéliales ou jonctions myoendothéliales (JME) qui passent à travers des fenêtres présentes au sein des lames élastiques internes et (3) la localisation proche des JME et des cavéoles. A l'aide des études fonctionnelles, nous avons montré que les récepteurs 5-HT_{2A} sont localisés au sein des cavéoles. Ainsi, la colocalisation des récepteurs 5-HT_{2A}, de la Cx43 et de la Cav-1 au sein des fenêtres des lames élastiques internes nous a permis de confirmer que les acteurs de cette voie de signalisation sont présents au sein d'un microdomaine de signalisation.

Le travail précédent a montré que la 5-HT augmente l' O_2^- . Nous nous sommes alors demandé si la production d' O_2^- était spécifique de la 5-HT. Afin de répondre à cette question, nous avons étudié les effets de deux autres agonistes, notamment l'ET-1 et la PHE sur la quantité d' O_2^- dans les AIP de rat. Les résultats de cette étude sont présentés ci-dessous.

II. Effets de l'ET-1 et de la PHE sur la quantité d' O_2^- dans les AIP de rat

II.1 Résultats

1. Production d' O_2^- en réponse aux agonistes dans les AIP de rat

Nos résultats de RPE indiquent que l'ET-1 et la PHE n'induisent pas d'augmentation significative de la quantité d' O_2^- , contrairement à la 5-HT. Ces résultats montrent que l'augmentation d' O_2^- varie d'un agoniste contractant à l'autre (Figure 58).

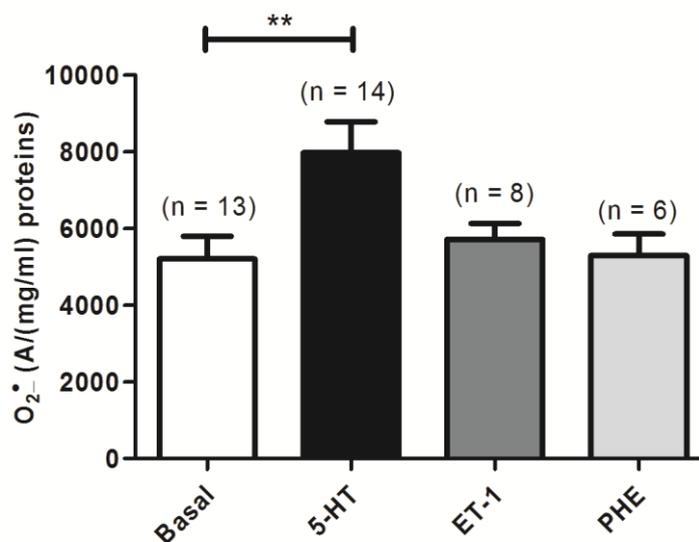


Figure 58: Effet de la 5-HT, de l'ET-1 et de la PHE sur la quantité d' O_2^- mesurée par la RPE.

La quantité d' O_2^- est mesurée par RPE en condition basale (en blanc), ou en présence de 5-HT (100 μ M, en noir) ou d'ET-1 (0,1 μ M, en gris foncé) ou de phényléphrine (PHE) (10 μ M, en gris clair). n représente le nombre de rats.

2. Estimation de la quantité d' O_2^- par mesure des peroxynitrites

Afin de confirmer l'augmentation d' O_2^- par la 5-HT observée en RPE, nous avons quantifié de manière indirecte la quantité d' O_2^- par la mesure des peroxynitrites ($ONOO^-$) à l'aide du réactif de Griess en présence d'ET-1. On observe que l'ET-1 n'a pas d'effet significatif sur la quantité d' $ONOO^-$ (Figure 59). Ainsi, l'augmentation de la quantité d' O_2^- au

niveau des artères pulmonaires de rat en conditions physiologiques serait un mécanisme spécifique à la 5-HT.

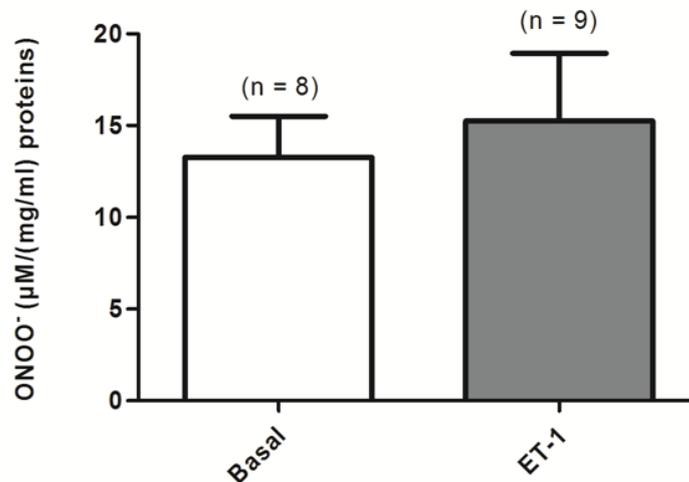


Figure 59: Effet de l'ET-1 (0,1 µM) sur la quantité d'ONOO⁻.

La quantité d'ONOO⁻ est mesurée par le réactif de Griess en condition basale (en blanc), ou en présence d'ET-1 (en gris foncé). n représente le nombre de rats. La quantité d'ONOO⁻ est exprimée en µM/(mg/ml) de protéines.

3. Effets de l'ET-1 et de la PHE par rapport à la 5-HT sur le taux de respiration mitochondriale

Nous avons montré grâce à la première étude que la mitochondrie était impliquée dans la production d'O₂[•] en réponse à la 5-HT. La 5-HT (100 µM) induit également une diminution significative de la respiration basale mitochondriale (Figure 60A). Nous avons donc étudié le rôle de l'ET-1 et de la PHE sur le taux de respiration mitochondriale des CML d'AIP. Les résultats indiquent que l'ET-1 (100 nM) et la PHE (10 µM) induisent des inhibitions moindres de la respiration basale (29,65 ± 7.60 % et 23,80 ± 4.89 % respectivement) que la 5-HT (100 µM) qui induit une forte inhibition de 66,58 ± 4.95 % de la respiration basale (Figure 60D).

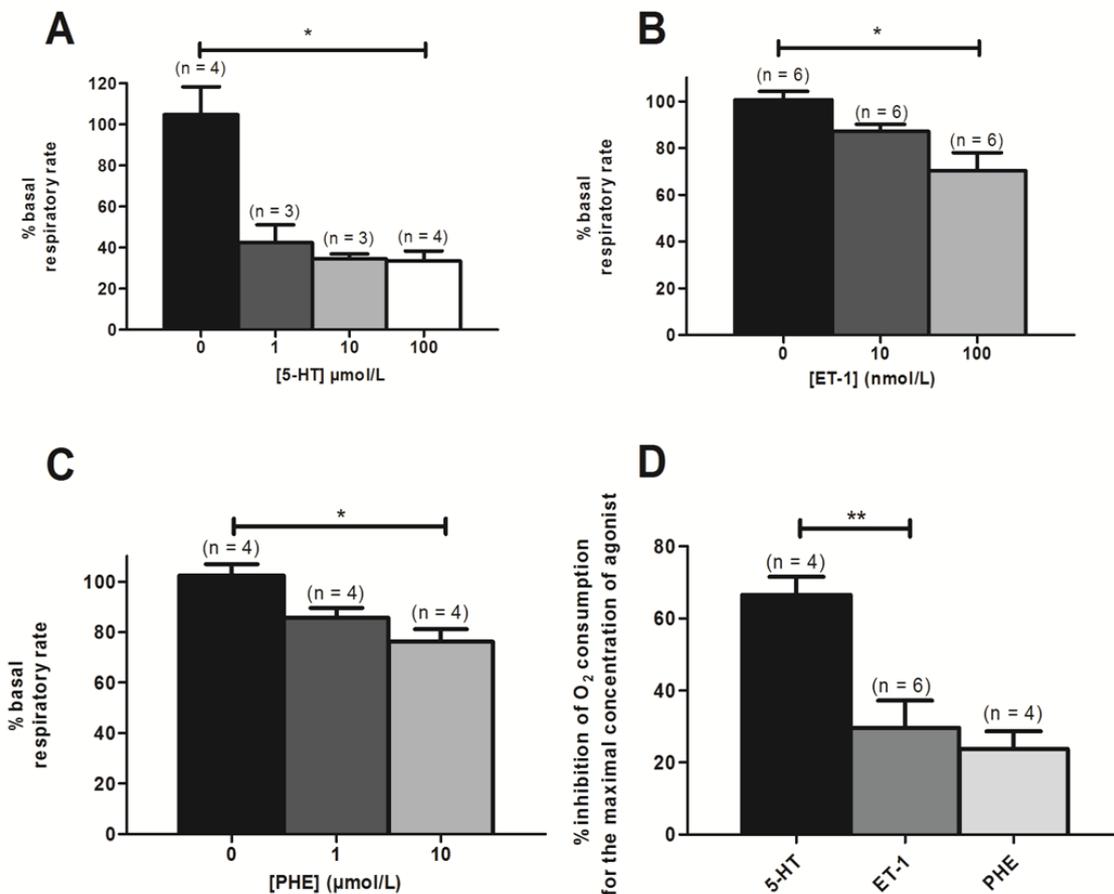


Figure 60: Respiration mitochondriale en réponse à la 5-HT, à l'ET-1 et à la PHE au niveau des cellules musculaires lisses d'AIP (CML-AIP).

(A), (B) et (C) illustrent l'activité mitochondriale exprimée en % du taux de respiration basale en réponse à des doses cumulatives de 5-HT (1 à 100 μM), d'ET-1 (10 à 100 nM) ou de PHE (1 à 10 μM) respectivement. (D) indique le % d'inhibition de la consommation d'O₂ en réponse à la 5-HT (100 μM), à l'ET-1 (100 nM) et à la PHE (10 μM).

4. Effet de l'ET-1 par rapport à la 5-HT sur le potentiel de membrane mitochondrial

Les résultats précédents montrent que le % d'inhibition de la consommation d'O₂ induit par la 5-HT (100 μM) est significativement supérieur à celui induit par l'ET-1 (100 nM) (Figure 60D). Ainsi, afin d'évaluer si la consommation d'O₂ dans les CML d'AIP modifie le potentiel mitochondrial de repos, nous avons comparé l'effet de l'ET-1 (100 nM) par rapport à la 5-HT (100 μM) sur le potentiel mitochondrial à l'aide de la sonde TMRM (tétraméthylrhodamine methyl ester) (Figure 61). De la même manière que la 5-HT, l'ET-1 induit une dépolarisation transitoire de la membrane interne mitochondriale. Cependant l'ET-1 dépolarise de façon moins importante la mitochondrie par rapport à la 5-HT car l'aire sous la courbe en réponse à l'ET-1 est significativement inférieure à celle de la 5-HT (Figure 61).

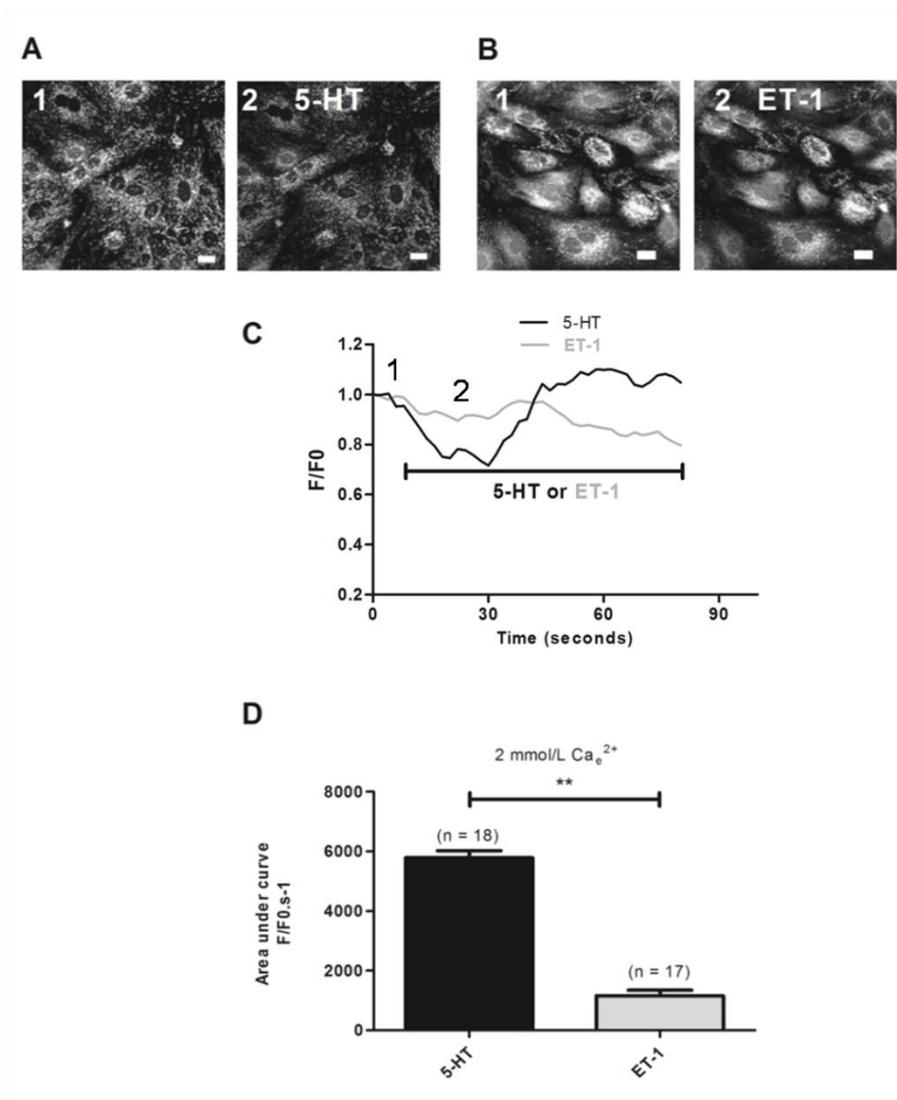


Figure 61: Comparaison de l'effet de la 5-HT et de l'ET-1 sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les CML-d'AIP.

Les images 1 et 2 représentent respectivement la densité de fluorescence mitochondriale avant et après l'application de la 5-HT (100 μ M) en **A** et de l'ET-1 (100 nM) en **B**. F/F0 correspond au ratio des valeurs de fluorescence (F) sur la fluorescence basale (F0) qui est la valeur de fluorescence avant application de l'agoniste. **(C)** correspond aux tracés typiques des potentiels membranaires mitochondriaux en réponse à la 5-HT (100 μ M, ligne noire) et à l'ET-1 (100 nM, ligne grise). 1 et 2 représentent les valeurs de F/F0 pour les images A et B respectivement. **(D)** correspond aux valeurs moyennes des variations du potentiel membranaire mitochondrial exprimées en fonction de l'aire sous la courbe en réponse à la 5-HT (100 μ M, en noir) et à l'ET-1 (100 nM, en gris). L'aire sous la courbe est calculée sur les 45 premières secondes de stimulation. La barre d'échelle correspond à 20 μ m pour les images A et B.

5. Effet de l'ET-1 par rapport à la 5-HT sur la concentration calcique cytosolique et mitochondriale

Étant donné que l'ET-1 dépolarise la mitochondrie, nous avons ensuite étudié l'effet de l'ET-1 sur la quantité de Ca²⁺ mitochondrial en mesurant de manière simultanée le calcium cytosolique et mitochondrial en réponse à l'ET-1. Les tracés obtenus avec l'ET-1 ont été superposés aux tracés en réponse à la 5-HT pour comparaison (Figure 62).

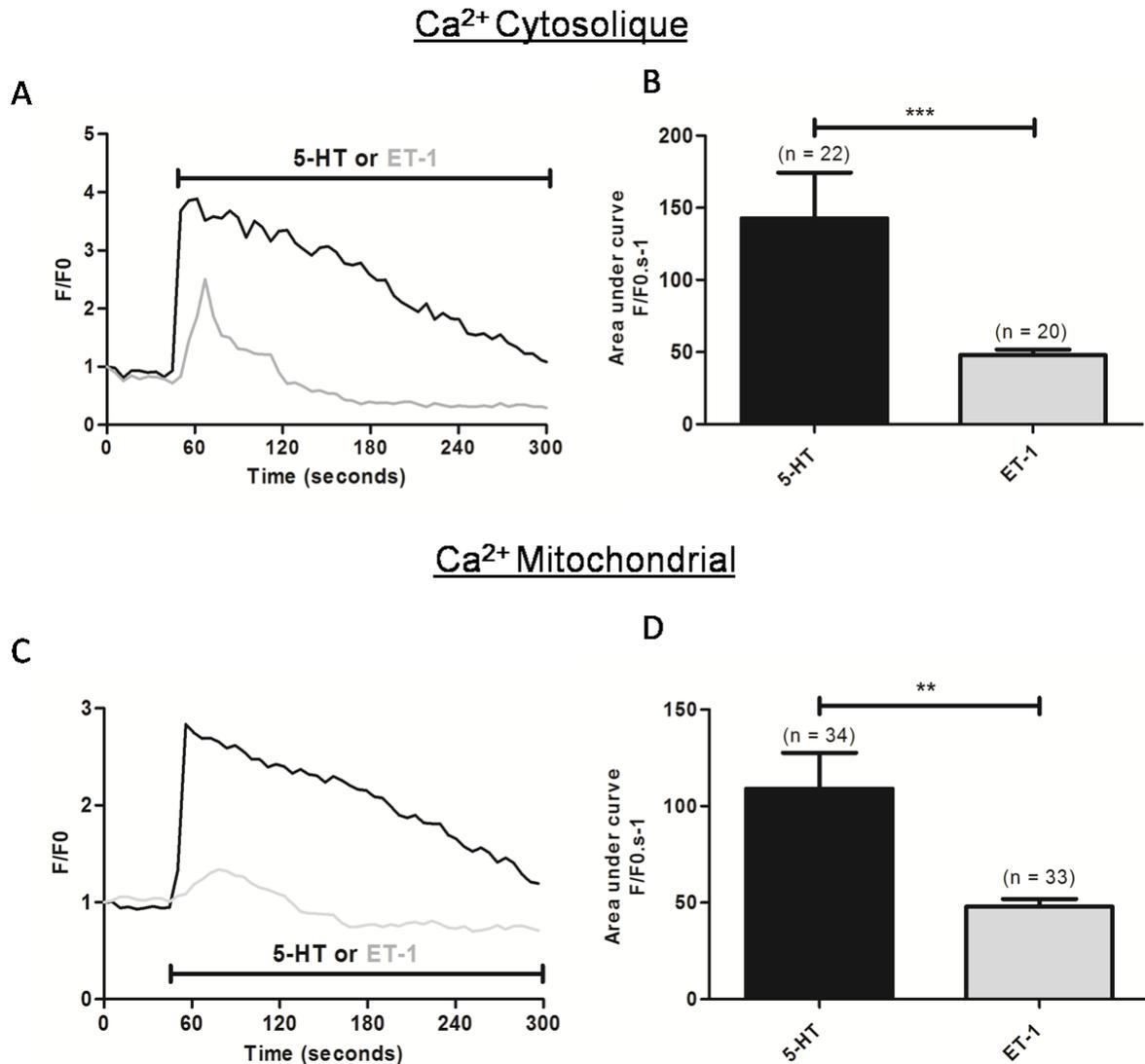


Figure 62: Effet de l'ET-1 comparé à celui de la 5-HT sur la quantité de Ca²⁺ cytosolique et mitochondrial dans les CML d'AIP.

(A) et (C) tracés typiques de l'augmentation de la quantité de Ca²⁺ cytosolique et mitochondrial en réponse à la 5-HT (100 µM, en noir) et à l'ET-1 (100 nM, en gris). (B) et (D) Histogrammes représentant l'aire sous les courbes pour le Ca²⁺ cytosolique et mitochondrial respectivement en réponse à la 5-HT (100 µM, en noir) et à l'ET-1 (100 nM, en gris). Les résultats sont exprimés en F/F₀.s⁻¹ sur les 45 premières secondes.

Les résultats indiquent que les augmentations du Ca^{2+} cytosolique et mitochondrial en réponse à l'ET-1 sont significativement inférieures par rapport aux augmentations induites par la 5-HT.

6. Localisation des récepteurs ET_B et α_{1D} dans la paroi des AIP de rat

On a ensuite posé l'hypothèse que les différences de production d' $\text{O}_2^{\cdot -}$ en réponse à l'ET-1 et à la PHE proviennent des différences de localisation de leurs récepteurs respectifs. On a alors réalisé des études d'immunofluorescence afin de déterminer les localisations des récepteurs ET_B et α_{1D} qui sont les récepteurs à l'ET-1 et à la PHE respectivement ([Figure 63](#) et [Figure 64](#) respectivement).

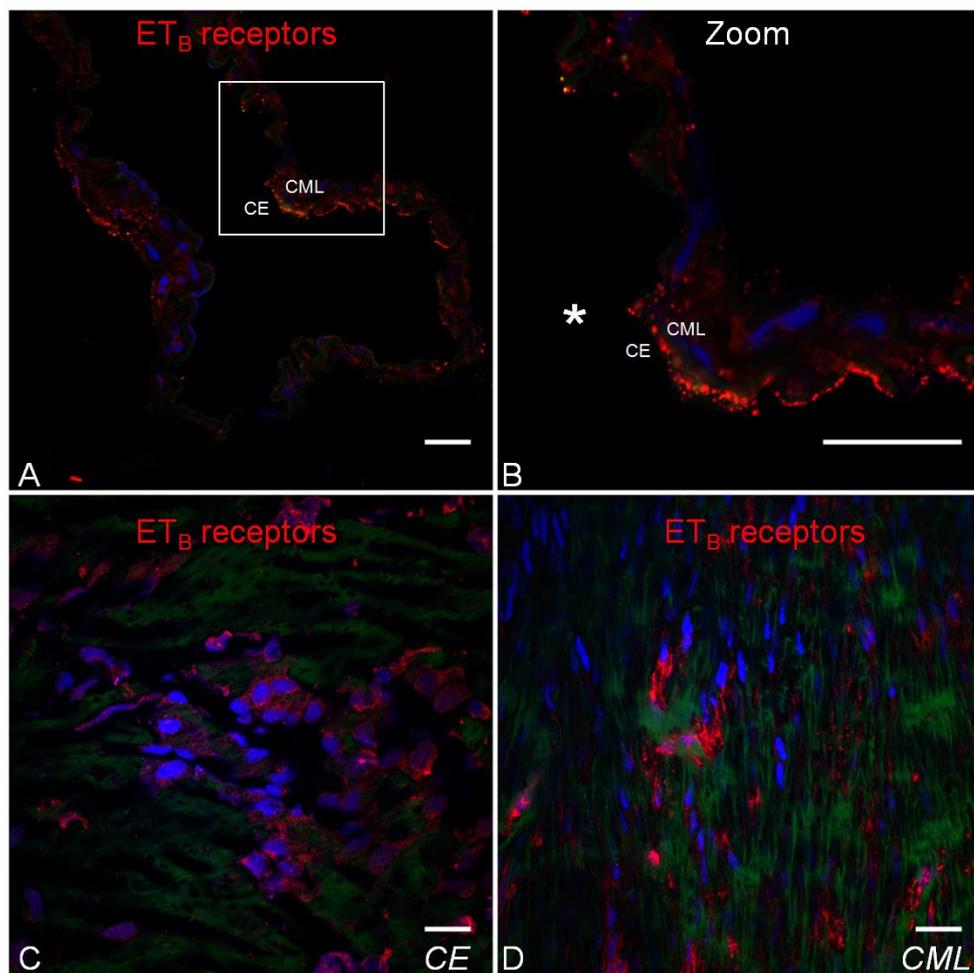


Figure 63: Expression des récepteurs ET_B (R- ET_B) dans la paroi des AIP de rat.

(A) Image d'immunofluorescence d'une coupe transversale d'AIP marquée pour les R- ET_B (rouge). (B) correspond au zoom de la région encadrée en A. (C) et (D) sont des vues « en face » des CE ou des CML respectivement des vaisseaux ouverts marqués pour les R- ET_B . Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) en A et B et au Hoechst (bleu) en C et D. La barre représente une distance de 20 μm . * représente la lumière du vaisseau. CML : cellule musculaire lisse, CE : cellule endothéliale.

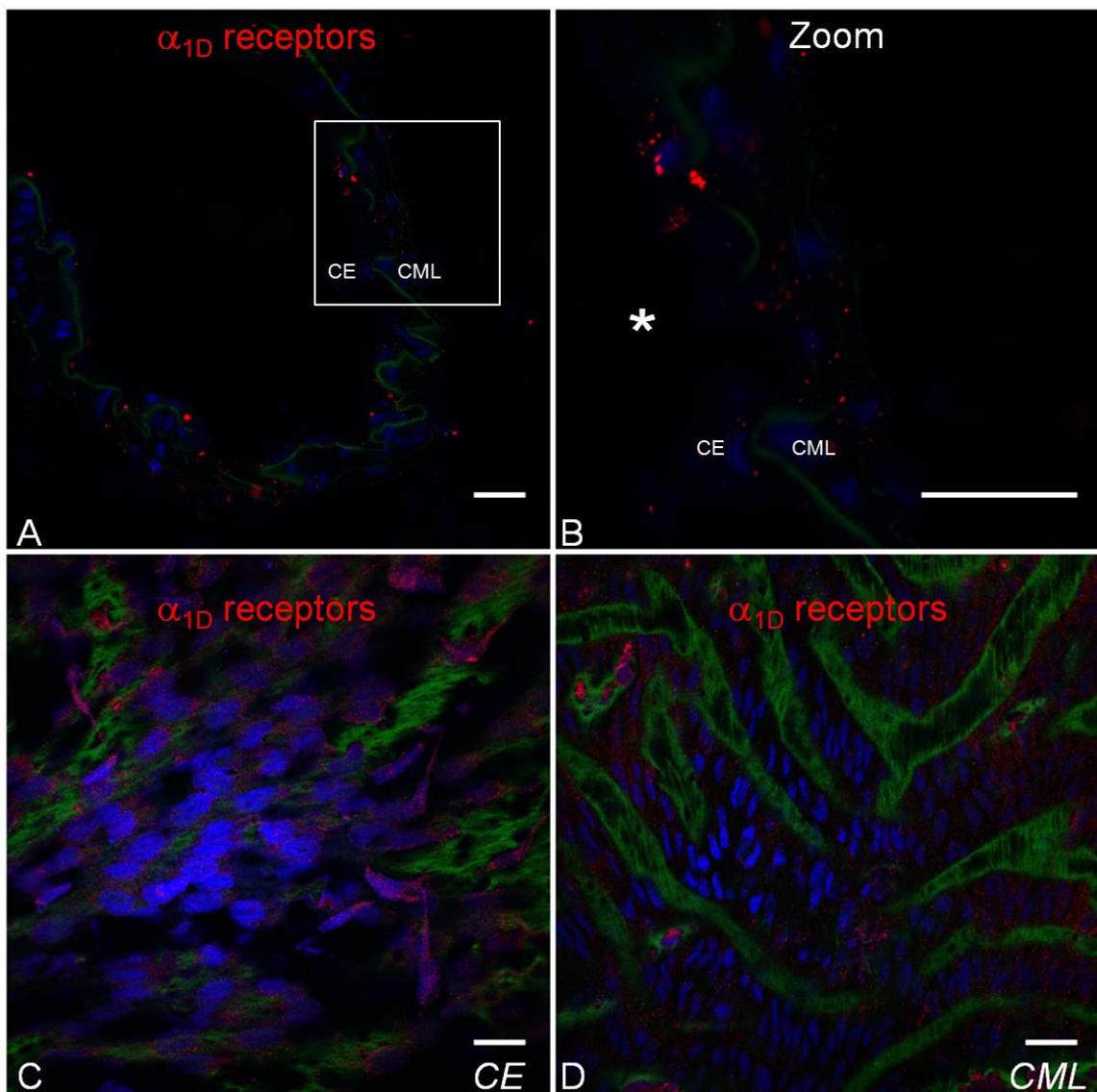


Figure 64: Expression des récepteurs α_{1D} (R- α_{1D}) dans la paroi des AIP de rat.

(A) Image d'immunofluorescence d'une coupe transversale d'AIP marquée pour les R- α_{1D} (rouge). L'autofluorescence de la lame élastique interne (vert) permet de délimiter les CML des CE. (B) correspond au zoom de la région encadrée en A. (C) et (D) sont des vues « en face » des CE ou des CML des vaisseaux ouverts marqués pour les R- α_{1D} . Les noyaux sont marqués au DAPI (bleu) en A et B et au Hoechst (bleu) en C et D. La barre représente une distance de 20 μm . * représente la lumière du vaisseau. CML : cellule musculaire lisse, CE : cellule endothéliale.

Les expériences d'immunofluorescence sur coupes transversales d'AIP ainsi que les vues « en face » montrent que l'expression des R-ET_B et R- α_{1D} est retrouvée à la fois au niveau des CML et des CE de la paroi vasculaire.

Les résultats observés sur la distribution des R-ET_B au niveau des AIP de rat est en accord avec les résultats obtenus par Soma et collaborateurs en 1999 (Soma, Takahashi *et al.*, 1999). Ces auteurs ont décrit par la technique d'immunohistologie, la présence des R-ET_B au niveau de la média et de l'intima des artères pulmonaires sur des coupes de poumon entier (Soma, Takahashi *et al.*, 1999). Notre étude montre également par immunofluorescence, la localisation des R-ET_B sur les CML et sur les CE des coupes d'AIP isolées du poumon entier. En ce qui concerne les R- α_{1D} aucune étude n'a encore montré leur localisation au niveau de la paroi artérielle des AIP de rat par immunofluorescence. Toutefois, nos observations sont cohérentes avec les données de la littérature indiquant que la PHE agit au niveau des R- α_{1D} des CE et des CML pulmonaires pour moduler l'état contractile des artères pulmonaires (Hussain and Marshall 1997).

7. Rôle fonctionnel des cavéoles dans les réponses contractiles induites par l'ET-1 et à la PHE

Notre précédente étude a montré que la destruction des cavéoles à l'aide de la méthyl- β -cyclodextrine induit une diminution de $53 \pm 5,3$ % de la réponse contractile induite par la 5-HT. De plus, les expériences d'immunofluorescence « en face » de la précédente étude ont montré la colocalisation des R-5-HT_{2A} avec la Cav-1 et la Cx43 dans les fenêtres des lames élastiques internes. Ces résultats montrent donc que la voie de signalisation de l'augmentation d'O₂[•] en réponse à la 5-HT pourrait avoir lieu au sein d'un microdomaine de signalisation, notamment les cavéoles.

Afin de poursuivre nos interrogations sur l'absence d'augmentation d'O₂[•] en réponse à l'ET-1 et à la PHE, nous nous sommes demandé si les voies de signalisation des R-ET_B et des R- α_{1D} sont également dépendantes des cavéoles. Nous avons alors déterminé le rôle fonctionnel des cavéoles dans les réponses contractiles induites par l'ET-1 et par la PHE (Figure 65).

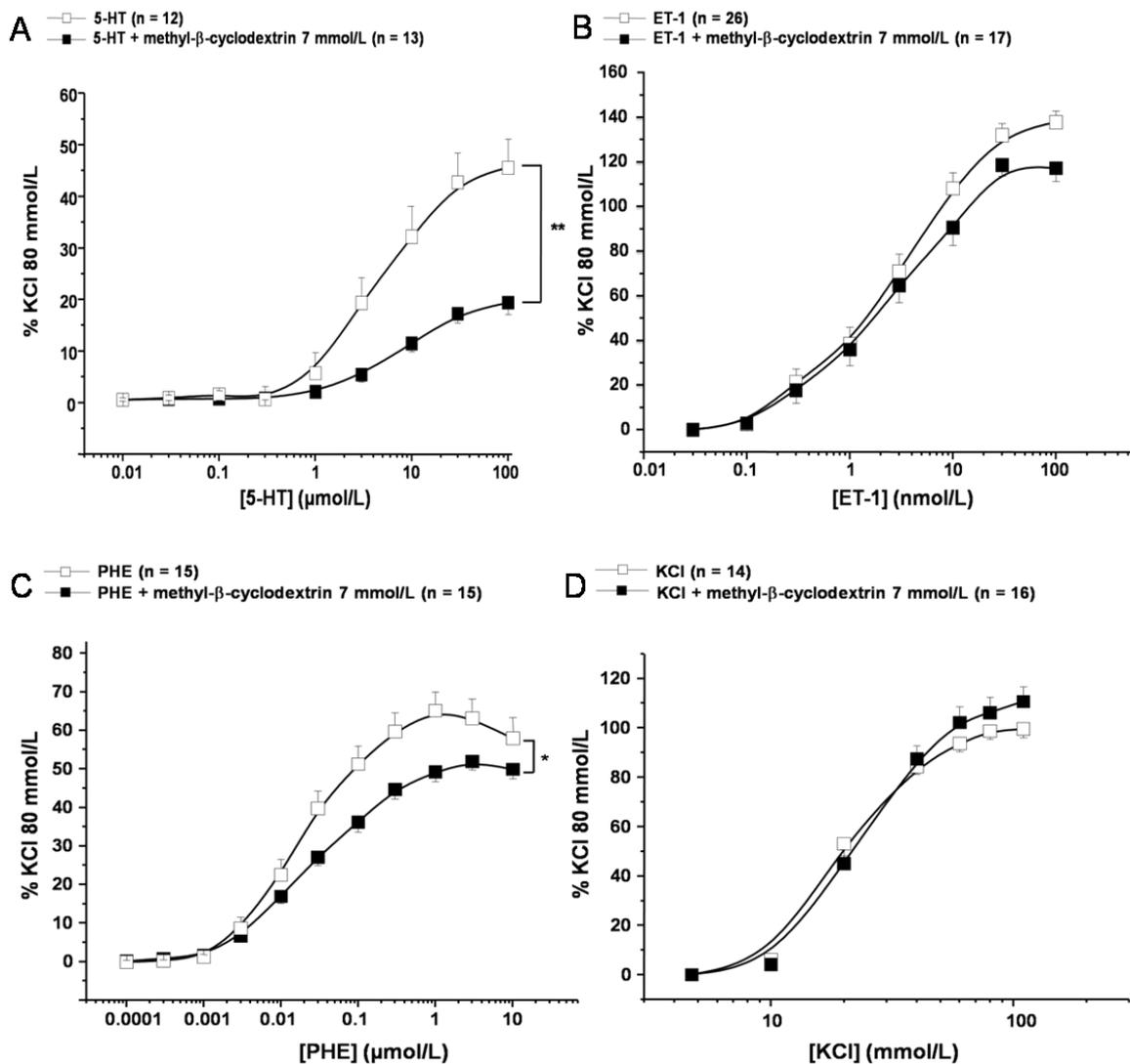


Figure 65: Effet du destructeur des cavéoles, le méthyl-β-cyclodextrine (MβCD) sur la contraction à l'ET-1 et à la PHE.

(A) et (B) sont des courbes de réponses à des concentrations cumulées (CCRC) d'ET-1 (0,03 à 100 nmol/L) et de PHE (0,0001 à 10 μmol/L) en présence (carré noir) ou en absence du MβCD (7 mmol/L) (carré blanc). Chaque valeur représente une valeur moyenne ± écart-type de la moyenne. * et ** indiquent une différence significative avec $P < 0,05$ et $P < 0,01$ respectivement.

Nous observons que la destruction des radeaux lipidiques contenus dans les cavéoles avec du MβCD ne produit aucun effet sur la réponse contractile induite par l'ET-1. En revanche, la réponse contractile maximale induite par la PHE est inhibée de $18 \pm 6,8$ %. Ainsi, ces résultats indiquent que les cavéoles sont fortement impliquées dans la réponse contractile à la 5-HT (inhibition de $53 \pm 5,3$ %), interviennent dans une moindre mesure dans la réponse induite par la PHE (inhibition de $18 \pm 6,8$ %) et n'ont aucun effet sur la contraction à l'ET-1.

II.2 Discussion

Ces résultats couplés à la première étude ont mis en évidence que la production d' $O_2^{\cdot-}$ et d' $ONOO^-$ dans les AIP de rat est un phénomène spécifique de la 5-HT. Les études se focalisant sur le rôle de la mitochondrie dans l'augmentation de l' $O_2^{\cdot-}$ ont montré que la 5-HT, l'ET-1 et la PHE induisent des inhibitions significatives de la consommation en O_2 mitochondrial. Cependant, la 5-HT induit une inhibition plus élevée du pourcentage de la consommation en O_2 par rapport à l'ET-1 et la PHE. D'autre part, l'ET-1 dépolarise de manière moindre la membrane interne mitochondriale par rapport à la 5-HT. Bien que l'ET-1 augmente les concentrations calciques cytosoliques et mitochondriales, ces augmentations restent inférieures à celles induites par la 5-HT.

Notre première étude a montré qu'en réponse à la 5-HT, le calcium cytosolique est augmenté et il est capté par la mitochondrie. Cette augmentation de la concentration calcique mitochondriale ($[Ca^{2+}]_m$) en réponse à la 5-HT induit alors la production d' $O_2^{\cdot-}$ par le complexe I de la mitochondrie. Ce résultat nous laisse penser que : (1) l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_m$ en réponse à l'ET-1 ne serait pas suffisante pour stimuler la production d' $O_2^{\cdot-}$ par la chaîne respiratoire mitochondriale et/ou (2) la signalisation calcique mise en jeu par les R-ET_B serait différente de celle induite par la 5-HT. En effet, une étude réalisée par Kinear et collaborateurs a montré que l'ET-1 induit une production de NAADP (« Nicotinic Acid Adenine Dinucleotide Phosphate ») au niveau des artères pulmonaires. Le NAADP induit par la suite une libération du calcium provenant des lysosomes (Kinear, Boittin *et al.*, 2004). Cette faible quantité de calcium activerait les récepteurs de la ryanodine du RS, induisant une libération calcique réticulaire. De plus, Hyvelin et collaborateurs ont montré que l'ET-1 active une réponse calcique oscillante faisant intervenir les récepteurs à l'inositol tri phosphate (R-IP₃) du réticulum sarcoplasmique. Le calcium serait alors mobilisé pour induire la contraction des AIP mais induit également l'activation d'un courant chlore oscillant qui dépolarise la membrane plasmique et active des canaux calciques dépendants du potentiel et ceci indépendamment de la production d' $O_2^{\cdot-}$ (Hyvelin, Guibert *et al.*, 1998). En revanche, l'activation des R-5HT_{2A} est couplée à la production d'inositol tri phosphate (IP₃) et de diacylglycérol (DAG). L'IP₃ active alors les R-IP₃ du RS et provoque ainsi une sortie de calcium réticulaire et le DAG active des canaux calciques indépendants du potentiel (ROC/SOC) de la membrane plasmique pour induire un influx calcique. De plus, il a été montré par Cogolludo et collaborateurs que la 5-HT inhibe les canaux K⁺ dépendants du potentiel des CML d'artères pulmonaires (Cogolludo, Moreno *et al.*, 2006). Cette différence de la signalisation calcique activée par l'ET-1 par rapport à celle mise en jeu par la 5-HT pourrait expliquer la différence observée sur la production d' $O_2^{\cdot-}$.

D'autre part, nos études d'immunofluorescences sur coupes d'artères et sur des AIP « en face » nous ont permis de localiser les R-ET_B et les R- α_{1D} à la fois au niveau des CE et des CML de la paroi artérielle des AIP. La caractérisation du rôle fonctionnel des cavéoles

dans les signalisations induites par l'ET-1 et la PHE ont montré que les cavéoles ne sont pas impliquées dans la réponse contractile induite par l'ET-1. Cependant, les cavéoles interviennent dans une moindre mesure dans la contraction en réponse à la PHE par rapport à la 5-HT. L' $O_2^{\cdot-}$ est une espèce très réactive avec une demi-vie très courte, ainsi sa production au sein d'un microdomaine de signalisation permettrait son interaction avec le NO endothélial avant même qu'il ait le temps d'être dégradé ou d'interagir avec d'autres molécules au sein du muscle lisse.

De plus, cette étude est intéressante du fait qu'elle soit spécifique à la 5-HT, or la concentration et la réponse contractile à la 5-HT sont augmentées dans l'HTP (Rodat, Savineau *et al.*, 2007 ; Dempsie and MacLean 2008). Ainsi l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant uniquement la voie de signalisation induite par la 5-HT peut éviter des effets secondaires sur d'autres voies vasoconstrictrices de la circulation pulmonaire.

II.3 Conclusion

Cette étude a mis en évidence la spécificité de la 5-HT dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ par rapport aux autres agonistes vasoconstricteurs (ET-1 et PHE) de la circulation pulmonaire. De plus, la mitochondrie est impliquée dans la production d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à la 5-HT, ce qui participe à l'augmentation de la contraction des AIP de rat en conditions physiologiques. Comme la production des espèces réactives dérivées de l'oxygène, notamment l' $O_2^{\cdot-}$ est augmentée dans de nombreuses pathologies cardiovasculaires telles que l'athérosclérose, l'hypertension artérielle systémique et pulmonaire, la compréhension de cette voie de signalisation pourrait aider à l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant la 5-HT dans l'HTP.

II.4 Perspectives

Pour compléter cette deuxième étude, des expériences de mesure de la quantité d' $ONOO^-$ en réponse à la PHE nous permettront de confirmer le rôle spécifique de la 5-HT dans la production d' $ONOO^-$. Le nombre de n pour la respiration mitochondriale en réponse à la PHE devrait être également augmenté. De plus, il serait important de mesurer sur les CML d'AIP les concentrations calciques cytosoliques et mitochondriales en réponse à la PHE à l'aide des sondes Fluo-4 et Rhod-2 respectivement. D'autre part, il serait intéressant de regarder par des études d'immunofluorescence « en face » la localisation des R-ET_B et R- α 1D par rapport à la Cav-1. Ce qui nous permettra de savoir si les R-ET_B et R- α 1D colocalisent au sein des fenêtres des lames élastiques internes avec la Cav-1 et donc sont présents au sein d'un microdomaine de signalisation. De plus, il serait important de confirmer les expériences de colocalisation des R-ET_B et R- α 1D avec la Cav-1 par des études d'interactions directes telles que la co-immunoprécipitation, la « proximity ligase assay » (PLA) (Weibrecht, Leuchowius *et al.*, 2010) et l'hybridation in situ.

III. Rôle de la Cx43 dans la paroi artérielle pulmonaire de souris : implications dans l'HTP hypoxique chronique

Des études antérieures réalisées chez le rat sain au laboratoire, ont mis en évidence que la Cx43 intervient dans la réponse contractile induite par la 5-HT (Billaud, Marthan *et al.*, 2009 ; Billaud, Dahan *et al.*, 2011). De plus, l'expression de l'ARNm et protéique de la Cx43 sont augmentées chez le rat HTP hypoxique chronique (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Par ailleurs, les résultats de vasoréactivité à la 5-HT obtenus chez le rat sont essentiellement basés sur des études pharmacologiques via l'utilisation des peptides inhibiteurs des Cx43 (⁴³Gap 26 ou ³⁷⁻⁴³Gap 27).

Actuellement, aucune étude n'a été menée sur le **rôle de la Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et pathologique de souris**. Ainsi, à l'aide d'un modèle de souris hétérozygote déficiente pour la Cx43 (souris Cx43^{+/-}), la souris homozygote Cx43^{-/-} étant létale, nous avons évalué le rôle des Cx43 au niveau de la circulation pulmonaire de souris saine et souffrant d'HTP hypoxique chronique. Notre modèle de souris Cx43^{+/-} est approprié à notre étude car il nous permet d'étudier l'effet d'une délétion partielle de la Cx43 sur la circulation pulmonaire et le cœur. En effet, l'insuffisance cardiaque droite consécutive à l'hypertrophie ventriculaire droite demeure la cause principale du décès des patients souffrant d'HTP hypoxique chronique, il est donc important d'étudier le rôle de la Cx43 au niveau cardiaque.

III.1 Résultats

1. Expression et localisation de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}

Afin de valider notre modèle de souris Cx43^{+/-}, nous avons vérifié par Western blot le % de diminution de l'expression de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/-} par rapport aux AIP de souris Cx43^{+/+}. Nos résultats montrent une diminution de 49,4 % de l'expression de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-} (Figure 66A et B). Des études antérieures réalisées sur des cellules ostéoblastiques (OB) de calvaria de souris Cx43^{+/-} montrent également une diminution de 50 % de l'expression de la Cx43 par rapport aux cellules OB issues de souris Cx43^{+/+} (Geneau, Defamie *et al.*, 2007).

Nous avons ensuite regardé par immunofluorescence sur des coupes transversales d'AIP la localisation de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}. Les images d'immunofluorescences montrent une expression de la Cx43 au niveau des CE et des CML des AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} (Figure 66C). Néanmoins, l'expression de la Cx43 est plus faible chez les souris Cx43^{+/-}, confirmant ainsi les résultats protéiques. On valide ainsi notre modèle de souris Cx43^{+/-}. Cependant, le nombre de n étant faible, ces résultats restent à confirmer.

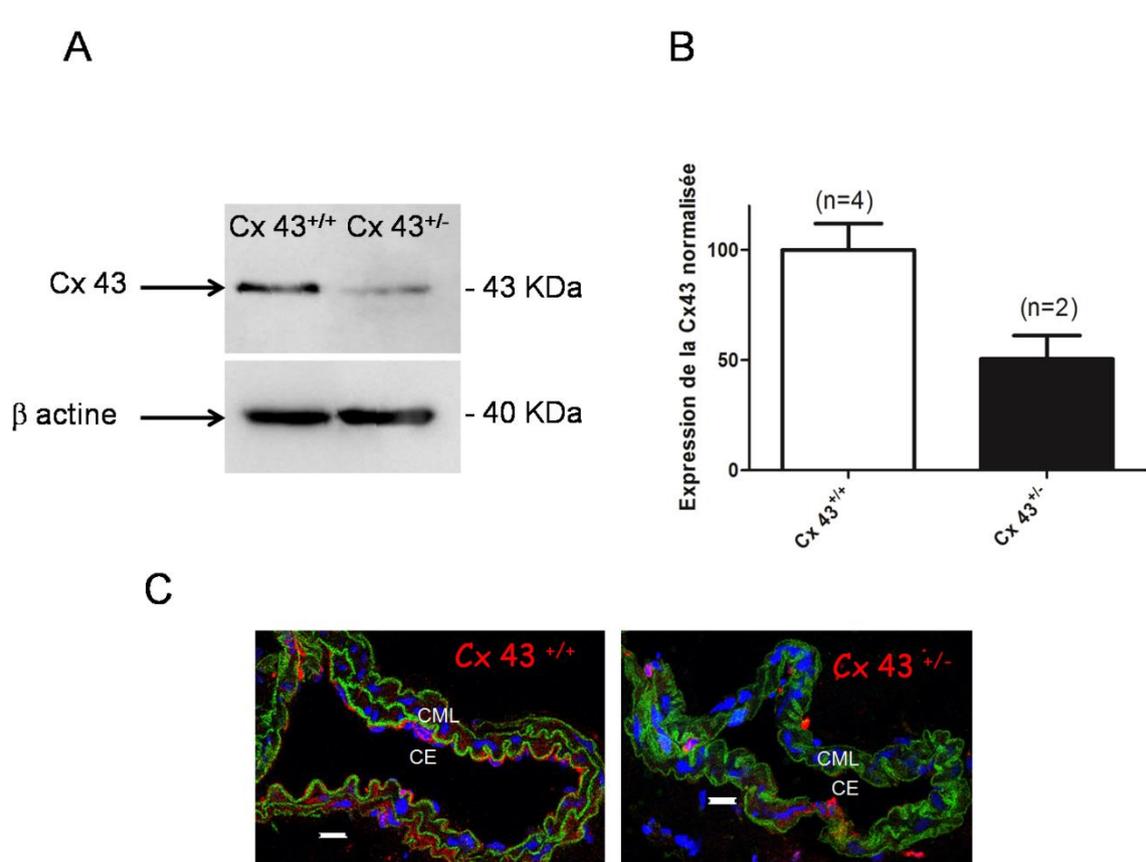


Figure 66: Expression et localisation de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} vs les souris Cx43^{+/-}.

(A) Analyse par Western blot du taux d'expression de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}. (B) Analyse densitométrique normalisée des Western Blot montrant une diminution de 49,4 % de la quantité protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/-} par rapport aux souris Cx43^{+/+}. (C) Localisation des Cx43 (en rouge) dans les AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}. Les noyaux sont marqués en bleu (DAPI), la couleur verte correspond à l'autofluorescence des lames élastiques. L'échelle représente 15 µm.

CE : cellule endothéliale. CML : cellule musculaire lisse

Nous avons ensuite procédé à l'étude du rôle de la Cx43 dans les AIP des souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en conditions physiologiques et souffrant d'HTP hypoxique chronique.

2. Mise en place de l'HTP chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}

2.1) Pression ventriculaire droite systolique et rapport de Fulton

Dans un premier temps, la mise en place de l'HTP a été vérifiée par : (1) la mesure de la pression ventriculaire droite systolique (PVDs) par cathétérisme cardiaque droit (Figure 67A) et (2) le rapport de Fulton (Figure 67B). Le rapport de Fulton constitue un indice d'hypertrophie ventriculaire droite consécutive au développement de l'HTP. Il se mesure par la variation du poids du ventricule droit (VD) sur le poids du ventricule gauche avec le septum (VG + S). Ces mesures sont réalisées dans deux conditions : normoxique et

hypoxique chronique (HC) chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}. Nous avons également étudié le poids corporel et le rythme cardiaque des animaux dans chacune des conditions testées (Figure 67).

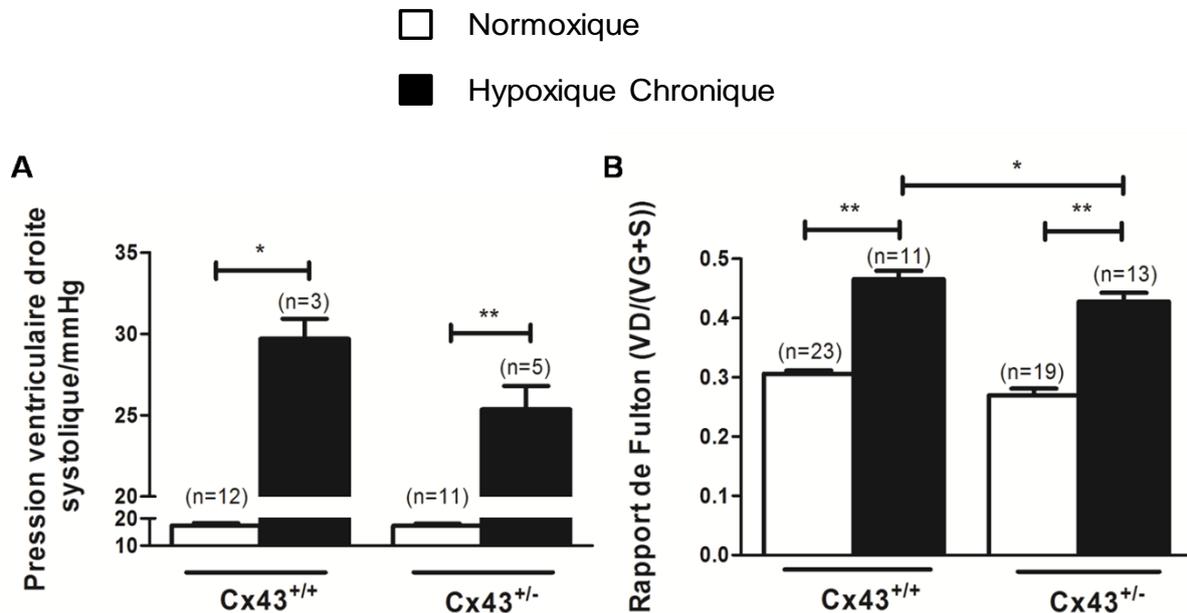


Figure 67: Valeurs des pressions ventriculaires droites systoliques (A) et des rapports de Fulton (B) chez les différents groupes de souris étudiées.

Cx 43^{+/+} et Cx 43^{+/-} correspondent aux souris sauvages et hétérozygotes respectivement. Les colonnes blanches et noires correspondent aux conditions normoxique et hypoxique chronique respectivement. * et ** indiquent des différences significatives pour $P < 0,05$ et $P < 0,01$ respectivement.

On observe que les PVDs sont significativement augmentées chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} qui ont été soumises à trois semaines d'hypoxie (souris hypoxiques chroniques) par rapport aux souris normoxiques (Figure 67A). Concernant l'hypertrophie ventriculaire droite, les rapports de Fulton des souris Cx 43^{+/+} et Cx 43^{+/-} HC sont significativement augmentés par rapport aux souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} normoxiques (Figure 67B). Ces résultats valident notre modèle d'HTP hypoxique chronique.

Par ailleurs, de manière intéressante, chez les souris hypoxiques chroniques (HC), on observe une augmentation moindre des PVDs chez la souris Cx43^{+/-} par rapport à la souris Cx43^{+/+} ($29,69 \pm 1,22$ (n=3) vs $25,36 \pm 1,44$ (n=5)) (Figure 67A). Il serait donc intéressant d'augmenter le nombre de n pour voir si ces résultats se confirment et deviennent significatifs. D'autre part, les valeurs des PVDs obtenues chez les souris Cx 43^{+/+} et Cx 43^{+/-} en condition normoxique ne sont pas significativement différentes. Ces résultats indiquent que la délétion partielle de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-} normoxiques n'influence pas la PVDs.

Concernant l'hypertrophie ventriculaire droite, la délétion partielle de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-} HC n'inhibe pas le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite consécutive à l'HTP hypoxique chronique (Figure 67B). Cependant, chez les souris Cx43^{+/-} HC, l'hypertrophie ventriculaire droite est significativement inférieure par rapport aux souris Cx43^{+/+}HC. Ainsi, l'absence partielle de Cx43 semble freiner le développement de l'hypertrophie ventriculaire droite induite par l'hypoxie chronique.

On en déduit alors que la Cx43 intervient dans l'hypertrophie ventriculaire droite induite par l'hypoxie chronique.

2.2) Poids corporel et rythme cardiaque

Chez la souris, la Cx43 est exprimée au niveau cardiaque et de façon ubiquitaire. De plus, dans le cœur, la Cx43 est impliquée dans la propagation du signal électrique auriculo-ventriculaire. Ainsi, afin d'étudier si l'absence partielle de Cx43 ainsi que l'hypoxie chronique influencent le poids et le rythme cardiaque des souris, nous avons évalué : (1) le poids corporel et (2) le rythme cardiaque des souris Cx43^{+/+} par rapport aux souris Cx43^{+/-} dans les deux conditions (normoxique et hypoxique chronique).

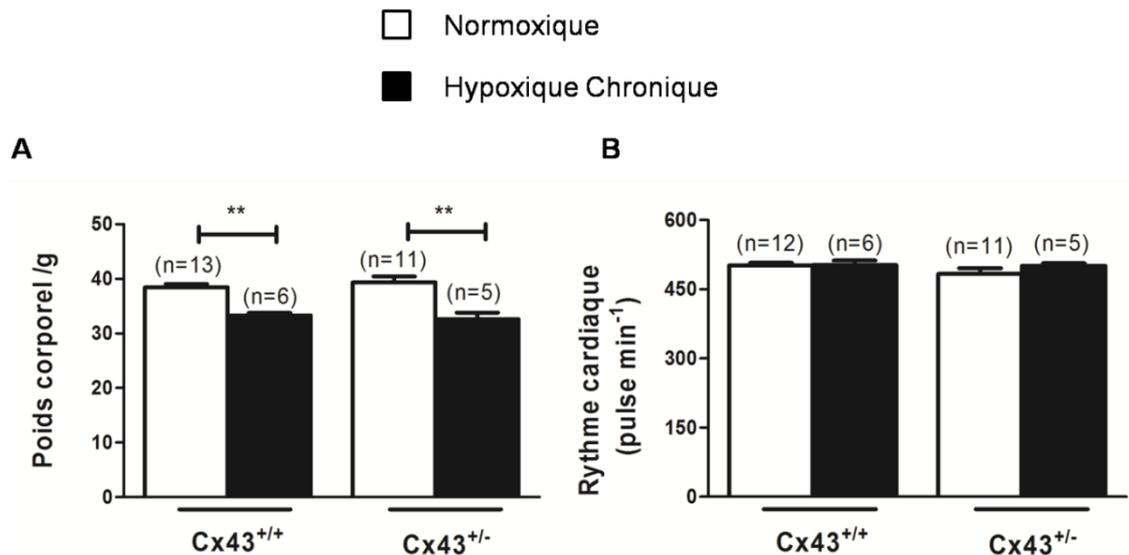


Figure 68: Valeurs des poids corporels (A) et des rythmes cardiaques (B) des différents groupes de souris étudiées.

Cx 43^{+/+} et Cx 43^{+/-} correspondent aux souris sauvages et hétérozygotes respectivement. Les colonnes blanches et noires correspondent aux conditions normoxique et hypoxique chronique respectivement.

On observe des diminutions significatives des poids corporels des souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-}HC par rapport aux souris normoxiques. Les poids corporels des souris exposées à l'hypoxie diminuent d'environ 13 et 17 % chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} respectivement (Figure 68A). D'autre part, dans les deux conditions (normoxique et hypoxique chronique), les souris hétérozygotes Cx43^{+/-} présentent un poids corporel qui n'est pas significativement différent de celui des souris sauvages Cx43^{+/+}. Ces résultats indiquent que l'absence partielle de Cx43 n'a pas d'effet sur le poids des souris, que ce soit en normoxie ou en hypoxie chronique et la perte de poids observée chez les souris est uniquement due à l'hypoxie chronique. Ces données sont en accord avec les résultats de la littérature qui décrivent que chez les souris C57BL6, les six premiers jours d'hypoxie induisent une diminution de 13 % du poids corporel. Même si les souris reprennent un régime alimentaire normal au bout de 10 jours, leur poids corporel demeure faible jusqu'au 21^{ème} jour d'hypoxie (van den Borst, Schols *et al.*, 2013).

En ce qui concerne les rythmes cardiaques, ils ne sont pas significativement différents (environ 500 battements/minute) chez les souris Cx43^{+/-} et Cx43^{+/+} dans les deux conditions (Figure 68B). Ni l'absence partielle de Cx43, ni l'hypoxie ne semblent influencer le rythme cardiaque des souris. Ping Li et collaborateurs ont montré un rythme cardiaque de l'ordre de 530 battements/minute en conditions physiologiques chez les souris C57BL6 sauvages en état d'éveil (Li, Sur *et al.*, 1999). Des expériences de télémétrie ont indiqué un rythme cardiaque de 487 battements/minute en conditions physiologiques chez la souris

C57BL6 sauvages, ce qui confirme également nos résultats (Schwenke, Pearson *et al.*, 2006). Par ailleurs, il a été démontré par des expériences d'électrocardiographie que les souris Cx43^{+/-} (souche C57BL6) âgées de 5 jours, en conditions physiologiques, ne présentent pas d'arythmies cardiaques. Néanmoins, les embryons de souris Cx43^{-/-} présentent des arrhythmies cardiaques au 17,5^{ème} jour du stade embryonnaire. Ces auteurs ont montré un rythme cardiaque de l'ordre de 495 ± 16 battements/minute chez les souris Cx43^{+/-} (Vaidya, Tamaddon *et al.*, 2001). Dans notre étude, les souris Cx43^{+/-} présentent un rythme de 483 ± 12 battements/minute confirmant ainsi les données de la littérature.

Après avoir vérifié la mise en place de l'HTP hypoxique chronique et évalué les mesures hémodynamiques chez les souris sauvages et les souris Cx43^{+/-}, nous avons évalué le taux d'expression protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/-} souffrant d'HTP hypoxique chronique par rapport aux souris Cx43^{+/+} normoxiques.

3. Expression protéique de la Cx43 au niveau des AIP Cx43^{+/+} souffrant d'HTP hypoxique chronique

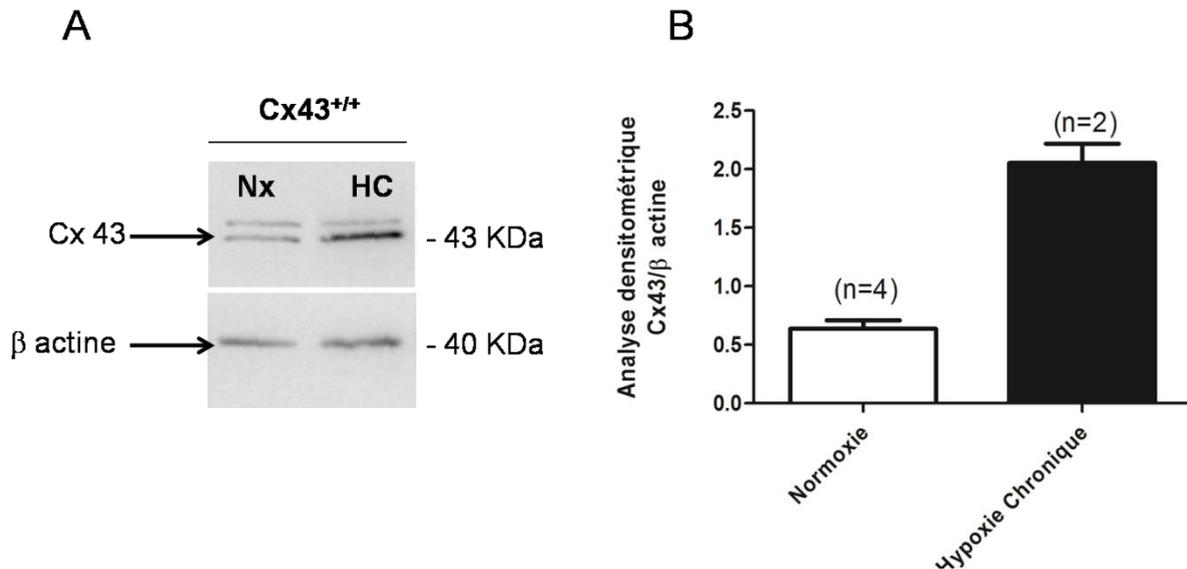


Figure 69: Expression protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} souffrant d'HTP hypoxique chronique.

(A) Analyse par Western Blot du taux d'expression protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} en normoxie et en hypoxie chronique. (B) Analyse densitométrique de l'expression de la Cx43 normalisée par rapport à l'expression protéique de la β-actine montrant une tendance à l'augmentation de l'expression de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/+} souffrant d'HTP hypoxique chronique par rapport aux souris Cx43^{+/+} normoxiques. Nx : normoxie, HC : hypoxie chronique.

On observe une tendance à une augmentation de l'expression protéique de la Cx43 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} souffrant d'HTP hypoxique chronique par rapport à leurs homologues normoxiques (Figure 69A et B). Ces résultats sont à confirmer avec des expériences supplémentaires. D'autre part, les résultats du laboratoire ont montré une augmentation significative de l'expression protéique de la Cx43 dans les AIP de rats souffrant d'HTP hypoxique chronique (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Ces observations indiquent que l'expression de la Cx43 serait régulée par l'hypoxie chronique.

Etant donné que (1) les résultats de Western Blot montrent l'implication de la Cx43 dans l'HTP induite par l'hypoxie chronique chez les souris Cx43^{+/+} et (2) l'HTP est associée à des changements structuraux (remodelage) et fonctionnels (hyperréactivité) des AIP, nous avons évalué le rôle de la Cx43 dans (1) le remodelage vasculaire de la paroi artérielle des AIP ainsi que le remodelage cardiaque et (2) la vasoréactivité des AIP provenant des souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.

4. Rôle de la Cx43 dans le remodelage vasculaire et cardiaque

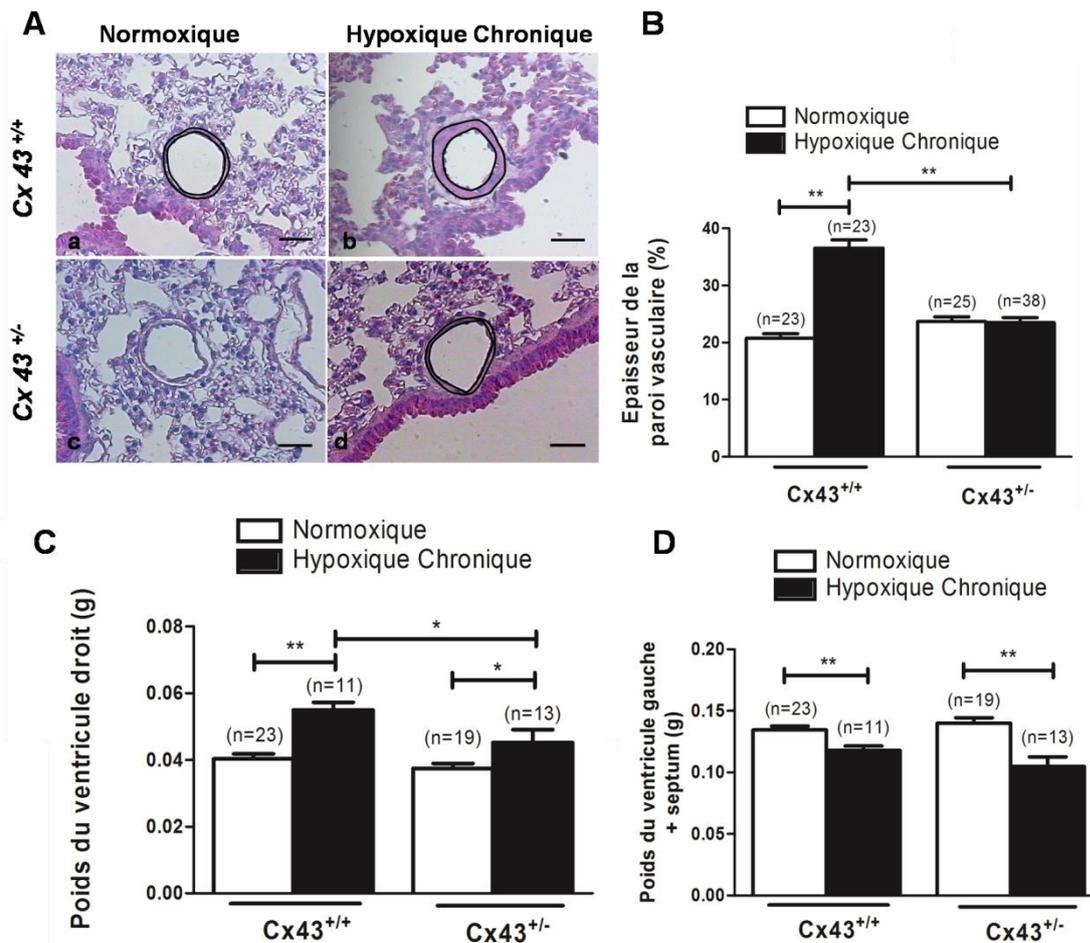


Figure 70: Remodelage de la paroi artérielle des AIP et du ventricule droit des souris Cx43^{+/+} par rapport aux souris Cx43^{+/-} en normoxie et hypoxie chronique.

(A) Coloration hématoxyline-éosine des coupes histologiques de poumon de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} normoxiques et hypoxiques chroniques. L'hématoxyline colore en bleu les noyaux et l'éosine colore en rose le cytoplasme. (B) Histogrammes exprimant le % de l'épaisseur de la média par rapport au diamètre du vaisseau entier. (C) et (D) Le poids du ventricule droit et du ventricule gauche + septum respectivement chez des souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en conditions normoxique et hypoxique chronique. La barre d'échelle correspond à 15 µm. * et ** indiquent une différence significative avec $P < 0,05$ et $P < 0,01$ respectivement.

Sur les coupes histologiques, on observe un remodelage de la paroi artérielle des AIP des souris Cx43^{+/+} HC par rapport aux souris Cx43^{+/+} normoxiques (Figure 70A). L'absence partielle de Cx43 n'influence pas l'épaisseur de la média des AIP chez les souris Cx43^{+/-} normoxiques. Chez les souris Cx43^{+/-} HC, le remodelage des AIP observé disparaît par rapport à celui observé chez les souris Cx43^{+/+} HC (Figure 70B).

Concernant, le remodelage cardiaque, on observe une augmentation significative du poids du ventricule droit chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} HC par rapport à leurs

homologues normoxiques (Figure 70C). Cependant, de manière intéressante, chez les souris Cx43^{+/-} HC, l'augmentation du poids du ventricule droit est moindre par rapport aux souris Cx43^{+/+} HC. Ces résultats suggèrent que l'absence partielle de Cx43 freine l'hypertrophie du ventricule droit induite par l'hypoxie chronique. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus pour le rapport de Fulton (Figure 67B). Toutefois, on observe une diminution significative du poids du ventricule gauche plus le septum chez les souris Cx43^{+/-} et Cx43^{+/-} HC par rapport à leurs homologues normoxiques. Cette observation peut s'expliquer par la perte de poids corporel observée chez les souris HC.

5. Rôle de la Cx43 dans la vasoréactivité des AIP de souris Cx43^{+/+} vs Cx43^{+/-} normoxique et hypoxique chronique

5.1) Vasoréactivité en réponse à la 5-HT

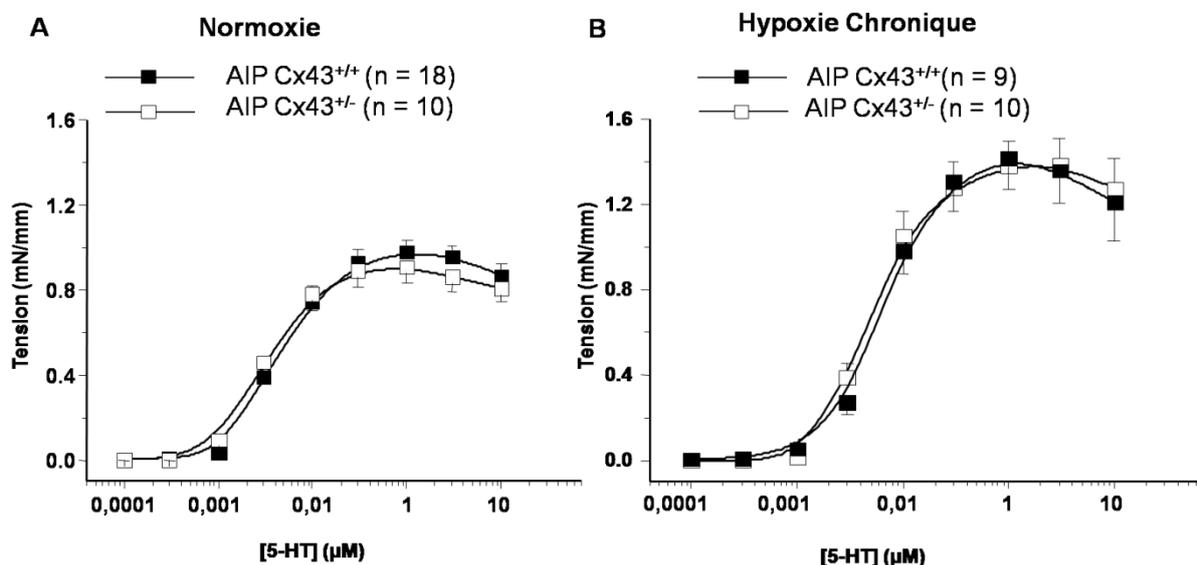


Figure 71: Réactivité à la 5-HT des AIP de souris.

CCRC à la 5-HT sur des AIP provenant de souris Cx43^{+/+} (carrés noirs) et de souris Cx43^{+/-} (carrés blancs) en condition normoxique (A) et hypoxique chronique (B). Chaque valeur représente une valeur moyenne ± écart-type de la moyenne.

Contrairement à ce que nous avons observé chez le rat (Billaud, Marthan *et al.*, 2009), l'absence partielle de Cx43 n'a pas d'effet sur la contraction à la 5-HT au niveau des AIP de souris en condition normoxique (Figure 71A). Chez les souris souffrant d'HTP hypoxique chronique, on observe que l'absence partielle de Cx43 n'influence pas non plus la réactivité induite par la 5-HT (Figure 71B). Par ailleurs, chez le rat également, l'inhibition des Cx43 à l'aide du peptide ³⁷⁻⁴³Gap27 n'a aucun effet sur la réactivité à la 5-HT des AIP de rats hypoxiques chroniques (Billaud, Dahan *et al.*, 2011).

Les tensions maximales (E_{max}) développées en réponse à la 5-HT chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} normoxiques et hypoxiques chroniques ne sont pas significativement

différentes (Tableau 11). Cependant, la tension maximale développée chez les souris Cx43^{+/+} hypoxiques en réponse à la 5-HT (1 μ M) présente une tendance à une augmentation par rapport aux souris Cx43^{+/+} normoxiques. Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de vaisseaux pour la condition Cx43^{+/+} hypoxique chronique pour confirmer cette tendance. Chez les souris Cx43^{+/-}, la tension maximale développée en hypoxie chronique en réponse à la 5-HT (1 μ M) est significativement supérieure à la tension maximale développée en normoxie. Enfin, les concentrations de 5-HT requises pour produire 50 % de la tension maximale (EC₅₀) des quatre conditions ne sont pas significativement différentes (Tableau 11).

	Normoxie		Hypoxie Chronique	
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
Tension maximale (E _{max}) (mN/mm)	0,93 ± 0,05	0,87 ± 0,07	1,33 ± 0,16	1,33 ± 0,12*
EC ₅₀ (μ M)	0,04 ± 0,005	0,04 ± 0,007	0,05 ± 0,007	0,05 ± 0,005

Tableau 11: Caractéristiques de la réactivité à la 5-HT des AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.

La tension maximale ou E_{max} correspond à la contraction maximale développée par les vaisseaux pour 1 μ M de 5-HT. L'EC₅₀ correspond à la concentration en μ M de 5-HT qui produit la moitié de la contraction maximale. Les valeurs sont exprimées en valeur moyenne \pm écart-type de la moyenne. * indique une différence significative de la tension maximale par rapport à la condition normoxie Cx43^{+/-} avec $P < 0,05$.

5.2) Vasoréactivité en réponse à l'ET-1

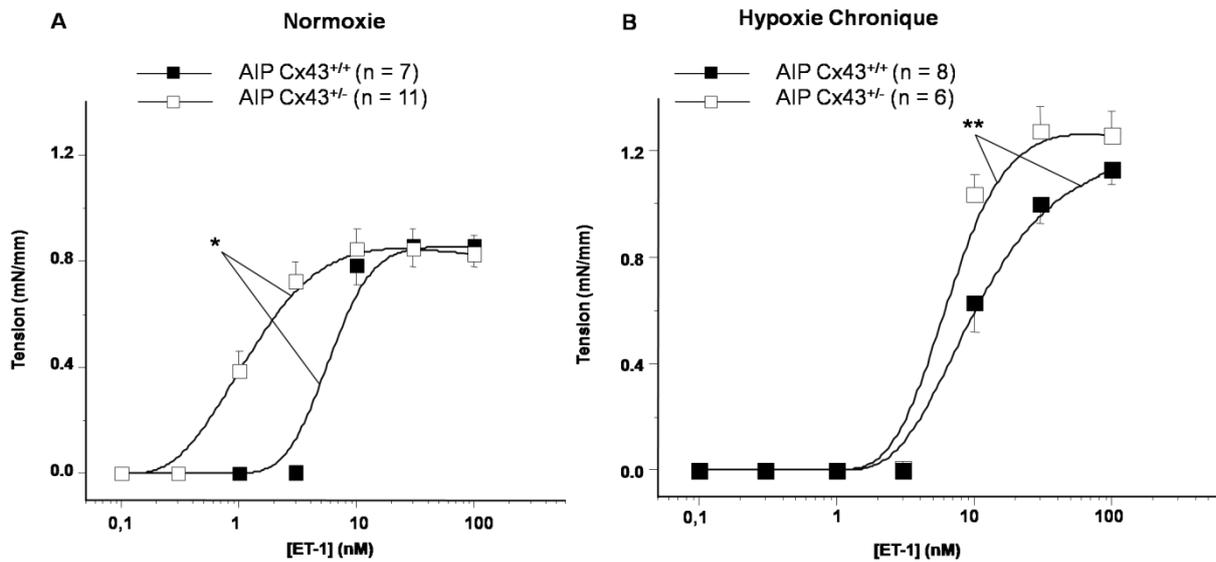


Figure 72: Réactivité à l'ET-1 des AIP de souris.

CCRC sur des AIP provenant de souris Cx43^{+/+} (carrés noirs) et de souris Cx43^{+/-} (carrés blancs) en condition normoxique (**A**) et hypoxique (**B**). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart-type de la moyenne. * et ** indique une différence significative avec $P < 0,05$ et $0,01$ respectivement.

Dans les deux conditions, normoxie et hypoxie chronique, chez les souris Cx43^{+/-} on observe une hyperréactivité des vaisseaux à l'ET-1 (Figure 72A et B). Cependant, chez le rat, l'inhibition pharmacologique des Cx43 au niveau des AIP à l'aide du peptide bloqueur ³⁷⁻⁴³Gap27 ne produit aucun effet sur la contraction en réponse à l'ET-1, que ce soit en condition normoxique ou en condition hypoxique (Billaud, Dahan *et al.*, 2011).

En normoxie, la courbe de contraction en réponse à l'ET-1 des souris Cx43^{+/-} est déplacée vers la gauche par rapport à celle des souris Cx43^{+/+} (Figure 72A). Les tensions maximales développées chez les Cx43^{+/+} ainsi que chez les Cx43^{+/-} ne sont pas significativement différentes (Tableau 12). Néanmoins, l'EC₅₀ des souris Cx43^{+/-} est significativement inférieure par rapport à celle des souris Cx43^{+/+} (Tableau 12).

En hypoxie chronique, la réponse contractile des AIP Cx43^{+/-} HC à l'ET-1 est significativement supérieure par rapport à la contraction développée par les AIP Cx43^{+/+} HC (Figure 72B). De plus, chez les souris Cx43^{+/-} hypoxiques chroniques, la tension maximale (E_{max}) des AIP est significativement supérieure par rapport à la E_{max} des AIP des souris Cx43^{+/-} normoxiques (Tableau 12). En revanche, les EC₅₀ ne sont pas significativement différentes (Tableau 1).

	Normoxie		Hypoxie Chronique	
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
Tension maximale (Emax) (mN/mm)	0,86 ± 0,08	0,84 ± 0,07	1,09 ± 0,07	1,27 ± 0,09*
EC ₅₀ (nM)	7,74 ± 0,30	1,28 ± 0,17**	6,58 ± 1,03	8,429 ± 0,35

Tableau 12: Caractéristiques de la réactivité à l'ET-1 des AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.

La tension maximale ou Emax correspond à la contraction maximale développée par les vaisseaux pour 10 nM et 30 nM d'ET-1 en condition normoxique et hypoxique chronique respectivement. L'EC₅₀ correspond à la concentration en nM d'ET-1 qui produit la moitié de la contraction maximale. Les valeurs sont exprimées en valeur moyenne ± écart-type de la moyenne. * indique une différence significative de la tension maximale par rapport à la condition normoxie Cx43^{+/-}, avec $P < 0,05$. ** correspond à une différence significative de l'EC₅₀ par rapport à la condition normoxie Cx43^{+/+}, avec $P < 0,01$.

5.3) Vasoréactivité en réponse à la phényléphrine (PHE)

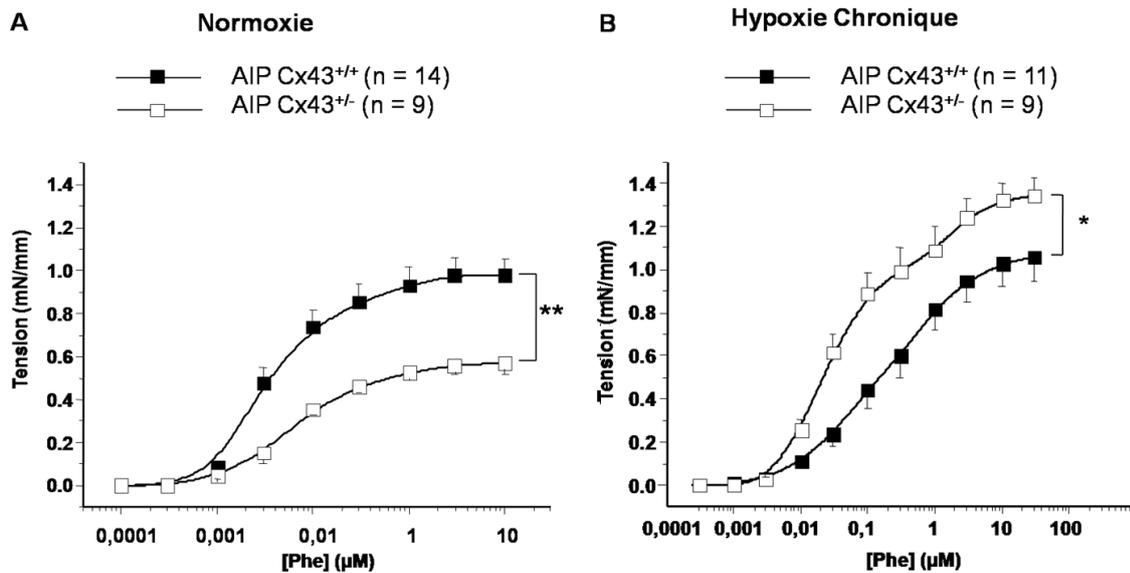


Figure 73: Réactivité à la PHE des AIP de souris.

CCRC sur des AIP provenant de souris Cx43^{+/+} (carrés noirs) et de souris Cx43^{+/-} (carrés blancs) en condition normoxique (A) et hypoxique (B). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm écart-type de la moyenne. * et ** représentent des différences significatives pour $P < 0,05$ et $0,01$ respectivement.

En normoxie, chez les souris Cx43^{+/-}, la contraction induite par la PHE est significativement diminuée par rapport aux souris Cx43^{+/+} (Figure 73A). En revanche, en hypoxie chronique, la tendance inverse est observée. La réponse contractile des AIP des souris Cx43^{+/-} HC est significativement supérieure par rapport à la contraction des AIP Cx43^{+/+} HC (Figure 73B, Tableau 13).

Par ailleurs, les résultats antérieurs obtenus chez le rat en condition normoxique, ont montré que l'inhibition des Cx43 avec le peptide ³⁷⁻⁴³Gap27 n'a aucun effet sur la contraction induite par la PHE. Cependant, en condition hypoxique chronique, le blocage des Cx43 avec le ³⁷⁻⁴³Gap27 induit une diminution significative de la contraction des AIP de rats (Billaud, Dahan *et al.*, 2011).

Les EC₅₀ des souris Cx43^{+/-} et Cx43^{+/+} normoxiques et hypoxiques chroniques ne sont pas significativement différentes (Tableau 13).

	Normoxie		Hypoxie Chronique	
	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}	Cx43 ^{+/+}	Cx43 ^{+/-}
Tension maximale (Emax) (mN/mm)	0,96 ± 0,07	0,57 ± 0,05	1,06 ± 0,11	1,49 ± 0,08*
EC ₅₀ (µM)	0,04 ± 0,009	0,05 ± 0,02	0,13 ± 0,04	0,07 ± 0,01

Tableau 13: Caractéristiques de la réactivité à la PHE des AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en condition normoxique et hypoxique chronique.

La tension maximale ou Emax correspond à la contraction maximale développée par les vaisseaux pour 3 µM et 30 µM de PHE en condition normoxique et hypoxique chronique respectivement. L'EC₅₀ correspond à la concentration en µM de PHE qui produit la moitié de la contraction maximale. Les valeurs sont exprimées en valeur moyenne ± écart-type de la moyenne. * indique une différence significative de la tension maximale par rapport à la condition normoxie Cx43^{+/-}, avec $P < 0,05$.

6. Rôle de la Cx43 dans la vasorelaxation des AIP de souris Cx43^{+/+} vs Cx43^{+/-} normoxique au carbacol

Les capacités relaxantes des AIP des souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} (précontractées à la phényléphrine (1 µM)) en condition normoxique ont été évaluées en réponse à l'analogue non hydrolysable de l'acétylcholine, le carbacol (Figure 74).

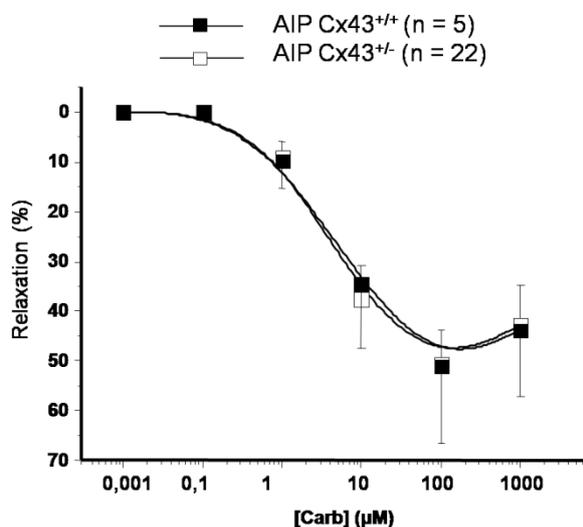


Figure 74: Relaxation au carbacol des AIP de souris.

CCRC sur des AIP provenant de souris Cx43^{+/+} (carrés noirs) et de souris Cx43^{+/-} (carrés blancs) en condition normoxique. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± écart-type de la moyenne. Carb : carbacol.

On observe qu'en condition physiologique (normoxie), la relaxation des AIP (au carbacol n'est pas modifiée chez les souris Cx43^{+/-} par rapport aux souris Cx43^{+/+}.

III.2 Discussion

Les mécanismes cellulaires sous-jacents ainsi que les cibles gouvernant le développement de l'HTP ne sont pas complètement élucidés. Notre modèle de souris hétérozygote pour la Cx43, correspond alors à la première étude caractérisant le rôle fonctionnel de la Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et HTP hypoxique chronique de souris.

Nous avons mis en évidence l'expression protéique de la Cx43 au niveau des AIP de souris saines comme montré précédemment par l'équipe de Liming Wang (Wang, Yin *et al.*, 2012). De plus, par immunofluorescence nous avons pu préciser la localisation des Cx43 au niveau des CE et CML des AIP de souris saines, avec une expression prédominante au niveau des CML. De manière intéressante, chez les souris souffrant d'une HTP hypoxique chronique, l'expression de la Cx43 est augmentée, comme observé précédemment chez les rats HC (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Par ailleurs, il serait intéressant de regarder la localisation des Cx43 sur les AIP « en face » chez les souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} normoxiques et HC. On devrait également étudier la localisation de la Cx43 sur des cryocoupes d'AIP provenant de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} hypoxique chronique. De plus, il serait également intéressant de regarder le niveau d'expression de la Cx43 au niveau des AIP provenant de souris Cx43^{+/-}. D'autre part, il serait important d'étudier le profil et le niveau d'expression des Cx37 et Cx40 dans les AIP de souris Cx43^{+/+} et Cx43^{+/-} en normoxie et hypoxie chronique (Yeh, Dupont *et al.*, 1997). Ces expériences vont nous permettre de voir s'il y a la mise en place d'un phénomène compensatoire au niveau de l'expression des Cx37 et Cx40 chez les souris Cx43^{+/-}.

D'autre part, notre modèle de souris hétérozygote pour la Cx43 (Cx43^{+/-}) constitue un modèle intéressant dans l'étude de l'HTP hypoxique chronique. En effet, les souris Cx43^{+/-} soumises à trois semaines d'hypoxie développent une HTP HC moins sévère par rapport aux souris Cx43^{+/+} HC. On a mis en évidence chez les souris Cx43^{+/-} HC, une augmentation moins importante de la pression ventriculaire droite systolique ainsi qu'une hypertrophie ventriculaire droite (HVD) modérée. Toutefois, on aurait pu s'attendre à observer une HVD plus importante chez les animaux Cx43^{+/-} HC. En effet, des études ont montré que dans le cas d'une hypertrophie cardiaque due à une sténose cardiaque et d'infarctus du myocarde l'expression de la Cx43 est diminuée (Dhein and Jongsma 2004 ; Severs, Dupont *et al.*, 2004). Or, dans notre cas la diminution de l'expression de la Cx43 freine l'hypertrophie cardiaque droite. Il serait donc judicieux d'étudier la localisation de la Cx43 par immunofluorescence au niveau du ventricule droit des souris souffrant d'HTP HC, afin de voir si la localisation de la Cx43 au niveau des disques intercalaires du ventricule droit HTP HC est perturbée comme observé chez le rat souffrant d'une HTP induite par la MCT (Uzzaman, Honjo *et al.*, 2000).

En ce qui concerne les modifications structurales de la paroi artérielle des AIP, le remodelage de la média observé chez les souris Cx43^{+/-} HTP HC disparaît chez les souris Cx43^{-/-} HTP HC. La délétion partielle de la Cx43 supprimerait alors complètement l'apparition du remodelage vasculaire. Ces résultats suggèrent donc que la Cx43 serait impliquée dans des phénomènes de prolifération des CML vasculaires et/ou des myocytes cardiaques. En effet, plusieurs études démontrent le rôle de la Cx43 dans la prolifération des CML au niveau des plaques athérosclérotiques (Yeh, Lupu *et al.*, 1997 ; Kwak, Mulhaupt *et al.*, 2002 ; Plenz, Ko *et al.*, 2004 ; Chadjichristos, Morel *et al.*, 2008 ; Johnstone, Ross *et al.*, 2009). De plus, d'autres études réalisées sur différentes lignées cellulaires ont montré que la Cx43 est capable de moduler la prolifération cellulaire de manière indépendante de sa fonction de communication gap jonctionnelle (Zhang, Kaneda *et al.*, 2003 ; Gellhaus, Dong *et al.*, 2004 ; Johnstone, Best *et al.*, 2010 ; Plante, Stewart *et al.*, 2011). Une étude récente réalisée par Scott Johnson et collaborateurs au niveau des CML issues de carotides de souris C57BL6 a montré qu'en réponse au PDGF, la Cx43 est phosphorylée par les MAPK (Johnstone, Kroncke *et al.*, 2012). La Cx43 phosphorylée se lie alors à la cycline E et la kinase associée à la cycline E (CDK2) et induit par la suite la prolifération des CML vasculaires (Johnstone, Kroncke *et al.*, 2012). En se basant sur les données de la littérature, on peut supposer qu'un tel mécanisme de prolifération existe au sein des CML d'AIP de souris HTP HC. En effet, il a été démontré qu'HIF-1, le facteur induit par l'hypoxie en se liant au niveau des éléments de réponse à l'hypoxie présents au niveau de l'ADN induit la transcription du PDGF impliqué dans la prolifération cellulaire (Katayose, Ohe *et al.*, 1993). Pour compléter cette étude, il serait cependant intéressant de préciser le rôle de la Cx43 dans la balance prolifération/apoptose responsable du remodelage de la paroi artérielle pulmonaire. Ainsi, on pourra déterminer si la Cx43 interviendrait plutôt dans la prolifération ou l'apoptose. Pour l'étude de la prolifération, la technique d'immunofluorescence avec les marqueurs de prolifération tels que le PCNA (pour « proliferating cell nuclear antigen ») et la cyclin D1 seront utilisés (Courboulin, Tremblay *et al.*, 2011 ; Carrillo-Sepulveda and Matsumoto 2014 ; Zhong, Chen *et al.*, 2014). L'apoptose sera étudiée par la méthode TUNEL (pour « terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling ») qui marque spécifiquement l'ADN fragmenté en cas d'apoptose par l'enzyme TdT (pour « terminal deoxynucleotidyl transferase ») (Guibert, Savineau *et al.*, 2005 ; Courboulin, Tremblay *et al.*, 2011).

Concernant, les modifications fonctionnelles des AIP issues de souris Cx43^{+/-} HTP HC, on observe des profils de réponse différents en fonction de l'agoniste vasoconstricteur étudié. Contrairement à ce que l'on a montré chez le rat par l'inhibition pharmacologique de la Cx43, la délétion partielle de la Cx43 chez la souris n'a aucun effet sur la contraction induite par la 5-HT à la fois en normoxie et en hypoxie chronique. Chez les souris Cx43^{+/-}

HC, on observe une hyperréactivité significative à la 5-HT par rapport aux souris Cx43^{+/-} normoxiques. Une hypothèse expliquant cette tendance serait que l'augmentation de l'expression de la Cx43 observée en HC augmenterait la communication intercellulaire et participerait alors au passage de molécules ou ions impliqués dans la réactivité à la 5-HT. Il serait donc nécessaire d'étudier le niveau de l'expression protéique de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-} HC par rapport aux souris Cx43^{+/-} normoxiques afin d'évaluer si l'hypoxie augmente l'expression de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-}. Si tel est le cas, cela nous permettrait d'expliquer l'hyperréactivité à la 5-HT observée chez les souris Cx43^{+/-} HC.

De plus, on a montré qu'en normoxie et hypoxie chronique, la délétion partielle de la Cx43 chez les souris provoque une hyperréactivité à l'ET-1. Comme pour la 5-HT dans le modèle de rat (Billaud, Marthan *et al.*, 2009), ces résultats nous laissent penser que l'absence partielle de Cx43 induit une diminution du couplage myoendothélial via les jonctions gap composées de Cx43. Ainsi, en réponse à l'ET-1, les jonctions myoendothéliales (JME) composées de Cx43 seraient impliquées dans la propagation d'un facteur relaxant de l'endothélium vers le muscle lisse des AIP, notamment le facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium (l'EDHF). En effet, des études réalisées sur les artères coronaires porcines ainsi que sur les artères cérébrales et carotides de rats ont montré que l'ET-1 active au niveau de l'endothélium des récepteurs ET_B (R-ET_B) qui sont impliqués dans la vasodilatation médiée par l'EDHF (Szok, Hansen-Schwartz *et al.*, 2001 ; Tirapelli, Casolari *et al.*, 2005 ; Nilsson, Wackenfors *et al.*, 2008). Par ailleurs, une étude réalisée au niveau de l'artère rénale de rats a montré que les jonctions gap composées de Cx43 sont impliquées dans la vasodilatation dépendante de l'EDHF (Karagiannis, Rand *et al.*, 2004). D'autre part, l'activation des R-ET_B au niveau de l'endothélium des AIP induit la production de la PGI₂ qui induit la vasorelaxation des CML. Il est donc aussi plausible que dans les AIP de souris, la PGI₂ d'une taille de 350 Da passerait par les JME composées de Cx43 pour induire la vasorelaxation. Il serait donc intéressant de vérifier dans un premier temps dans les AIP de souris Cx43^{+/+}: (1) si les R-ET_B sont impliqués dans la vasorelaxation et (2) si l'activation des R-ET_B induit en aval l'EDHF. Pour répondre à ces deux questions, on devrait regarder la contraction en réponse à l'ET-1 sur des AIP dépourvues d'endothélium afin de mettre en évidence la relaxation médiée par les R-ET_B sur les CE. Ensuite, il serait important d'évaluer la vasoréactivité en bloquant l'EDHF à l'aide de l'apamine et de la charybdotoxine, deux bloqueurs des SK_{Ca} et IK_{Ca} respectivement (canaux K⁺ dépendants du calcium de conductance petite et intermédiaire respectivement) et en présence du L-NAME afin de s'affranchir de la voie du NO. On devrait aussi étudier la relaxation des AIP pré-contractées à un agoniste vasoconstricteur (tel que la phényléphrine) dans plusieurs conditions : relaxation en réponse à l'ET-1 sur les AIP en présence et en absence d'endothélium et la relaxation en réponse à l'ET-1 sur des AIP en présence du BQ-123 et BQ-788, deux antagonistes des R-ET_A et R-ET_B respectivement.

Concernant la vasoréactivité en réponse à la PHE, nos résultats ont montré qu'en normoxie, la contraction est significativement inférieure chez les souris Cx43^{+/-} par rapport aux souris Cx43^{+/+}. On peut alors supposer que chez la souris, comme cela a été montré précédemment chez le rat (Billaud, Marthan *et al.*, 2009), les JME ou autres jonctions (CE-CE et/ou CML/CML) composées de Cx43 sont impliquées dans le passage d'une molécule, notamment l'O₂^{·-} qui diminuerait la vasorelaxation dépendante de l'endothélium. De plus, la tension maximale développée chez les souris Cx43^{+/-} hypoxiques est significativement supérieure par rapport à la tension développée chez les souris Cx43^{+/-} normoxiques. On peut donc poser l'hypothèse que l'hypoxie chronique augmenterait la quantité d'O₂^{·-} au niveau des AIP Cx43^{+/-} augmentant ainsi la vasocontraction à la PHE. Il serait judicieux d'étudier par la technique de résonance paramagnétique des électrons, si la PHE induit une augmentation de l'O₂^{·-} au niveau des AIP de souris. Cependant, cette hypothèse peut être discutée si on applique le raisonnement qu'une diminution de la Cx43 induit une diminution de la quantité de JME, donc l'O₂^{·-} ne passe plus. Toutefois, on peut aussi s'attendre à une augmentation de l'expression de la Cx43 chez la souris Cx43^{+/-} en HC.

Enfin, on a montré qu'en normoxie, la délétion partielle de la Cx43 n'a aucun effet sur les capacités relaxantes des AIP en réponse au carbachol chez les souris Cx43^{+/-} par rapport à leurs homologues sauvages. Ainsi, en normoxie chez la souris, la relaxation des AIP médiée par le carbachol ne fait pas intervenir les jonctions gap composées de Cx43. Cependant, il serait intéressant d'étudier la vasorelaxation au carbachol des souris Cx43^{+/-} et Cx43^{+/-} hypoxique chronique.

III.3 Conclusion

Grâce à l'utilisation des souris hétérozygotes déficientes pour la Cx43, on démontre pour la première fois l'implication de la Cx43 dans la circulation pulmonaire de souris saine et souffrant d'HTP hypoxique chronique (HC). Plus précisément, on a montré que la délétion de la Cx43 chez les souris Cx43^{+/-} permet de diminuer le développement de l'HTP hypoxique chronique en diminuant la pression ventriculaire droite systolique ainsi que l'hypertrophie ventriculaire droite. De manière intéressante, les souris Cx43^{+/-} HTP HC ne présentent plus de remodelage au niveau de la paroi artérielle des AIP. Ces résultats montrent alors que la délétion partielle de la Cx43 a un effet bénéfique au niveau vasculaire pulmonaire et pas délétère au niveau cardiaque comme on aurait pu le penser.

D'autre part, l'absence partielle de Cx43 induit des différences au niveau des profils de réactivités en réponse à la 5-HT, à l'ET-1 et à la PHE dans les AIP de souris normoxiques et hypoxiques. De plus, ces profils diffèrent par rapport aux profils de réactivités observés précédemment par Billaud et collaborateurs chez le rat suite à l'inhibition pharmacologique des Cx par les peptides mimétiques (Billaud, Dahan *et al.*, 2011). Ainsi, malgré les différences au niveau des mécanismes de contraction observées chez le rat et la souris, la

Cx43 est toujours impliquée dans la contraction des artères pulmonaires. Cette étude apporte de nouvelles connaissances sur le rôle de la Cx43 dans l'HTP de groupe 3 induite par l'hypoxie chronique.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les études menées au cours de ce travail de thèse ont permis d'acquérir de nouvelles données sur le rôle de la 5-HT ainsi que sur le rôle de la Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et pathologique.

Au niveau de la circulation pulmonaire saine de rat, on a disséqué la voie de signalisation complète impliquée dans l'augmentation de la quantité d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à la 5-HT. On a montré que la production d' $O_2^{\cdot-}$ est un phénomène spécifique à la 5-HT dans la circulation pulmonaire de rat. De plus, la production d' $O_2^{\cdot-}$ induite par la 5-HT est dépendante du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale ainsi que le calcium d'origine mitochondriale. L' $O_2^{\cdot-}$ produit au niveau du muscle lisse interagit avec le NO endothélial pour produire des peroxy-nitrites et diminue alors la biodisponibilité du NO vasorelaxant. Ce mécanisme fait pencher la balance contraction/relaxation en faveur d'une contraction. Par ailleurs, nous avons souligné l'existence d'un microdomaine de signalisation au sein des AIP de rats permettant la production d' $O_2^{\cdot-}$ en réponse à la 5-HT. Ce travail apporte une nouvelle preuve du rôle physiologique de l' $O_2^{\cdot-}$ alors qu'il est souvent considéré comme un acteur principal dans la survenue de nombreuses pathologies. Enfin, il serait intéressant d'étudier chez l'humain la voie de signalisation par la 5-HT mise en évidence chez le rat dans notre étude.

Nous avons également mis en évidence pour la première fois l'implication des Cx43 dans la circulation pulmonaire saine et pathologique de souris. Enfin, il serait important de reproduire ces expériences réalisées chez la souris sur des AIP provenant de patients sains et souffrants d'HTP du groupe 3. Ainsi, on pourrait éventuellement élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant à la fois les récepteurs à l'ET-1 et à la Cx43 dans le traitement de l'hypertension pulmonaire chez l'Homme.

BIBLIOGRAPHIE

Abenhaim, L., Y. Moride, F. Brenot, S. Rich, J. Benichou, X. Kurz, T. Higenbottam, C. Oakley, E. Wouters, M. Aubier, G. Simonneau and B. Begaud (1996). "Appetite-suppressant drugs and the risk of primary pulmonary hypertension. International Primary Pulmonary Hypertension Study Group." N Engl J Med**335**(9): 609-616.

Absi, M., M. P. Burnham, A. H. Weston, E. Harno, M. Rogers and G. Edwards (2007). "Effects of methyl beta-cyclodextrin on EDHF responses in pig and rat arteries; association between SK(Ca) channels and caveolin-rich domains." Br J Pharmacol**151**(3): 332-340.

Acconcia, F., P. Ascenzi, A. Bocedi, E. Spisni, V. Tomasi, A. Trentalance, P. Visca and M. Marino (2005). "Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol." Mol Biol Cell**16**(1): 231-237.

Ahcar, R. O., Y. Demura, P. R. Rai, L. Taraseviciene-Stewart, M. Kasper, N. F. Voelkel and C. D. Cool (2006). "Loss of caveolin and heme oxygenase expression in severe pulmonary hypertension." Chest**129**(3): 696-705.

Adnot, S., A. Houssaini, S. Abid, E. Marcos and V. Amsellem (2013). "Serotonin transporter and serotonin receptors." Handb Exp Pharmacol**218**: 365-380.

Ago, T., J. Kuroda, M. Kamouchi, J. Sadoshima and T. Kitazono (2011). "Pathophysiological roles of NADPH oxidase/nox family proteins in the vascular system. - Review and perspective." Circ J**75**(8): 1791-1800.

Ahlquist, R. P. (1948). "A study of the adrenotropic receptors." Am J Physiol**153**(3): 586-600.

Ahmad, M., M. R. Kelly, X. Zhao, S. Kandhi and M. S. Wolin (2010). "Roles for Nox4 in the contractile response of bovine pulmonary arteries to hypoxia." Am J Physiol Heart Circ Physiol**298**(6): H1879-1888.

Akoyev, V. and D. J. Takemoto (2007). "ZO-1 is required for protein kinase C gamma-driven disassembly of connexin 43." Cell Signal**19**(5): 958-967.

Al Ghouleh, I., G. Frazziano, A. I. Rodriguez, G. Csanyi, S. Maniar, C. M. St Croix, E. E. Kelley, L. A. Egana, G. J. Song, A. Bisello, Y. J. Lee and P. J. Pagano (2013). "Aquaporin 1, Nox1, and Ask1 mediate oxidant-induced smooth muscle cell hypertrophy." Cardiovasc Res**97**(1): 134-142.

Alderton, W. K., C. E. Cooper and R. G. Knowles (2001). "Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition." Biochem J**357**(Pt 3): 593-615.

Amanso, A. M. and K. K. Griendling (2012). "Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology." Front Biosci (Schol Ed)**4**: 1044-1064.

Anas, A. A., W. J. Wiersinga, A. F. de Vos and T. van der Poll (2010). "Recent insights into the pathogenesis of bacterial sepsis." Neth J Med**68**(4): 147-152.

- Aprioku, J. S.** (2013). "Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis." J Reprod Infertil**14**(4): 158-172.
- Archer, S. L., M. Gomberg-Maitland, M. L. Maitland, S. Rich, J. G. Garcia and E. K. Weir** (2008). "Mitochondrial metabolism, redox signaling, and fusion: a mitochondria-ROS-HIF-1 α -Kv1.5 O₂-sensing pathway at the intersection of pulmonary hypertension and cancer." Am J Physiol Heart Circ Physiol**294**(2): H570-578.
- Austin, E. D., L. Ma, C. LeDuc, E. Berman Rosenzweig, A. Borczuk, J. A. Phillips, 3rd, T. Palomero, P. Sumazin, H. R. Kim, M. H. Talati, J. West, J. E. Loyd and W. K. Chung** (2012). "Whole exome sequencing to identify a novel gene (caveolin-1) associated with human pulmonary arterial hypertension." Circ Cardiovasc Genet**5**(3): 336-343.
- Babcock, D. F., J. Herrington, P. C. Goodwin, Y. B. Park and B. Hille** (1997). "Mitochondrial participation in the intracellular Ca²⁺ network." J Cell Biol**136**(4): 833-844.
- Banquet, S., E. Delannoy, A. Agouni, C. Dessy, S. Lacomme, F. Hubert, V. Richard, B. Muller and V. Leblais** (2011). "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." Cell Signal**23**(7): 1136-1143.
- Barer, G. R., C. Cook, E. J. Clegg and J. W. Shaw** (1970). "Pulmonary vascular and cardiac changes in rats and mice exposed to chronic hypoxia." J Pathol**101**(4): Pi-ii.
- Barman, S. A.** (2005). "Effect of nitric oxide on mitogen-activated protein kinases in neonatal pulmonary vascular smooth muscle." Lung**183**(5): 325-335.
- Barst, R. J., D. Langleben, A. Frost, E. M. Horn, R. Oudiz, S. Shapiro, V. McLaughlin, N. Hill, V. F. Tapson, I. M. Robbins, D. Zwicke, B. Duncan, R. A. Dixon, L. R. Frumkin and S.-S. Group** (2004). "Sitaxsentan therapy for pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Crit Care Med**169**(4): 441-447.
- Beall, C. M., D. Laskowski and S. C. Erzurum** (2012). "Nitric oxide in adaptation to altitude." Free Radic Biol Med**52**(7): 1123-1134.
- Beardslee, M. A., J. G. Laing, E. C. Beyer and J. E. Saffitz** (1998). "Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart." Circ Res**83**(6): 629-635.
- Bejarano, E., H. Girao, A. Yuste, B. Patel, C. Marques, D. C. Spray, P. Pereira and A. M. Cuervo** (2012). "Autophagy modulates dynamics of connexins at the plasma membrane in a ubiquitin-dependent manner." Mol Biol Cell**23**(11): 2156-2169.
- Belik, J., M. Jerkic, B. A. McIntyre, J. Pan, J. Leen, L. X. Yu, R. M. Henkelman, M. Toporsian and M. Letarte** (2009). "Age-dependent endothelial nitric oxide synthase uncoupling in pulmonary arteries of endoglin heterozygous mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**297**(6): L1170-1178.
- Bennett, M. V., L. C. Barrio, T. A. Bargiello, D. C. Spray, E. Hertzberg and J. C. Saez** (1991). "Gap junctions: new tools, new answers, new questions." Neuron**6**(3): 305-320.

- Berman, R. S., P. E. Martin, W. H. Evans and T. M. Griffith** (2002). "Relative contributions of NO and gap junctional communication to endothelium-dependent relaxations of rabbit resistance arteries vary with vessel size." Microvasc Res**63**(1): 115-128.
- Beyer, E. C., D. L. Paul and D. A. Goodenough** (1987). "Connexin43: a protein from rat heart homologous to a gap junction protein from liver." J Cell Biol**105**(6 Pt 1): 2621-2629.
- Beyer, E. C., D. L. Paul and D. A. Goodenough** (1990). "Connexin family of gap junction proteins." J Membr Biol**116**(3): 187-194.
- Bienert, G. P., J. K. Schjoerring and T. P. Jahn** (2006). "Membrane transport of hydrogen peroxide." Biochim Biophys Acta**1758**(8): 994-1003.
- Billaud, M., D. Dahan, R. Marthan, J. P. Savineau and C. Guibert** (2011). "Role of the gap junctions in the contractile response to agonists in pulmonary artery from two rat models of pulmonary hypertension." Respir Res**12**: 30.
- Billaud, M., A. W. Lohman, S. R. Johnstone, L. A. Biber, S. Mutchler and B. E. Isakson** (2014). "Regulation of cellular communication by signaling microdomains in the blood vessel wall." Pharmacol Rev**66**(2): 513-569.
- Billaud, M., R. Marthan, J. P. Savineau and C. Guibert** (2009). "Vascular smooth muscle modulates endothelial control of vasoreactivity via reactive oxygen species production through myoendothelial communications." PLoS One**4**(7): e6432.
- Blair, A., P. W. Shaul, I. S. Yuhanna, P. A. Conrad and E. J. Smart** (1999). "Oxidized low density lipoprotein displaces endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) from plasmalemmal caveolae and impairs eNOS activation." J Biol Chem**274**(45): 32512-32519.
- Boettcher, M. and C. de Wit** (2011). "Distinct endothelium-derived hyperpolarizing factors emerge in vitro and in vivo and are mediated in part via connexin 40-dependent myoendothelial coupling." Hypertension**57**(4): 802-808.
- Bonnet, S., A. Belus, J. M. Hyvelin, E. Roux, R. Marthan and J. P. Savineau** (2001). "Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**281**(1): L193-201.
- Bonnet, S., E. Dubuis, C. Vandier, S. Martin, R. Marthan and J. P. Savineau** (2002). "Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing." Cardiovasc Res**53**(4): 1019-1028.
- Bosco, D., J. A. Haefliger and P. Meda** (2011). "Connexins: key mediators of endocrine function." Physiol Rev**91**(4): 1393-1445.
- Bouallegue, A., G. B. Daou and A. K. Srivastava** (2007). "Endothelin-1-induced signaling pathways in vascular smooth muscle cells." Curr Vasc Pharmacol**5**(1): 45-52.
- Boueiz, A., M. Damarla and P. M. Hassoun** (2008). "Xanthine oxidoreductase in respiratory and cardiovascular disorders." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**294**(5): L830-840.

- Brady, N. R., S. P. Elmore, J. J. van Beek, K. Krab, P. J. Courtoy, L. Hue and H. V. Westerhoff** (2004). "Coordinated behavior of mitochondria in both space and time: a reactive oxygen species-activated wave of mitochondrial depolarization." Biophys J**87**(3): 2022-2034.
- Brandes, R. P., N. Weissmann and K. Schroder** (2010). "NADPH oxidases in cardiovascular disease." Free Radic Biol Med**49**(5): 687-706.
- Brennan, L. A., R. H. Steinhorn, S. Wedgwood, E. Mata-Greenwood, E. A. Roark, J. A. Russell and S. M. Black** (2003). "Increased superoxide generation is associated with pulmonary hypertension in fetal lambs: a role for NADPH oxidase." Circ Res**92**(6): 683-691.
- Brisset, A. C., B. E. Isakson and B. R. Kwak** (2009). "Connexins in vascular physiology and pathology." Antioxid Redox Signal**11**(2): 267-282.
- Bucci, M., J. P. Gratton, R. D. Rudic, L. Acevedo, F. Roviezzo, G. Cirino and W. C. Sessa** (2000). "In vivo delivery of the caveolin-1 scaffolding domain inhibits nitric oxide synthesis and reduces inflammation." Nat Med**6**(12): 1362-1367.
- Burroughs, S. K., S. Kaluz, D. Wang, K. Wang, E. G. Van Meir and B. Wang** (2013). "Hypoxia inducible factor pathway inhibitors as anticancer therapeutics." Future Med Chem**5**(5): 553-572.
- Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, J. P. Hieble, S. Z. Langer, R. J. Lefkowitz, K. P. Minneman, P. B. Molinoff, R. R. Ruffolo, Jr. and U. Trendelenburg** (1994). "International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors." Pharmacol Rev**46**(2): 121-136.
- Cadenas, E.** (2004). "Mitochondrial free radical production and cell signaling." Mol Aspects Med**25**(1-2): 17-26.
- Callebert, J., J. M. Esteve, P. Herve, K. Peoc'h, C. Tournois, L. Drouet, J. M. Launay and L. Maroteaux** (2006). "Evidence for a control of plasma serotonin levels by 5-hydroxytryptamine(2B) receptors in mice." J Pharmacol Exp Ther**317**(2): 724-731.
- Camello-Almaraz, C., P. J. Gomez-Pinilla, M. J. Pozo and P. J. Camello** (2006). "Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling." Am J Physiol Cell Physiol**291**(5): C1082-1088.
- Carrillo-Sepulveda, M. A. and T. Matsumoto** (2014). "Phenotypic Modulation of Mesenteric Vascular Smooth Muscle Cells from Type 2 Diabetic Rats is Associated with Decreased Caveolin-1 Expression." Cell Physiol Biochem**34**(5): 1497-1506.
- Caspar, D. L., D. A. Goodenough, L. Makowski and W. C. Phillips** (1977). "Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction." J Cell Biol**74**(2): 605-628.
- Chadjichristos, C. E., S. Morel, J. P. Derouette, E. Sutter, I. Roth, A. C. Brisset, M. L. Bochaton-Piallat and B. R. Kwak** (2008). "Targeting connexin 43 prevents platelet-derived growth factor-BB-induced phenotypic change in porcine coronary artery smooth muscle cells." Circ Res**102**(6): 653-660.

- Chakraborti, T., S. K. Ghosh, J. R. Michael and S. Chakraborti** (1996). "Role of an aprotinin-sensitive protease in the activation of Ca(2+)-ATPase by superoxide radical (O₂⁻) in microsomes of pulmonary vascular smooth muscle." Biochem J**317** (Pt 3): 885-890.
- Chalmers, S. and J. G. McCarron** (2009). "Inhibition of mitochondrial calcium uptake rather than efflux impedes calcium release by inositol-1,4,5-trisphosphate-sensitive receptors." Cell Calcium**46**(2): 107-113.
- Chaouat, A., R. Naeije and E. Weitzenblum** (2008). "Pulmonary hypertension in COPD." Eur Respir J**32**(5): 1371-1385.
- Cheranov, S. Y. and J. H. Jaggari** (2004). "Mitochondrial modulation of Ca²⁺ sparks and transient K_{Ca} currents in smooth muscle cells of rat cerebral arteries." J Physiol**556**(Pt 3): 755-771.
- Cherry, P. D., H. A. Omar, K. A. Farrell, J. S. Stuart and M. S. Wolin** (1990). "Superoxide anion inhibits cGMP-associated bovine pulmonary arterial relaxation." Am J Physiol**259**(4 Pt 2): H1056-1062.
- Chkourko, H. S., G. Guerrero-Serna, X. Lin, N. Darwish, J. R. Pohlmann, K. E. Cook, J. R. Martens, E. Rothenberg, H. Musa and M. Delmar** (2012). "Remodeling of mechanical junctions and of microtubule-associated proteins accompany cardiac connexin43 lateralization." Heart Rhythm**9**(7): 1133-1140 e1136.
- Cogolludo, A., L. Moreno, F. Lodi, G. Frazziano, L. Cobeno, J. Tamargo and F. Perez-Vizcaino** (2006). "Serotonin inhibits voltage-gated K⁺ currents in pulmonary artery smooth muscle cells: role of 5-HT_{2A} receptors, caveolin-1, and KV1.5 channel internalization." Circ Res**98**(7): 931-938.
- Cohen, A. W., R. Hnasko, W. Schubert and M. P. Lisanti** (2004). "Role of caveolae and caveolins in health and disease." Physiol Rev**84**(4): 1341-1379.
- Compeer, M. G., M. J. Meens, T. M. Hackeng, W. A. Neugebauer, C. Holtke and J. G. De Mey** (2012). "Agonist-dependent modulation of arterial endothelinA receptor function." Br J Pharmacol**166**(6): 1833-1845.
- Contreras, L., I. Drago, E. Zampese and T. Pozzan** (2010). "Mitochondria: the calcium connection." Biochim Biophys Acta**1797**(6-7): 607-618.
- Cortassa, S., M. A. Aon, E. Marban, R. L. Winslow and B. O'Rourke** (2003). "An integrated model of cardiac mitochondrial energy metabolism and calcium dynamics." Biophys J**84**(4): 2734-2755.
- Cortijo, J., M. Marti-Cabrera, E. Bernabeu, T. Domenech, J. Bou, A. G. Fernandez, J. Beleta, J. M. Palacios and E. J. Morcillo** (1997). "Characterization of 5-HT receptors on human pulmonary artery and vein: functional and binding studies." Br J Pharmacol**122**(7): 1455-1463.

Cottrell, G. T. and J. M. Burt (2005). "Functional consequences of heterogeneous gap junction channel formation and its influence in health and disease." Biochim Biophys Acta**1711**(2): 126-141.

Cottrell, G. T., R. Lin, B. J. Warn-Cramer, A. F. Lau and J. M. Burt (2003). "Mechanism of v-Src- and mitogen-activated protein kinase-induced reduction of gap junction communication." Am J Physiol Cell Physiol**284**(2): C511-520.

Courboulin, A., V. L. Tremblay, M. Barrier, J. Meloche, M. H. Jacob, M. Chapolard, M. Bisserier, R. Paulin, C. Lambert, S. Provencher and S. Bonnet (2011). "Kruppel-like factor 5 contributes to pulmonary artery smooth muscle proliferation and resistance to apoptosis in human pulmonary arterial hypertension." Respir Res**12**: 128.

Cribbs, L. L. (2006). "T-type Ca²⁺ channels in vascular smooth muscle: multiple functions." Cell Calcium**40**(2): 221-230.

Csordas, G., A. P. Thomas and G. Hajnoczky (1999). "Quasi-synaptic calcium signal transmission between endoplasmic reticulum and mitochondria." Embo J**18**(1): 96-108.

Cushing, P., R. Bhalla, A. M. Johnson, W. J. Rushlow, S. O. Meakin and D. J. Belliveau (2005). "Nerve growth factor increases connexin43 phosphorylation and gap junctional intercellular communication." J Neurosci Res**82**(6): 788-801.

Da Prada, M. and G. B. Picotti (1979). "Content and subcellular localization of catecholamines and 5-hydroxytryptamine in human and animal blood platelets: monoamine distribution between platelets and plasma." Br J Pharmacol**65**(4): 653-662.

Davidson, S. M. and M. R. Duchen (2006). "Calcium microdomains and oxidative stress." Cell Calcium**40**(5-6): 561-574.

de Wit, C., B. Hoepfl and S. E. Wolfle (2006). "Endothelial mediators and communication through vascular gap junctions." Biol Chem**387**(1): 3-9.

Decrock, E., M. Vinken, E. De Vuyst, D. V. Krysko, K. D'Herde, T. Vanhaecke, P. Vandenamele, V. Rogiers and L. Leybaert (2009). "Connexin-related signaling in cell death: to live or let die?" Cell Death Differ**16**(4): 524-536.

Deluca, H. F. and G. W. Engstrom (1961). "Calcium uptake by rat kidney mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A**47**: 1744-1750.

Dempsie, Y. and M. R. MacLean (2008). "Pulmonary hypertension: therapeutic targets within the serotonin system." Br J Pharmacol**155**(4): 455-462.

Desjardins, F., I. Lobysheva, M. Pelat, B. Gallez, O. Feron, C. Dessy and J. L. Balligand (2008). "Control of blood pressure variability in caveolin-1-deficient mice: role of nitric oxide identified in vivo through spectral analysis." Cardiovasc Res**79**(3): 527-536.

Dhein, S. and H. J. Jongsma (2004). "Forming the network-gap junctions in the cardiovascular system." Cardiovasc Res**62**(2): 225-227.

Dhillon, S. (2014). "Macitentan: a review of its use in patients with pulmonary arterial hypertension." Drugs**74**(13): 1495-1507.

Dikalov, S., K. K. Griendling and D. G. Harrison (2007). "Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies." Hypertension**49**(4): 717-727.

Dikalov, S. I., W. Li, P. Mehranpour, S. S. Wang and A. M. Zafari (2007). "Production of extracellular superoxide by human lymphoblast cell lines: comparison of electron spin resonance techniques and cytochrome C reduction assay." Biochem Pharmacol**73**(7): 972-980.

Doyle, D. D., J. Upshaw-Earley, E. Bell and H. C. Palfrey (2003). "Expression of caveolin-3 in rat aortic vascular smooth muscle cells is determined by developmental state." Biochem Biophys Res Commun**304**(1): 22-25.

Drab, M., P. Verkade, M. Elger, M. Kasper, M. Lohn, B. Lauterbach, J. Menne, C. Lindschau, F. Mende, F. C. Luft, A. Schedl, H. Haller and T. V. Kurzchalia (2001). "Loss of caveolae, vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice." Science**293**(5539): 2449-2452.

Dromparis, P. and E. D. Michelakis (2013). "Mitochondria in vascular health and disease." Annu Rev Physiol**75**: 95-126.

Duan, D. D. (2011). "The ClC-3 chloride channels in cardiovascular disease." Acta Pharmacol Sin**32**(6): 675-684.

Dubois, M., E. Delannoy, L. Duluc, E. Closs, H. Li, C. Toussaint, A. P. Gadeau, A. Godecke, V. Freund-Michel, A. Courtois, R. Marthan, J. P. Savineau and B. Muller (2013). "Biopterin metabolism and eNOS expression during hypoxic pulmonary hypertension in mice." PLoS One**8**(11): e82594.

Ducret, T., C. Guibert, R. Marthan and J. P. Savineau (2008). "Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells." Cell Calcium**43**(4): 315-323.

Dupont, E., A. el Aoumari, J. P. Briand, C. Fromaget and D. Gros (1989). "Cross-linking of cardiac gap junction connexons by thiol/disulfide exchanges." J Membr Biol**108**(3): 247-252.

Dupuis, J., D. J. Stewart, P. Cernacek and G. Gosselin (1996). "Human pulmonary circulation is an important site for both clearance and production of endothelin-1." Circulation**94**(7): 1578-1584.

Eddahibi, S. and S. Adnot (2006). "[Serotonin and pulmonary arterial hypertension]." Rev Mal Respir**23 Suppl 2**: 4S45-44S51.

Eddahibi, S., V. Fabre, C. Boni, M. P. Martres, B. Raffestin, M. Hamon and S. Adnot (1999). "Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin." Circ Res**84**(3): 329-336.

- Eddahibi, S., C. Guignabert, A. M. Barlier-Mur, L. Dewachter, E. Fadel, P. Dartevelle, M. Humbert, G. Simonneau, N. Hanoun, F. Saurini, M. Hamon and S. Adnot** (2006). "Cross talk between endothelial and smooth muscle cells in pulmonary hypertension: critical role for serotonin-induced smooth muscle hyperplasia." Circulation**113**(15): 1857-1864.
- Eddahibi, S., N. Hanoun, L. Lanfumey, K. P. Lesch, B. Raffestin, M. Hamon and S. Adnot** (2000). "Attenuated hypoxic pulmonary hypertension in mice lacking the 5-hydroxytryptamine transporter gene." J Clin Invest**105**(11): 1555-1562.
- Eddahibi, S., M. Humbert, E. Fadel, B. Raffestin, M. Darmon, F. Capron, G. Simonneau, P. Dartevelle, M. Hamon and S. Adnot** (2001). "Serotonin transporter overexpression is responsible for pulmonary artery smooth muscle hyperplasia in primary pulmonary hypertension." J Clin Invest**108**(8): 1141-1150.
- Edwards, G., M. Feletou and A. H. Weston** (2010). "Endothelium-derived hyperpolarising factors and associated pathways: a synopsis." Pflugers Arch**459**(6): 863-879.
- Endele, S., M. Fuhry, S. J. Pak, B. U. Zabel and A. Winterpacht** (1999). "LETM1, a novel gene encoding a putative EF-hand Ca(2+)-binding protein, flanks the Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS) critical region and is deleted in most WHS patients." Genomics**60**(2): 218-225.
- Erspamer, V. and B. Asero** (1952). "Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine." Nature**169**(4306): 800-801.
- Faber, J. E., C. L. Szymeczek, S. Cotecchia, S. A. Thomas, A. Tanoue, G. Tsujimoto and H. Zhang** (2007). "Alpha1-adrenoceptor-dependent vascular hypertrophy and remodeling in murine hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol**292**(5): H2316-2323.
- Falk, M. M., R. M. Kells and V. M. Berthoud** (2014). "Degradation of connexins and gap junctions." FEBS Lett**588**(8): 1221-1229.
- Faraci, F. M.** (2003). "Vascular protection." Stroke**34**(2): 327-329.
- Faraci, F. M. and S. P. Didion** (2004). "Vascular protection: superoxide dismutase isoforms in the vessel wall." Arterioscler Thromb Vasc Biol**24**(8): 1367-1373.
- Feron, O., C. Dessy, J. P. Desager and J. L. Balligand** (2001). "Hydroxy-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibition promotes endothelial nitric oxide synthase activation through a decrease in caveolin abundance." Circulation**103**(1): 113-118.
- Figuroa, X. F. and B. R. Duling** (2009). "Gap junctions in the control of vascular function." Antioxid Redox Signal**11**(2): 251-266.
- Filippi, S., A. Parenti, S. Donnini, H. J. Granger, A. Fazzini and F. Ledda** (2001). "alpha(1D)-adrenoceptors cause endothelium-dependent vasodilatation in the rat mesenteric vascular bed." J Pharmacol Exp Ther**296**(3): 869-875.

- Fleming, I.** (2010). "Molecular mechanisms underlying the activation of eNOS." Pflugers Arch**459**(6): 793-806.
- Flierl, M. A., D. Rittirsch, M. Huber-Lang, J. V. Sarma and P. A. Ward** (2008). "Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box?" Mol Med**14**(3-4): 195-204.
- Fong, J. T., R. M. Kells, A. M. Gumpert, J. Y. Marzillier, M. W. Davidson and M. M. Falk** (2012). "Internalized gap junctions are degraded by autophagy." Autophagy**8**(5): 794-811.
- Fontes, M. S., T. A. van Veen, J. M. de Bakker and H. V. van Rijen** (2012). "Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart." Biochim Biophys Acta**1818**(8): 2020-2029.
- Forman, H. J., H. Zhang and A. Rinna** (2009). "Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis." Mol Aspects Med**30**(1-2): 1-12.
- Fowler, S. L., M. Akins, H. Zhou, D. Figeys and S. A. Bennett** (2013). "The liver connexin32 interactome is a novel plasma membrane-mitochondrial signaling nexus." J Proteome Res**12**(6): 2597-2610.
- Frank, P. G., H. Lee, D. S. Park, N. N. Tandon, P. E. Scherer and M. P. Lisanti** (2004). "Genetic ablation of caveolin-1 confers protection against atherosclerosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol**24**(1): 98-105.
- Freund-Michel, V., C. Guibert, M. Dubois, A. Courtois, R. Marthan, J. P. Savineau and B. Muller** (2013). "Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension." Ther Adv Respir Dis**7**(3): 175-200.
- Freund-Michel, V., N. Khoyarattee, J. P. Savineau, B. Muller and C. Guibert** (2014). "Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension." Int J Biochem Cell Biol.
- Fry, C. H., G. Sui and C. Wu** (2006). "T-type Ca²⁺ channels in non-vascular smooth muscles." Cell Calcium**40**(2): 231-239.
- Gabriels, J. E. and D. L. Paul** (1998). "Connexin43 is highly localized to sites of disturbed flow in rat aortic endothelium but connexin37 and connexin40 are more uniformly distributed." Circ Res**83**(6): 636-643.
- Gaietta, G., T. J. Deerinck, S. R. Adams, J. Bouwer, O. Tour, D. W. Laird, G. E. Sosinsky, R. Y. Tsien and M. H. Ellisman** (2002). "Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking." Science**296**(5567): 503-507.
- Gairhe, S., N. N. Bauer, S. A. Gebb and I. F. McMurtry** (2011). "Myoendothelial gap junctional signaling induces differentiation of pulmonary arterial smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**301**(4): L527-535.
- Gairhe, S., N. N. Bauer, S. A. Gebb and I. F. McMurtry** (2012). "Serotonin passes through myoendothelial gap junctions to promote pulmonary arterial smooth muscle cell differentiation." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**303**(9): L767-777.

Galie, N., D. Badesch, R. Oudiz, G. Simonneau, M. D. McGoon, A. M. Keogh, A. E. Frost, D. Zwicke, R. Naeije, S. Shapiro, H. Olschewski and L. J. Rubin (2005). "Ambrisentan therapy for pulmonary arterial hypertension." J Am Coll Cardiol**46**(3): 529-535.

Garcia-Cardena, G., P. Martasek, B. S. Masters, P. M. Skidd, J. Couet, S. Li, M. P. Lisanti and W. C. Sessa (1997). "Dissecting the interaction between nitric oxide synthase (NOS) and caveolin. Functional significance of the nos caveolin binding domain in vivo." J Biol Chem**272**(41): 25437-25440.

Garcia-Perez, C., S. S. Roy, S. Naghdi, X. Lin, E. Davies and G. Hajnoczky (2012). "Bid-induced mitochondrial membrane permeabilization waves propagated by local reactive oxygen species (ROS) signaling." Proc Natl Acad Sci U S A**109**(12): 4497-4502.

Gellhaus, A., X. Dong, S. Propson, K. Maass, L. Klein-Hitpass, M. Kibschull, O. Traub, K. Willecke, B. Perbal, S. J. Lye and E. Winterhager (2004). "Connexin43 interacts with NOV: a possible mechanism for negative regulation of cell growth in choriocarcinoma cells." J Biol Chem**279**(35): 36931-36942.

Geneau, G., N. Defamie, M. Mesnil and L. Cronier (2007). "Endothelin1-induced Ca(2+) mobilization is altered in calvarial osteoblastic cells of Cx43(+/-) mice." J Membr Biol**217**(1-3): 71-81.

Geneau, G., C. Lamiche, C. Niger, P. O. Strale, J. Clarhaut, N. Defamie, F. Debais, M. Mesnil and L. Cronier (2010). "Effect of endothelin-1 on osteoblastic differentiation is modified by the level of connexin43: comparative study on calvarial osteoblastic cells isolated from Cx43+/- and Cx43+/+ mice." Cell Tissue Res**340**(1): 103-115.

Ghafourifar, P. and C. Richter (1997). "Nitric oxide synthase activity in mitochondria." FEBS Lett**418**(3): 291-296.

Giacomello, M., I. Drago, M. Bortolozzi, M. Scorzeto, A. Gianelle, P. Pizzo and T. Pozzan (2010). "Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels." Mol Cell**38**(2): 280-290.

Glusa, E. and H. H. Pertz (2000). "Further evidence that 5-HT-induced relaxation of pig pulmonary artery is mediated by endothelial 5-HT(2B) receptors." Br J Pharmacol**130**(3): 692-698.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2003). "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." Nat Rev Mol Cell Biol**4**(4): 285-294.

Goodenough, D. A. and D. L. Paul (2009). "Gap junctions." Cold Spring Harb Perspect Biol**1**(1): a002576.

Goodenough, D. A. and J. P. Revel (1970). "A fine structural analysis of intercellular junctions in the mouse liver." J Cell Biol**45**(2): 272-290.

Goto, K. (2001). "Basic and therapeutic relevance of endothelin-mediated regulation." Biol Pharm Bull**24**(11): 1219-1230.

- Graf, G. A., P. M. Connell, D. R. van der Westhuyzen and E. J. Smart** (1999). "The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high density lipoprotein cholesterol ethers into caveolae." J Biol Chem**274**(17): 12043-12048.
- Gratton, J. P., P. Bernatchez and W. C. Sessa** (2004). "Caveolae and caveolins in the cardiovascular system." Circ Res**94**(11): 1408-1417.
- Graziani, A., V. Bricko, M. Carmignani, W. F. Graier and K. Groschner** (2004). "Cholesterol- and caveolin-rich membrane domains are essential for phospholipase A2-dependent EDHF formation." Cardiovasc Res**64**(2): 234-242.
- Griendling, K. K., D. Sorescu, B. Lassegue and M. Ushio-Fukai** (2000). "Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology." Arterioscler Thromb Vasc Biol**20**(10): 2175-2183.
- Grynkiewicz, G., M. Poenie and R. Y. Tsien** (1985). "A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties." J Biol Chem**260**(6): 3440-3450.
- Guibert, C., T. Ducret and J. P. Savineau** (2008). "Voltage-independent calcium influx in smooth muscle." Prog Biophys Mol Biol**98**(1): 10-23.
- Guibert, C., R. Marthan and J. P. Savineau** (1996). "Angiotensin II-induced Ca²⁺-oscillations in vascular myocytes from the rat pulmonary artery." Am J Physiol**270**(4 Pt 1): L637-642.
- Guibert, C., R. Marthan and J. P. Savineau** (2004). "5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**286**(6): L1228-1236.
- Guibert, C., P. Pacaud, G. Loirand, R. Marthan and J. P. Savineau** (1996). "Effect of extracellular ATP on cytosolic Ca²⁺ concentration in rat pulmonary artery myocytes." Am J Physiol**271**(3 Pt 1): L450-458.
- Guibert, C., J. P. Savineau, H. Crevel, R. Marthan and E. Rousseau** (2005). "Effect of short-term organoid culture on the pharmaco-mechanical properties of rat extra- and intrapulmonary arteries." Br J Pharmacol**146**(5): 692-701.
- Guignabert, C., M. Izikki, L. I. Tu, Z. Li, P. Zadigue, A. M. Barlier-Mur, N. Hanoun, D. Rodman, M. Hamon, S. Adnot and S. Eddahibi** (2006). "Transgenic mice overexpressing the 5-hydroxytryptamine transporter gene in smooth muscle develop pulmonary hypertension." Circ Res**98**(10): 1323-1330.
- Guignabert, C., B. Raffestin, R. Benferhat, W. Raoul, P. Zadigue, D. Rideau, M. Hamon, S. Adnot and S. Eddahibi** (2005). "Serotonin transporter inhibition prevents and reverses monocrotaline-induced pulmonary hypertension in rats." Circulation**111**(21): 2812-2819.
- Gupte, S. A. and M. S. Wolin** (2008). "Oxidant and redox signaling in vascular oxygen sensing: implications for systemic and pulmonary hypertension." Antioxid Redox Signal**10**(6): 1137-1152.

- Haddad, F., K. Kudelko, O. Mercier, B. Vrtovec, R. T. Zamanian and V. de Jesus Perez** (2011). "Pulmonary hypertension associated with left heart disease: characteristics, emerging concepts, and treatment strategies." Prog Cardiovasc Dis**54**(2): 154-167.
- Hajnoczky, G., L. D. Robb-Gaspers, M. B. Seitz and A. P. Thomas** (1995). "Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria." Cell**82**(3): 415-424.
- Harrison, R.** (2002). "Structure and function of xanthine oxidoreductase: where are we now?" Free Radic Biol Med**33**(6): 774-797.
- Hassoun, P. M., F. S. Yu, A. L. Shedd, J. J. Zulueta, V. J. Thannickal, J. J. Lanzillo and B. L. Fanburg** (1994). "Regulation of endothelial cell xanthine dehydrogenase xanthine oxidase gene expression by oxygen tension." Am J Physiol**266**(2 Pt 1): L163-171.
- Hawkins, B. J., M. Madesh, C. J. Kirkpatrick and A. B. Fisher** (2007). "Superoxide flux in endothelial cells via the chloride channel-3 mediates intracellular signaling." Mol Biol Cell**18**(6): 2002-2012.
- Heberlein, K. R., A. C. Straub and B. E. Isakson** (2009). "The myoendothelial junction: breaking through the matrix?" Microcirculation**16**(4): 307-322.
- Heller, R., A. Unbehau, B. Schellenberg, B. Mayer, G. Werner-Felmayer and E. R. Werner** (2001). "L-ascorbic acid potentiates endothelial nitric oxide synthesis via a chemical stabilization of tetrahydrobiopterin." J Biol Chem**276**(1): 40-47.
- Herve, J. C., N. Bourmeyster, D. Sarrouilhe and H. S. Duffy** (2007). "Gap junctional complexes: from partners to functions." Prog Biophys Mol Biol**94**(1-2): 29-65.
- Herve, J. C. and M. Derangeon** (2013). "Gap-junction-mediated cell-to-cell communication." Cell Tissue Res**352**(1): 21-31.
- Herve, J. C., M. Derangeon, M. Theveniau-Ruissy, L. Miquerol, D. Sarrouilhe and D. Gros** (2008). "[Connexins and junctional channels. Roles in the spreading of cardiac electrical excitation and heart development]." Pathol Biol (Paris)**56**(5): 334-341.
- Herve, P., J. M. Launay, M. L. Scrobhaci, F. Brenot, G. Simonneau, P. Petitpretz, P. Poubeau, J. Cerrina, P. Duroux and L. Drouet** (1995). "Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension." Am J Med**99**(3): 249-254.
- Hilenski, L. L., R. E. Clempus, M. T. Quinn, J. D. Lambeth and K. K. Griendling** (2004). "Distinct subcellular localizations of Nox1 and Nox4 in vascular smooth muscle cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol**24**(4): 677-683.
- Hirano, K.** (2007). "Current topics in the regulatory mechanism underlying the Ca²⁺ sensitization of the contractile apparatus in vascular smooth muscle." J Pharmacol Sci**104**(2): 109-115.
- Hirata, Y., T. Emori, S. Eguchi, K. Kanno, T. Imai, K. Ohta and F. Marumo** (1993). "Endothelin receptor subtype B mediates synthesis of nitric oxide by cultured bovine endothelial cells." J Clin Invest**91**(4): 1367-1373.

- Hironaka, E., M. Hongo, A. Sakai, E. Mawatari, F. Terasawa, N. Okumura, A. Yamazaki, Y. Ushiyama, Y. Yazaki and O. Kinoshita** (2003). "Serotonin receptor antagonist inhibits monocrotaline-induced pulmonary hypertension and prolongs survival in rats." Cardiovasc Res**60**(3): 692-699.
- Hoffmann, C., M. R. Leitz, S. Oberdorf-Maass, M. J. Lohse and K. N. Klotz** (2004). "Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**369**(2): 151-159.
- Hoh, J. H., R. Lal, S. A. John, J. P. Revel and M. F. Arnsdorf** (1991). "Atomic force microscopy and dissection of gap junctions." Science**253**(5026): 1405-1408.
- Hoh, J. H., G. E. Sosinsky, J. P. Revel and P. K. Hansma** (1993). "Structure of the extracellular surface of the gap junction by atomic force microscopy." Biophys J**65**(1): 149-163.
- Horinouchi, T., K. Terada, T. Higashi and S. Miwa** (2013). "Endothelin receptor signaling: new insight into its regulatory mechanisms." J Pharmacol Sci**123**(2): 85-101.
- Hoth, M., C. M. Fanger and R. S. Lewis** (1997). "Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes." J Cell Biol**137**(3): 633-648.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, J. R. Fozard, P. R. Hartig, G. R. Martin, E. J. Mylecharane, P. R. Saxena and P. P. Humphrey** (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev**46**(2): 157-203.
- Hoyer, D., J. P. Hannon and G. R. Martin** (2002). "Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors." Pharmacol Biochem Behav**71**(4): 533-554.
- Huang, G. Y., A. Wessels, B. R. Smith, K. K. Linask, J. L. Ewart and C. W. Lo** (1998). "Alteration in connexin 43 gap junction gene dosage impairs conotruncal heart development." Dev Biol**198**(1): 32-44.
- Huang, J., J. H. Wolk, M. H. Gewitz and R. Mathew** (2012). "Caveolin-1 expression during the progression of pulmonary hypertension." Exp Biol Med (Maywood)**237**(8): 956-965.
- Humbert, M., O. Sitbon, A. Chaouat, M. Bertocchi, G. Habib, V. Gressin, A. Yaici, E. Weitzenblum, J. F. Cordier, F. Chabot, C. Dromer, C. Pison, M. Reynaud-Gaubert, A. Haloun, M. Laurent, E. Hachulla, V. Cottin, B. Degano, X. Jais, D. Montani, R. Souza and G. Simonneau** (2010). "Survival in patients with idiopathic, familial, and anorexigen-associated pulmonary arterial hypertension in the modern management era." Circulation**122**(2): 156-163.
- Hussain, M. B. and I. Marshall** (1997). "Characterization of alpha1-adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery and pulmonary artery." Br J Pharmacol**122**(5): 849-858.

- Hyduk, A., J. B. Croft, C. Ayala, K. Zheng, Z. J. Zheng and G. A. Mensah** (2005). "Pulmonary hypertension surveillance--United States, 1980-2002." MMWR Surveill Summ**54**(5): 1-28.
- Hyvelin, J. M., C. Guibert, R. Marthan and J. P. Savineau** (1998). "Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes." Am J Physiol**275**(2 Pt 1): L269-282.
- Hyvelin, J. M., K. Howell, A. Nichol, C. M. Costello, R. J. Preston and P. McLoughlin** (2005). "Inhibition of Rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation." Circ Res**97**(2): 185-191.
- Ishii, K., K. Hirose and M. Iino** (2006). "Ca²⁺ shuttling between endoplasmic reticulum and mitochondria underlying Ca²⁺ oscillations." EMBO Rep**7**(4): 390-396.
- Jahnichen, S., E. Glusa and H. H. Pertz** (2005). "Evidence for 5-HT_{2B} and 5-HT₇ receptor-mediated relaxation in pulmonary arteries of weaned pigs." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**371**(1): 89-98.
- Jarasch, E. D., C. Grund, G. Bruder, H. W. Heid, T. W. Keenan and W. W. Franke** (1981). "Localization of xanthine oxidase in mammary-gland epithelium and capillary endothelium." Cell**25**(1): 67-82.
- Je, H. D., C. Gallant, P. C. Leavis and K. G. Morgan** (2004). "Caveolin-1 regulates contractility in differentiated vascular smooth muscle." Am J Physiol Heart Circ Physiol**286**(1): H91-98.
- Jeffery, T. K., L. J. Bryan-Lluka and J. C. Wanstall** (2000). "Specific uptake of 5-hydroxytryptamine is reduced in lungs from hypoxic pulmonary hypertensive rats." Eur J Pharmacol**396**(2-3): 137-140.
- Jernigan, N. L., B. R. Walker and T. C. Resta** (2008). "Reactive oxygen species mediate RhoA/Rho kinase-induced Ca²⁺ sensitization in pulmonary vascular smooth muscle following chronic hypoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**295**(3): L515-529.
- Jiang, D., L. Zhao and D. E. Clapham** (2009). "Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter." Science**326**(5949): 144-147.
- Jiang, D., L. Zhao, C. B. Clish and D. E. Clapham** (2013). "Letm1, the mitochondrial Ca²⁺/H⁺ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A**110**(24): E2249-2254.
- Jin, S., Y. Zhang, F. Yi and P. L. Li** (2008). "Critical role of lipid raft redox signaling platforms in endostatin-induced coronary endothelial dysfunction." Arterioscler Thromb Vasc Biol**28**(3): 485-490.
- John, S. A. and J. P. Revel** (1991). "Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43." Biochem Biophys Res Commun**178**(3): 1312-1318.

Johnson, D. E. and M. K. Georgieff (1989). "Pulmonary neuroendocrine cells. Their secretory products and their potential roles in health and chronic lung disease in infancy." Am Rev Respir Dis**140**(6): 1807-1812.

Johnstone, S. R., A. K. Best, C. S. Wright, B. E. Isakson, R. J. Errington and P. E. Martin (2010). "Enhanced connexin 43 expression delays intra-mitotic duration and cell cycle traverse independently of gap junction channel function." J Cell Biochem**110**(3): 772-782.

Johnstone, S. R., B. M. Kroncke, A. C. Straub, A. K. Best, C. A. Dunn, L. A. Mitchell, Y. Peskova, R. K. Nakamoto, M. Koval, C. W. Lo, P. D. Lampe, L. Columbus and B. E. Isakson (2012). "MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation." Circ Res**111**(2): 201-211.

Johnstone, S. R., J. Ross, M. J. Rizzo, A. C. Straub, P. D. Lampe, N. Leitinger and B. E. Isakson (2009). "Oxidized phospholipid species promote in vivo differential cx43 phosphorylation and vascular smooth muscle cell proliferation." Am J Pathol**175**(2): 916-924.

Jordan, K., R. Chodock, A. R. Hand and D. W. Laird (2001). "The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization." J Cell Sci**114**(Pt 4): 763-773.

Kanai, Y., S. Hori, T. Tanaka, M. Yasuoka, K. Watanabe, N. Aikawa and Y. Hosoda (1993). "Role of 5-hydroxytryptamine in the progression of monocrotaline induced pulmonary hypertension in rats." Cardiovasc Res**27**(9): 1619-1623.

Kapakos, G., A. Bouallegue, G. B. Daou and A. K. Srivastava (2010). "Modulatory Role of Nitric Oxide/cGMP System in Endothelin-1-Induced Signaling Responses in Vascular Smooth Muscle Cells." Curr Cardiol Rev**6**(4): 247-254.

Karagiannis, J., M. Rand and C. G. Li (2004). "Role of gap junctions in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated vasodilatation in rat renal artery." Acta Pharmacol Sin**25**(8): 1031-1037.

Karau, K. L., R. C. Molthen, A. Dhyani, S. T. Haworth, C. C. Hanger, D. L. Roerig, R. H. Johnson and C. A. Dawson (2001). "Pulmonary arterial morphometry from microfocal X-ray computed tomography." Am J Physiol Heart Circ Physiol**281**(6): H2747-2756.

Katayose, D., M. Ohe, K. Yamauchi, M. Ogata, K. Shirato, H. Fujita, S. Shibahara and T. Takishima (1993). "Increased expression of PDGF A- and B-chain genes in rat lungs with hypoxic pulmonary hypertension." Am J Physiol**264**(2 Pt 1): L100-106.

Kausalya, P. J., M. Reichert and W. Hunziker (2001). "Connexin45 directly binds to ZO-1 and localizes to the tight junction region in epithelial MDCK cells." FEBS Lett**505**(1): 92-96.

Keegan, A., I. Morecroft, D. Smillie, M. N. Hicks and M. R. MacLean (2001). "Contribution of the 5-HT(1B) receptor to hypoxia-induced pulmonary hypertension: converging evidence using 5-HT(1B)-receptor knockout mice and the 5-HT(1B/1D)-receptor antagonist GR127935." Circ Res**89**(12): 1231-1239.

Kereveur, A., J. Callebert, M. Humbert, P. Herve, G. Simonneau, J. M. Launay and L. Drouet (2000). "High plasma serotonin levels in primary pulmonary hypertension. Effect of

long-term epoprostenol (prostacyclin) therapy." Arterioscler Thromb Vasc Biol**20**(10): 2233-2239.

Kinney, N. P., F. X. Boittin, J. M. Thomas, A. Galione and A. M. Evans (2004). "Lysosome-sarcoplasmic reticulum junctions. A trigger zone for calcium signaling by nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate and endothelin-1." J Biol Chem**279**(52): 54319-54326.

Kirichok, Y., G. Krapivinsky and D. E. Clapham (2004). "The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel." Nature**427**(6972): 360-364.

Kleschyov, A. L., P. Wenzel and T. Munzel (2007). "Electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping of biological nitric oxide." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci**851**(1-2): 12-20.

Knock, G. A., V. A. Snetkov, Y. Shaifta, M. Connolly, S. Drndarski, A. Noah, G. E. Pourmahram, S. Becker, P. I. Aaronson and J. P. Ward (2009). "Superoxide constricts rat pulmonary arteries via Rho-kinase-mediated Ca(2+) sensitization." Free Radic Biol Med**46**(5): 633-642.

Kohlhaas, M. and C. Maack (2013). "Calcium release microdomains and mitochondria." Cardiovasc Res**98**(2): 259-268.

Kolodgie, F. D., J. Narula, C. Yuan, A. P. Burke, A. V. Finn and R. Virmani (2007). "Elimination of neoangiogenesis for plaque stabilization: is there a role for local drug therapy?" J Am Coll Cardiol**49**(21): 2093-2101.

Konduri, G. G., I. Bakhutashvili, A. Eis and K. Pritchard, Jr. (2007). "Oxidant stress from uncoupled nitric oxide synthase impairs vasodilation in fetal lambs with persistent pulmonary hypertension." Am J Physiol Heart Circ Physiol**292**(4): H1812-1820.

Kuhr, F. K., K. A. Smith, M. Y. Song, I. Levitan and J. X. Yuan (2012). "New mechanisms of pulmonary arterial hypertension: role of Ca(2+)(+) signaling." Am J Physiol Heart Circ Physiol**302**(8): H1546-1562.

Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1986). "Cloning and characterization of human and rat liver cDNAs coding for a gap junction protein." J Cell Biol**103**(3): 767-776.

Kumar, N. M. and N. B. Gilula (1996). "The gap junction communication channel." Cell**84**(3): 381-388.

Kunita-Takanezawa, M., K. Abe, Y. Hirooka, Y. Kuwabara, K. Hirano, M. Oka and K. Sunagawa (2014). "Novel Dual Endothelin Receptor Antagonist Macitentan Reverses Severe Pulmonary Arterial Hypertension in Rats." J Cardiovasc Pharmacol.

Kwak, B. R., F. Mulhaupt, N. Veillard, D. B. Gros and F. Mach (2002). "Altered pattern of vascular connexin expression in atherosclerotic plaques." Arterioscler Thromb Vasc Biol**22**(2): 225-230.

Kwiatk, A. M., R. D. Minshall, D. R. Cool, R. A. Skidgel, A. B. Malik and C. Tiruppathi (2006). "Caveolin-1 regulates store-operated Ca²⁺ influx by binding of its scaffolding domain

to transient receptor potential channel-1 in endothelial cells." Mol Pharmacol**70**(4): 1174-1183.

Lacza, Z., E. Pankotai, A. Csordas, D. Gero, L. Kiss, E. M. Horvath, M. Kollai, D. W. Busija and C. Szabo (2006). "Mitochondrial NO and reactive nitrogen species production: does mtNOS exist?" Nitric Oxide**14**(2): 162-168.

Laing, J. G., B. C. Chou and T. H. Steinberg (2005). "ZO-1 alters the plasma membrane localization and function of Cx43 in osteoblastic cells." J Cell Sci**118**(Pt 10): 2167-2176.

Laing, J. G., M. Koval and T. H. Steinberg (2005). "Association with ZO-1 correlates with plasma membrane partitioning in truncated connexin45 mutants." J Membr Biol**207**(1): 45-53.

Laing, J. G., R. N. Manley-Markowski, M. Koval, R. Civitelli and T. H. Steinberg (2001). "Connexin45 interacts with zonula occludens-1 and connexin43 in osteoblastic cells." J Biol Chem**276**(25): 23051-23055.

Laird, D. W. (2006). "Life cycle of connexins in health and disease." Biochem J**394**(Pt 3): 527-543.

Laird, D. W., K. L. Puranam and J. P. Revel (1991). "Turnover and phosphorylation dynamics of connexin43 gap junction protein in cultured cardiac myocytes." Biochem J**273**(Pt 1): 67-72.

Lal, R., S. A. John, D. W. Laird and M. F. Arnsdorf (1995). "Heart gap junction preparations reveal hemiplaques by atomic force microscopy." Am J Physiol**268**(4 Pt 1): C968-977.

Landmesser, U. and D. G. Harrison (2001). "Oxidative stress and vascular damage in hypertension." Coron Artery Dis**12**(6): 455-461.

Landolfi, B., S. Curci, L. Debellis, T. Pozzan and A. M. Hofer (1998). "Ca²⁺ homeostasis in the agonist-sensitive internal store: functional interactions between mitochondria and the ER measured In situ in intact cells." J Cell Biol**142**(5): 1235-1243.

Langlois, S., K. N. Cowan, Q. Shao, B. J. Cowan and D. W. Laird (2008). "Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes." Mol Biol Cell**19**(3): 912-928.

Lau, A. T., Y. Wang and J. F. Chiu (2008). "Reactive oxygen species: current knowledge and applications in cancer research and therapeutic." J Cell Biochem**104**(2): 657-667.

Lauf, U., B. N. Giepmans, P. Lopez, S. Braconnot, S. C. Chen and M. M. Falk (2002). "Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(16): 10446-10451.

Launay, J. M., P. Herve, K. Peoc'h, C. Tournois, J. Callebert, C. G. Nebigil, N. Etienne, L. Drouet, M. Humbert, G. Simonneau and L. Maroteaux (2002). "Function of the serotonin 5-hydroxytryptamine 2B receptor in pulmonary hypertension." Nat Med**8**(10): 1129-1135.

- Lawrie, A., E. Spiekerkoetter, E. C. Martinez, N. Ambartsumian, W. J. Sheward, M. R. MacLean, A. J. Harmar, A. M. Schmidt, E. Lukanidin and M. Rabinovitch** (2005). "Interdependent serotonin transporter and receptor pathways regulate S100A4/Mts1, a gene associated with pulmonary vascular disease." Circ Res**97**(3): 227-235.
- Le Lay, S., G. Simard, M. C. Martinez and R. Andriantsitohaina** (2014). "Oxidative stress and metabolic pathologies: from an adipocentric point of view." Oxid Med Cell Longev**2014**: 908539.
- Leblais, V., E. Delannoy, F. Fresquet, H. Begueret, N. Bellance, S. Banquet, C. Allieres, L. Leroux, C. Desgranges, A. Gadeau and B. Muller** (2008). "beta-adrenergic relaxation in pulmonary arteries: preservation of the endothelial nitric oxide-dependent beta2 component in pulmonary hypertension." Cardiovasc Res**77**(1): 202-210.
- Lee, S. L., A. R. Simon, W. W. Wang and B. L. Fanburg** (2001). "H₂O₂ signals 5-HT-induced ERK MAP kinase activation and mitogenesis of smooth muscle cells." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**281**(3): L646-652.
- Lee, S. L., W. W. Wang and B. L. Fanburg** (1998). "Superoxide as an intermediate signal for serotonin-induced mitogenesis." Free Radic Biol Med**24**(5): 855-858.
- Lee, S. L., W. W. Wang, G. A. Finlay and B. L. Fanburg** (1999). "Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion." Am J Physiol**277**(2 Pt 1): L282-291.
- Lehninger, A. L., C. S. Rossi and J. W. Greenawalt** (1963). "Respiration-dependent accumulation of inorganic phosphate and Ca ions by rat liver mitochondria." Biochem Biophys Res Commun**10**: 444-448.
- Levin, E. R.** (1995). "Endothelins." N Engl J Med**333**(6): 356-363.
- Li, J. M. and A. M. Shah** (2004). "Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**287**(5): R1014-1030.
- Li, K. X., B. Fouty, I. F. McMurtry and D. M. Rodman** (1999). "Enhanced ET(A)-receptor-mediated inhibition of K_v channels in hypoxic hypertensive rat pulmonary artery myocytes." Am J Physiol**277**(1 Pt 2): H363-370.
- Li, P., S. H. Sur, R. E. Mistlberger and M. Morris** (1999). "Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice." Am J Physiol**276**(2 Pt 2): R500-504.
- Li, P. L., Y. Zhang and F. Yi** (2007). "Lipid raft redox signaling platforms in endothelial dysfunction." Antioxid Redox Signal**9**(9): 1457-1470.
- Liao, P., T. F. Yong, M. C. Liang, D. T. Yue and T. W. Soong** (2005). "Splicing for alternative structures of Cav1.2 Ca²⁺ channels in cardiac and smooth muscles." Cardiovasc Res**68**(2): 197-203.

- Liu, J. Q. and R. J. Folz** (2004). "Extracellular superoxide enhances 5-HT-induced murine pulmonary artery vasoconstriction." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**287**(1): L111-118.
- Liu, J. Q., I. N. Zelko, E. M. Erbynn, J. S. Sham and R. J. Folz** (2006). "Hypoxic pulmonary hypertension: role of superoxide and NADPH oxidase (gp91phox)." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**290**(1): L2-10.
- Liu, P., Y. Ying and R. G. Anderson** (1997). "Platelet-derived growth factor activates mitogen-activated protein kinase in isolated caveolae." Proc Natl Acad Sci U S A**94**(25): 13666-13670.
- Liu, Q., C. M. Wiener and N. A. Flavahan** (1998). "Superoxide and endothelium-dependent constriction to flow in porcine small pulmonary arteries." Br J Pharmacol**124**(2): 331-336.
- Liu, Y., G. Fiskum and D. Schubert** (2002). "Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain." J Neurochem**80**(5): 780-787.
- Locke, D., J. Liu and A. L. Harris** (2005). "Lipid rafts prepared by different methods contain different connexin channels, but gap junctions are not lipid rafts." Biochemistry**44**(39): 13027-13042.
- Lubrano, V. and S. Balzan** (2014). "LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage." Free Radic Res**48**(8): 841-848.
- Luke, T., J. Maylor, C. Udem, J. T. Sylvester and L. A. Shimoda** (2012). "Kinase-dependent activation of voltage-gated Ca²⁺ channels by ET-1 in pulmonary arterial myocytes during chronic hypoxia." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**302**(10): L1128-1139.
- Lyle, A. N. and K. K. Griendling** (2006). "Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species." Physiology (Bethesda)**21**: 269-280.
- Maack, C., S. Cortassa, M. A. Aon, A. N. Ganesan, T. Liu and B. O'Rourke** (2006). "Elevated cytosolic Na⁺ decreases mitochondrial Ca²⁺ uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes." Circ Res**99**(2): 172-182.
- Machida, T., K. Iizuka and M. Hirafuji** (2013). "5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls." Biol Pharm Bull**36**(9): 1416-1419.
- MacLean, M. R., R. A. Clayton, A. G. Templeton and I. Morecroft** (1996). "Evidence for 5-HT₁-like receptor-mediated vasoconstriction in human pulmonary artery." Br J Pharmacol**119**(2): 277-282.
- MacLean, M. R. and Y. Dempsie** (2009). "Serotonin and pulmonary hypertension--from bench to bedside?" Curr Opin Pharmacol**9**(3): 281-286.
- Maclean, M. R. and Y. Dempsie** (2010). "The serotonin hypothesis of pulmonary hypertension revisited." Adv Exp Med Biol**661**: 309-322.

- MacLean, M. R., P. Herve, S. Eddahibi and S. Adnot** (2000). "5-hydroxytryptamine and the pulmonary circulation: receptors, transporters and relevance to pulmonary arterial hypertension." Br J Pharmacol**131**(2): 161-168.
- MacLean, M. R., G. Sweeney, M. Baird, K. M. McCulloch, M. Houslay and I. Morecroft** (1996). "5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats." Br J Pharmacol**119**(5): 917-930.
- Madesh, M. and G. Hajnoczky** (2001). "VDAC-dependent permeabilization of the outer mitochondrial membrane by superoxide induces rapid and massive cytochrome c release." J Cell Biol**155**(6): 1003-1015.
- Madesh, M., B. J. Hawkins, T. Milovanova, C. D. Bhanumathy, S. K. Joseph, S. P. Ramachandrarao, K. Sharma, T. Kurosaki and A. B. Fisher** (2005). "Selective role for superoxide in InsP3 receptor-mediated mitochondrial dysfunction and endothelial apoptosis." J Cell Biol**170**(7): 1079-1090.
- Makowski, L., D. L. Caspar, W. C. Phillips and D. A. Goodenough** (1977). "Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data." J Cell Biol**74**(2): 629-645.
- Mannella, C. A., K. Buttle, B. K. Rath and M. Marko** (1998). "Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum." Biofactors**8**(3-4): 225-228.
- Marcos, E., E. Fadel, O. Sanchez, M. Humbert, P. Dartevelle, G. Simonneau, M. Hamon, S. Adnot and S. Eddahibi** (2004). "Serotonin-induced smooth muscle hyperplasia in various forms of human pulmonary hypertension." Circ Res**94**(9): 1263-1270.
- Martin, E., D. Dahan, G. Cardouat, J. Gillibert-Duplantier, R. Marthan, J. P. Savineau and T. Ducret** (2012). "Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells." Pflugers Arch**464**(3): 261-272.
- Martinez, M. C. and R. Andriantsitohaina** (2009). "Reactive nitrogen species: molecular mechanisms and potential significance in health and disease." Antioxid Redox Signal**11**(3): 669-702.
- Massimino, M. L., C. Griffoni, E. Spisni, M. Toni and V. Tomasi** (2002). "Involvement of caveolae and caveolae-like domains in signalling, cell survival and angiogenesis." Cell Signal**14**(2): 93-98.
- Mates, J. M. and F. Sanchez-Jimenez** (1999). "Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes." Front Biosci**4**: D339-345.
- Mather, S., K. A. Dora, S. L. Sandow, P. Winter and C. J. Garland** (2005). "Rapid endothelial cell-selective loading of connexin 40 antibody blocks endothelium-derived hyperpolarizing factor dilation in rat small mesenteric arteries." Circ Res**97**(4): 399-407.
- Mathew, R., J. Huang, U. S. Katta, U. Krishnan, C. Sandoval and M. H. Gewitz** (2011). "Immunosuppressant-induced endothelial damage and pulmonary arterial hypertension." J Pediatr Hematol Oncol**33**(1): 55-58.

- Mazzuca, M. Q. and R. A. Khalil** (2012). "Vascular endothelin receptor type B: structure, function and dysregulation in vascular disease." Biochem Pharmacol**84**(2): 147-162.
- McCarron, J. G., M. L. Olson and S. Chalmers** (2012). "Mitochondrial regulation of cytosolic Ca²⁺(+) signals in smooth muscle." Pflugers Arch**464**(1): 51-62.
- McGoon, M. D., R. L. Benza, P. Escribano-Subias, X. Jiang, D. P. Miller, A. J. Peacock, J. Pepke-Zaba, T. Pulido, S. Rich, S. Rosenkranz, S. Suissa and M. Humbert** (2013). "Pulmonary arterial hypertension: epidemiology and registries." J Am Coll Cardiol**62**(25 Suppl): D51-59.
- Means, A. R., M. F. VanBerkum, I. Bagchi, K. P. Lu and C. D. Rasmussen** (1991). "Regulatory functions of calmodulin." Pharmacol Ther**50**(2): 255-270.
- Mecham, R. P., L. A. Whitehouse, D. S. Wrenn, W. C. Parks, G. L. Griffin, R. M. Senior, E. C. Crouch, K. R. Stenmark and N. F. Voelkel** (1987). "Smooth muscle-mediated connective tissue remodeling in pulmonary hypertension." Science**237**(4813): 423-426.
- Michel, J. B., O. Feron, D. Sacks and T. Michel** (1997). "Reciprocal regulation of endothelial nitric-oxide synthase by Ca²⁺-calmodulin and caveolin." J Biol Chem**272**(25): 15583-15586.
- Miller, E. W., B. C. Dickinson and C. J. Chang** (2010). "Aquaporin-3 mediates hydrogen peroxide uptake to regulate downstream intracellular signaling." Proc Natl Acad Sci U S A**107**(36): 15681-15686.
- Miller, V. M. and P. M. Vanhoutte** (1985). "Endothelial alpha 2-adrenoceptors in canine pulmonary and systemic blood vessels." Eur J Pharmacol**118**(1-2): 123-129.
- Millhorn, D. E., R. Raymond, L. Conforti, W. Zhu, D. Beitner-Johnson, T. Filisko, M. B. Genter, S. Kobayashi and M. Peng** (1997). "Regulation of gene expression for tyrosine hydroxylase in oxygen sensitive cells by hypoxia." Kidney Int**51**(2): 527-535.
- Milovanova, T., S. Chatterjee, B. J. Hawkins, N. Hong, E. M. Sorokina, K. Debolt, J. S. Moore, M. Madesh and A. B. Fisher** (2008). "Caveolae are an essential component of the pathway for endothelial cell signaling associated with abrupt reduction of shear stress." Biochim Biophys Acta**1783**(10): 1866-1875.
- Mineo, C., G. L. James, E. J. Smart and R. G. Anderson** (1996). "Localization of epidermal growth factor-stimulated Ras/Raf-1 interaction to caveolae membrane." J Biol Chem**271**(20): 11930-11935.
- Minta, A., J. P. Kao and R. Y. Tsien** (1989). "Fluorescent indicators for cytosolic calcium based on rhodamine and fluorescein chromophores." J Biol Chem**264**(14): 8171-8178.
- Miyamoto, S., N. Nagaya, T. Satoh, S. Kyotani, F. Sakamaki, M. Fujita, N. Nakanishi and K. Miyatake** (2000). "Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing." Am J Respir Crit Care Med**161**(2 Pt 1): 487-492.

- Miyata, M., M. Ito, T. Sasajima, H. Ohira, Y. Sato and R. Kasukawa** (2000). "Development of monocrotaline-induced pulmonary hypertension is attenuated by a serotonin receptor antagonist." Lung**178**(2): 63-73.
- Mohammad-Zadeh, L. F., L. Moses and S. M. Gwaltney-Brant** (2008). "Serotonin: a review." J Vet Pharmacol Ther**31**(3): 187-199.
- Montani, D., X. Jais, V. Ios, O. Sitbon, G. Simonneau and M. Humbert** (2004). "[Treatments for pulmonary arterial hypertension]." Rev Med Interne**25**(10): 720-731.
- Moore, D. H. and H. Ruska** (1957). "The fine structure of capillaries and small arteries." J Biophys Biochem Cytol**3**(3): 457-462.
- Morecroft, I., R. P. Heeley, H. M. Prentice, A. Kirk and M. R. MacLean** (1999). "5-hydroxytryptamine receptors mediating contraction in human small muscular pulmonary arteries: importance of the 5-HT_{1B} receptor." Br J Pharmacol**128**(3): 730-734.
- Morecroft, I. and M. R. MacLean** (1998). "5-hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction and vasodilation in perinatal and adult rabbit small pulmonary arteries." Br J Pharmacol**125**(1): 69-78.
- Morel, S.** (2014). "Multiple roles of connexins in atherosclerosis- and restenosis-induced vascular remodelling." J Vasc Res**51**(2): 149-161.
- Moreno, A. P., G. I. Fishman and D. C. Spray** (1992). "Phosphorylation shifts unitary conductance and modifies voltage dependent kinetics of human connexin43 gap junction channels." Biophys J**62**(1): 51-53.
- Morimatsu, Y., N. Sakashita, Y. Komohara, K. Ohnishi, H. Masuda, D. Dahan, M. Takeya, C. Guibert and R. Marthan** (2012). "Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension." J Vasc Res**49**(1): 33-42.
- Munzel, T., I. B. Afanas'ev, A. L. Kleschyov and D. G. Harrison** (2002). "Detection of superoxide in vascular tissue." Arterioscler Thromb Vasc Biol**22**(11): 1761-1768.
- Munzel, T., A. Daiber, V. Ullrich and A. Mulsch** (2005). "Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase." Arterioscler Thromb Vasc Biol**25**(8): 1551-1557.
- Muramatsu, M.** (2001). "[Fawn-Hooded Rat; an animal model of development of pulmonary hypertension]." Nihon Rinsho**59**(6): 1070-1075.
- Murata, M., J. Peranen, R. Schreiner, F. Wieland, T. V. Kurzchalia and K. Simons** (1995). "VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein." Proc Natl Acad Sci U S A**92**(22): 10339-10343.
- Murata, T., M. I. Lin, R. V. Stan, P. M. Bauer, J. Yu and W. C. Sessa** (2007). "Genetic evidence supporting caveolae microdomain regulation of calcium entry in endothelial cells." J Biol Chem**282**(22): 16631-16643.

- Murphy, D. L., A. Lerner, G. Rudnick and K. P. Lesch** (2004). "Serotonin transporter: gene, genetic disorders, and pharmacogenetics." Mol Interv4(2): 109-123.
- Naeije, R. and L. Dewachter** (2007). "[Animal models of pulmonary arterial hypertension]." Rev Mal Respir24(4 Pt 1): 481-496.
- Nagaoka, T., M. Muramatsu, K. Sato, I. McMurtry, M. Oka and Y. Fukuchi** (2001). "Mild hypoxia causes severe pulmonary hypertension in fawn-hooded but not in Tester Moriyama rats." Respir Physiol127(1): 53-60.
- Nakashima, Y., A. S. Plump, E. W. Raines, J. L. Breslow and R. Ross** (1994). "ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree." Arterioscler Thromb14(1): 133-140.
- Nathan, S. D.** (2008). "Pulmonary hypertension in interstitial lung disease." Int J Clin Pract Suppl(160): 21-28.
- Nickel, A., M. Kohlhaas and C. Maack** (2014). "Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination." J Mol Cell Cardiol73: 26-33.
- Nielsen, M. S.** (2012). "Lateralized gap junctions in pulmonary hypertension: lost but not alone." Heart Rhythm9(7): 1141-1142.
- Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar and N. H. Holstein-Rathlou** (2012). "Gap junctions." Compr Physiol2(3): 1981-2035.
- Nielsen, M. S., L. N. Axelsen, P. L. Sorgen, V. Verma, M. Delmar and N. H. Holstein-Rathlou** (2013). "Gap junctions." Compr Physiol2(3): 1981-2035.
- Nilsson, D., A. Wackenfors, L. Gustafsson, M. Ugander, P. Paulsson, R. Ingemansson, L. Edvinsson and M. Malmsjo** (2008). "Endothelin receptor-mediated vasodilatation: effects of organ culture." Eur J Pharmacol579(1-3): 233-240.
- Nishino, T., K. Okamoto, B. T. Eger, E. F. Pai and T. Nishino** (2008). "Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase." Febs J275(13): 3278-3289.
- Okamoto, T., M. Akiyama, M. Takeda, N. Akita, K. Yoshida, T. Hayashi and K. Suzuki** (2011). "Connexin32 protects against vascular inflammation by modulating inflammatory cytokine expression by endothelial cells." Exp Cell Res317(3): 348-355.
- Okamoto, T., M. Akiyama, M. Takeda, E. C. Gabazza, T. Hayashi and K. Suzuki** (2009). "Connexin32 is expressed in vascular endothelial cells and participates in gap-junction intercellular communication." Biochem Biophys Res Commun382(2): 264-268.
- Orlandi, P. A. and P. H. Fishman** (1998). "Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains." J Cell Biol141(4): 905-915.

- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet** (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev**87**(1): 315-424.
- Paffett, M. L., J. S. Naik, M. A. Riddle, S. D. Menicucci, A. J. Gonzales, T. C. Resta and B. R. Walker** (2011). "Altered membrane lipid domains limit pulmonary endothelial calcium entry following chronic hypoxia." Am J Physiol Heart Circ Physiol**301**(4): H1331-1340.
- Palade, G. E.** (1953). "Fine structure of blood capillaries." J Appl Physiol **24**: 1424.
- Palatinus, J. A., J. M. Rhett and R. G. Gourdie** (2012). "The connexin43 carboxyl terminus and cardiac gap junction organization." Biochim Biophys Acta**1818**(8): 1831-1843.
- Panchin, Y., I. Kelmanson, M. Matz, K. Lukyanov, N. Usman and S. Lukyanov** (2000). "A ubiquitous family of putative gap junction molecules." Curr Biol**10**(13): R473-474.
- Paravicini, T. M. and R. M. Touyz** (2008). "NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities." Diabetes Care**31 Suppl 2**: S170-180.
- Parekh, A. B. and R. Penner** (1997). "Store depletion and calcium influx." Physiol Rev**77**(4): 901-930.
- Parton, R. G. and K. Simons** (2007). "The multiple faces of caveolae." Nat Rev Mol Cell Biol**8**(3): 185-194.
- Partridge, C. A., F. A. Blumenstock and A. B. Malik** (1992). "Pulmonary microvascular endothelial cells constitutively release xanthine oxidase." Arch Biochem Biophys**294**(1): 184-187.
- Patel, H. H., Y. M. Tsutsumi, B. P. Head, I. R. Niesman, M. Jennings, Y. Horikawa, D. Huang, A. L. Moreno, P. M. Patel, P. A. Insel and D. M. Roth** (2007). "Mechanisms of cardiac protection from ischemia/reperfusion injury: a role for caveolae and caveolin-1." FASEB J**21**(7): 1565-1574.
- Patel, H. H., S. Zhang, F. Murray, R. Y. Suda, B. P. Head, U. Yokoyama, J. S. Swaney, I. R. Niesman, R. T. Schermuly, S. S. Pullamsetti, P. A. Thistlethwaite, A. Miyanohara, M. G. Farquhar, J. X. Yuan and P. A. Insel** (2007). "Increased smooth muscle cell expression of caveolin-1 and caveolae contribute to the pathophysiology of idiopathic pulmonary arterial hypertension." FASEB J**21**(11): 2970-2979.
- Patron, M., A. Raffaello, V. Granatiero, A. Tosatto, G. Merli, D. De Stefani, L. Wright, G. Pallafacchina, A. Terrin, C. Mammucari and R. Rizzuto** (2013). "The mitochondrial calcium uniporter (MCU): molecular identity and physiological roles." J Biol Chem**288**(15): 10750-10758.
- Paul, D. L.** (1986). "Molecular cloning of cDNA for rat liver gap junction protein." J Cell Biol**103**(1): 123-134.

- Pelat, M., C. Dessy, P. Massion, J. P. Desager, O. Feron and J. L. Balligand** (2003). "Rosuvastatin decreases caveolin-1 and improves nitric oxide-dependent heart rate and blood pressure variability in apolipoprotein E^{-/-} mice in vivo." Circulation**107**(19): 2480-2486.
- Pena-Silva, R. A., J. D. Miller, Y. Chu and D. D. Heistad** (2009). "Serotonin produces monoamine oxidase-dependent oxidative stress in human heart valves." Am J Physiol Heart Circ Physiol**297**(4): H1354-1360.
- Pepke-Zaba, J., T. W. Higenbottam, A. T. Dinh-Xuan, C. Ridden and T. Kealey** (1993). "Alpha-adrenoceptor stimulation of porcine pulmonary arteries." Eur J Pharmacol**235**(2-3): 169-175.
- Perez-Vizcaino, F., A. Cogolludo and L. Moreno** (2010). "Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle." Respir Physiol Neurobiol**174**(3): 212-220.
- Perez, D. M.** (2007). "Structure-function of alpha1-adrenergic receptors." Biochem Pharmacol**73**(8): 1051-1062.
- Perros, F.** (2014). "Nebivolol and pulmonary hypertension." Eur Respir J supplement**44**(58): 317.
- Peskin, A. V. and C. C. Winterbourn** (2000). "A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1)." Clin Chim Acta**293**(1-2): 157-166.
- Plante, I., M. K. Stewart, K. Barr, A. L. Allan and D. W. Laird** (2011). "Cx43 suppresses mammary tumor metastasis to the lung in a Cx43 mutant mouse model of human disease." Oncogene**30**(14): 1681-1692.
- Plenz, G., Y. S. Ko, H. I. Yeh, H. Eschert, J. R. Sindermann, A. Dorszewski, O. Hofnagel, H. Robenek, G. Breithardt and N. J. Severs** (2004). "Upregulation of connexin43 gap junctions between neointimal smooth muscle cells." Eur J Cell Biol**83**(10): 521-530.
- Poburko, D., C. H. Liao, C. van Breemen and N. Demaurex** (2009). "Mitochondrial regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in vascular smooth muscle cells." Circ Res**104**(1): 104-112.
- Pohorecky, L. A., M. Zigmond, H. Karten and R. J. Wurtman** (1969). "Enzymatic conversion of norepinephrine to epinephrine by the brain." J Pharmacol Exp Ther**165**(2): 190-195.
- Pojoga, L. H., P. C. Underwood, M. O. Goodarzi, J. S. Williams, G. K. Adler, X. Jeunemaitre, P. N. Hopkins, B. A. Raby, J. Lasky-Su, B. Sun, J. Cui, X. Guo, K. D. Taylor, Y. D. Chen, A. Xiang, L. J. Raffel, T. A. Buchanan, J. I. Rotter and G. H. Williams** (2011). "Variants of the caveolin-1 gene: a translational investigation linking insulin resistance and hypertension." J Clin Endocrinol Metab**96**(8): E1288-1292.
- Poor, H. D., R. Girgis and S. M. Studer** (2012). "World Health Organization Group III pulmonary hypertension." Prog Cardiovasc Dis**55**(2): 119-127.

- Pryor, W. A., K. N. Houk, C. S. Foote, J. M. Fukuto, L. J. Ignarro, G. L. Squadrito and K. J. Davies** (2006). "Free radical biology and medicine: it's a gas, man!" Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**291**(3): R491-511.
- Pullamsetti, S. S. and R. T. Schermuly** (2009). "Endothelin receptor antagonists in preclinical models of pulmonary hypertension." Eur J Clin Invest**39 Suppl 2**: 3-13.
- Putney, J. W., Jr.** (1990). "Capacitative calcium entry revisited." Cell Calcium**11**(10): 611-624.
- Pytliak, M., V. Vargova, V. Mechirova and M. Felsoci** (2011). "Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications." Physiol Res**60**(1): 15-25.
- Rackauskas, M., V. Neverauskas and V. A. Skeberdis** (2010). "Diversity and properties of connexin gap junction channels." Medicina (Kaunas)**46**(1): 1-12.
- Rahman, S., G. Carlile and W. H. Evans** (1993). "Assembly of hepatic gap junctions. Topography and distribution of connexin 32 in intracellular and plasma membranes determined using sequence-specific antibodies." J Biol Chem**268**(2): 1260-1265.
- Rapizzi, E., P. Pinton, G. Szabadkai, M. R. Wieckowski, G. Vandecasteele, G. Baird, R. A. Tuft, K. E. Fogarty and R. Rizzuto** (2002). "Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria." J Cell Biol**159**(4): 613-624.
- Rapport, M. M., A. A. Green and I. H. Page** (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization." J Biol Chem**176**(3): 1243-1251.
- Rathore, R., Y. M. Zheng, C. F. Niu, Q. H. Liu, A. Korde, Y. S. Ho and Y. X. Wang** (2008). "Hypoxia activates NADPH oxidase to increase [ROS]_i and [Ca²⁺]_i through the mitochondrial ROS-PKCε signaling axis in pulmonary artery smooth muscle cells." Free Radic Biol Med**45**(9): 1223-1231.
- Razani, B., J. A. Engelman, X. B. Wang, W. Schubert, X. L. Zhang, C. B. Marks, F. Macaluso, R. G. Russell, M. Li, R. G. Pestell, D. Di Vizio, H. Hou, Jr., B. Kneitz, G. Lagaud, G. J. Christ, W. Edelmann and M. P. Lisanti** (2001). "Caveolin-1 null mice are viable but show evidence of hyperproliferative and vascular abnormalities." J Biol Chem**276**(41): 38121-38138.
- Razani, B. and M. P. Lisanti** (2001). "Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease." J Clin Invest**108**(11): 1553-1561.
- Razani, B., S. E. Woodman and M. P. Lisanti** (2002). "Caveolae: from cell biology to animal physiology." Pharmacol Rev**54**(3): 431-467.
- Reaume, A. G., P. A. de Sousa, S. Kulkarni, B. L. Langille, D. Zhu, T. C. Davies, S. C. Juneja, G. M. Kidder and J. Rossant** (1995). "Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43." Science**267**(5205): 1831-1834.

- Revel, J. P. and M. J. Karnovsky** (1967). "Hexagonal array of subunits in intercellular junctions of the mouse heart and liver." J Cell Biol**33**(3): C7-C12.
- Rhodin, J. A.** (1967). "The ultrastructure of mammalian arterioles and precapillary sphincters." J Ultrastruct Res**18**(1): 181-223.
- Rich, S. and M. Rabinovitch** (2008). "Diagnosis and treatment of secondary (non-category 1) pulmonary hypertension." Circulation**118**(21): 2190-2199.
- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F. S. Fay, K. E. Fogarty, L. M. Lifshitz, R. A. Tuft and T. Pozzan** (1998). "Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses." Science**280**(5370): 1763-1766.
- Rizzuto, R., A. W. Simpson, M. Brini and T. Pozzan** (1992). "Rapid changes of mitochondrial Ca²⁺ revealed by specifically targeted recombinant aequorin." Nature**358**(6384): 325-327.
- Rochette, L., J. Lorin, M. Zeller, J. C. Guillard, L. Lorgis, Y. Cottin and C. Vergely** (2013). "Nitric oxide synthase inhibition and oxidative stress in cardiovascular diseases: possible therapeutic targets?" Pharmacol Ther**140**(3): 239-257.
- Rodat-Despoix, L., V. Aires, T. Ducret, R. Marthan, J. P. Savineau, E. Rousseau and C. Guibert** (2009). "Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery." Eur Respir J**34**(6): 1338-1347.
- Rodat-Despoix, L., H. Crevel, R. Marthan, J. P. Savineau and C. Guibert** (2008). "Heterogeneity in 5-HT-induced contractile and proliferative responses in rat pulmonary arterial bed." J Vasc Res**45**(3): 181-192.
- Rodat, L., J. P. Savineau, R. Marthan and C. Guibert** (2007). "Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries." Pflugers Arch**454**(1): 41-51.
- Rojas, A., H. Figueroa, L. Re and M. A. Morales** (2006). "Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects." Arch Med Res**37**(4): 436-448.
- Rokosh, D. G. and P. C. Simpson** (2002). "Knockout of the alpha 1A/C-adrenergic receptor subtype: the alpha 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(14): 9474-9479.
- Rossignol, R., R. Gilkerson, R. Aggeler, K. Yamagata, S. J. Remington and R. A. Capaldi** (2004). "Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells." Cancer Res**64**(3): 985-993.
- Rothberg, K. G., J. E. Heuser, W. C. Donzell, Y. S. Ying, J. R. Glenney and R. G. Anderson** (1992). "Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats." Cell**68**(4): 673-682.

Rubin, L. J., D. B. Badesch, R. J. Barst, N. Galie, C. M. Black, A. Keogh, T. Pulido, A. Frost, S. Roux, I. Leconte, M. Landzberg and G. Simonneau (2002). "Bosentan therapy for pulmonary arterial hypertension." N Engl J Med346(12): 896-903.

Rudnick, G. (2006). "Serotonin transporters--structure and function." J Membr Biol213(2): 101-110.

Saez, J. C., V. M. Berthoud, M. C. Branes, A. D. Martinez and E. C. Beyer (2003). "Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions." Physiol Rev83(4): 1359-1400.

Saez, J. C., A. D. Martinez, M. C. Branes and H. E. Gonzalez (1998). "Regulation of gap junctions by protein phosphorylation." Braz J Med Biol Res31(5): 593-600.

Sakao, S., K. Tatsumi and N. F. Voelkel (2009). "Endothelial cells and pulmonary arterial hypertension: apoptosis, proliferation, interaction and transdifferentiation." Respir Res10: 95.

Sakao, S., K. Tatsumi and N. F. Voelkel (2010). "Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol43(6): 629-634.

Saliez, J., C. Bouzin, G. Rath, P. Ghisdal, F. Desjardins, R. Rezzani, L. F. Rodella, J. Vriens, B. Nilius, O. Feron, J. L. Balligand and C. Dessy (2008). "Role of caveolar compartmentation in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated relaxation: Ca²⁺ signals and gap junction function are regulated by caveolin in endothelial cells." Circulation117(8): 1065-1074.

Salvi, S. S. (1999). "Alpha1-adrenergic hypothesis for pulmonary hypertension." Chest115(6): 1708-1719.

Sandow, S. L. and C. E. Hill (2000). "Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses." Circ Res86(3): 341-346.

Sasano, C., H. Honjo, Y. Takagishi, M. Uzzaman, L. Emdad, A. Shimizu, Y. Murata, K. Kamiya and I. Kodama (2007). "Internalization and dephosphorylation of connexin43 in hypertrophied right ventricles of rats with pulmonary hypertension." Circ J71(3): 382-389.

Sathishkumar, K., G. R. Ross, V. R. Prakash and S. K. Mishra (2006). "Relative contribution of intracellular and extracellular Ca²⁺ to alpha2-adrenoceptor-mediated contractions of ovine pulmonary artery." Pharmacol Res54(3): 219-225.

Savineau, J. P. and R. Marthan (1997). "Modulation of the calcium sensitivity of the smooth muscle contractile apparatus: molecular mechanisms, pharmacological and pathophysiological implications." Fundam Clin Pharmacol11(4): 289-299.

Scaduto, R. C., Jr. and L. W. Grotyohann (1999). "Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives." Biophys J76(1 Pt 1): 469-477.

- Schach, C., A. L. Firth, M. Xu, C. V. Remillard, H. H. Patel, P. A. Insel and J. X. Yuan** (2008). "Regulation of pulmonary vasoconstriction by agonists and caveolae." Exp Lung Res**34**(4): 195-208.
- Schneider, M. P., E. I. Boesen and D. M. Pollock** (2007). "Contrasting actions of endothelin ET(A) and ET(B) receptors in cardiovascular disease." Annu Rev Pharmacol Toxicol**47**: 731-759.
- Schubert, A. L., W. Schubert, D. C. Spray and M. P. Lisanti** (2002). "Connexin family members target to lipid raft domains and interact with caveolin-1." Biochemistry**41**(18): 5754-5764.
- Schwenke, D. O., J. T. Pearson, H. Mori and M. Shirai** (2006). "Long-term monitoring of pulmonary arterial pressure in conscious, unrestrained mice." J Pharmacol Toxicol Methods**53**(3): 277-283.
- Sedeek, M., R. L. Hebert, C. R. Kennedy, K. D. Burns and R. M. Touyz** (2009). "Molecular mechanisms of hypertension: role of Nox family NADPH oxidases." Curr Opin Nephrol Hypertens**18**(2): 122-127.
- Segal, S. S., S. E. Brett and W. C. Sessa** (1999). "Codistribution of NOS and caveolin throughout peripheral vasculature and skeletal muscle of hamsters." Am J Physiol**277**(3 Pt 2): H1167-1177.
- Segal, S. S. and B. R. Duling** (1986). "Flow control among microvessels coordinated by intercellular conduction." Science**234**(4778): 868-870.
- Segretain, D. and M. M. Falk** (2004). "Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal." Biochim Biophys Acta**1662**(1-2): 3-21.
- Seidelmann, S. B., J. K. Lighthouse and D. M. Greif** (2014). "Development and pathologies of the arterial wall." Cell Mol Life Sci**71**(11): 1977-1999.
- Selemidis, S., C. G. Sobey, K. Wingler, H. H. Schmidt and G. R. Drummond** (2008). "NADPH oxidases in the vasculature: molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition." Pharmacol Ther**120**(3): 254-291.
- Severs, N. J., E. Dupont, S. R. Coppen, D. Halliday, E. Inett, D. Baylis and S. Rothery** (2004). "Remodelling of gap junctions and connexin expression in heart disease." Biochim Biophys Acta**1662**(1-2): 138-148.
- Sheikh, A. Q., J. K. Lighthouse and D. M. Greif** (2014). "Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension." Cell Rep**6**(5): 809-817.
- Shimoda, L. A., J. S. Sham, T. H. Shimoda and J. T. Sylvester** (2000). "L-type Ca(2+) channels, resting [Ca(2+)](i), and ET-1-induced responses in chronically hypoxic pulmonary myocytes." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**279**(5): L884-894.

- Shimoda, L. A. and C. Udem** (2010). "Interactions between calcium and reactive oxygen species in pulmonary arterial smooth muscle responses to hypoxia." Respir Physiol Neurobiol**174**(3): 221-229.
- Shimokawa, H., H. Yasutake, K. Fujii, M. K. Owada, R. Nakaike, Y. Fukumoto, T. Takayanagi, T. Nagao, K. Egashira, M. Fujishima and A. Takeshita** (1996). "The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation." J Cardiovasc Pharmacol**28**(5): 703-711.
- Shujaat, A., R. Minkin and E. Eden** (2007). "Pulmonary hypertension and chronic cor pulmonale in COPD." Int J Chron Obstruct Pulmon Dis**2**(3): 273-282.
- Siddall, H. K., D. M. Yellon, S. B. Ong, U. A. Mukherjee, N. Burke, A. R. Hall, P. R. Angelova, M. H. Ludtmann, E. Deas, S. M. Davidson, M. M. Mocanu and D. J. Hausenloy** "Loss of PINK1 increases the heart's vulnerability to ischemia-reperfusion injury." PLoS One**8**(4): e62400.
- Siddall, H. K., D. M. Yellon, S. B. Ong, U. A. Mukherjee, N. Burke, A. R. Hall, P. R. Angelova, M. H. Ludtmann, E. Deas, S. M. Davidson, M. M. Mocanu and D. J. Hausenloy** (2013). "Loss of PINK1 increases the heart's vulnerability to ischemia-reperfusion injury." PLoS One**8**(4): e62400.
- Simonneau, G.** (2009). "[A new clinical classification of pulmonary hypertension]." Bull Acad Natl Med**193**(8): 1897-1909.
- Simonneau, G., M. A. Gatzoulis, I. Adatia, D. Celermajer, C. Denton, A. Ghofrani, M. A. Gomez Sanchez, R. Krishna Kumar, M. Landzberg, R. F. Machado, H. Olschewski, I. M. Robbins and R. Souza** (2013). "Updated clinical classification of pulmonary hypertension." J Am Coll Cardiol**62**(25 Suppl): D34-41.
- Singh, D., J. L. Solan, S. M. Taffet, R. Javier and P. D. Lampe** (2005). "Connexin 43 interacts with zona occludens-1 and -2 proteins in a cell cycle stage-specific manner." J Biol Chem**280**(34): 30416-30421.
- Sirvio, M. L., K. Metsarinne, O. Saijonmaa and F. Fyhrquist** (1990). "Tissue distribution and half-life of ¹²⁵I-endothelin in the rat: importance of pulmonary clearance." Biochem Biophys Res Commun**167**(3): 1191-1195.
- Sitbon, O., L. Savale, X. Jais, D. Montani, M. Humbert and G. Simonneau** (2014). "[Treatment of pulmonary arterial hypertension]." Presse Med**43**(9): 981-993.
- Smart, E. J., D. C. Foster, Y. S. Ying, B. A. Kamen and R. G. Anderson** (1994). "Protein kinase C activators inhibit receptor-mediated potocytosis by preventing internalization of caveolae." J Cell Biol**124**(3): 307-313.
- Smyth, J. W. and R. M. Shaw** (2012). "The gap junction life cycle." Heart Rhythm**9**(1): 151-153.

- Snetkov, V. A., S. V. Smirnov, J. Kua, P. I. Aaronson, J. P. Ward and G. A. Knock** (2011). "Superoxide differentially controls pulmonary and systemic vascular tone through multiple signalling pathways." Cardiovasc Res**89**(1): 214-224.
- Sohl, G. and K. Willecke** (2004). "Gap junctions and the connexin protein family." Cardiovasc Res**62**(2): 228-232.
- Solan, J. L. and P. D. Lampe** (2005). "Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction channel assembly." Biochim Biophys Acta**1711**(2): 154-163.
- Solan, J. L. and P. D. Lampe** (2009). "Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects." Biochem J**419**(2): 261-272.
- Soma, S., H. Takahashi, M. Muramatsu, M. Oka and Y. Fukuchi** (1999). "Localization and distribution of endothelin receptor subtypes in pulmonary vasculature of normal and hypoxia-exposed rats." Am J Respir Cell Mol Biol**20**(4): 620-630.
- Somlyo, A. P. and A. V. Somlyo** (2003). "Ca²⁺ sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase." Physiol Rev**83**(4): 1325-1358.
- Sonkusare, S., P. T. Palade, J. D. Marsh, S. Telemaque, A. Pesic and N. J. Rusch** (2006). "Vascular calcium channels and high blood pressure: pathophysiology and therapeutic implications." Vascul Pharmacol**44**(3): 131-142.
- Sonkusare, S. K., A. D. Bonev, J. Ledoux, W. Liedtke, M. I. Kotlikoff, T. J. Heppner, D. C. Hill-Eubanks and M. T. Nelson** (2012). "Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function." Science**336**(6081): 597-601.
- Sowa, G.** (2012). "Caveolae, caveolins, cavins, and endothelial cell function: new insights." Front Physiol**2**: 120.
- Sowa, G., M. Pypaert and W. C. Sessa** (2001). "Distinction between signaling mechanisms in lipid rafts vs. caveolae." Proc Natl Acad Sci U S A**98**(24): 14072-14077.
- Spisni, E., C. Griffoni, S. Santi, M. Riccio, R. Marulli, G. Bartolini, M. Toni, V. Ullrich and V. Tomasi** (2001). "Colocalization prostacyclin (PGI₂) synthase--caveolin-1 in endothelial cells and new roles for PGI₂ in angiogenesis." Exp Cell Res**266**(1): 31-43.
- Stenmark, K. R., K. A. Fagan and M. G. Frid** (2006). "Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms." Circ Res**99**(7): 675-691.
- Stenmark, K. R., E. Gerasimovskaya, R. A. Nemenoff and M. Das** (2002). "Hypoxic activation of adventitial fibroblasts: role in vascular remodeling." Chest**122**(6 Suppl): 326S-334S.
- Straub, A. C., A. C. Zeigler and B. E. Isakson** (2014). "The myoendothelial junction: connections that deliver the message." Physiology (Bethesda)**29**(4): 242-249.

- Su, V., K. Cochrane and A. F. Lau** (2012). "Degradation of connexins through the proteasomal, endolysosomal and phagolysosomal pathways." J Membr Biol**245**(7): 389-400.
- Su, V. and A. F. Lau** (2014). "Connexins: mechanisms regulating protein levels and intercellular communication." FEBS Lett**588**(8): 1212-1220.
- Suzuki, Y. J. and G. D. Ford** (1992). "Superoxide stimulates IP3-induced Ca²⁺ release from vascular smooth muscle sarcoplasmic reticulum." Am J Physiol**262**(1 Pt 2): H114-116.
- Sylvester, J. T., L. A. Shimoda, P. I. Aaronson and J. P. Ward** (2012). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction." Physiol Rev**92**(1): 367-520.
- Szado, T., K. H. Kuo, K. Bernard-Helary, D. Poburko, C. H. Lee, C. Seow, U. T. Ruegg and C. van Breemen** (2003). "Agonist-induced mitochondrial Ca²⁺ transients in smooth muscle." Faseb J**17**(1): 28-37.
- Szok, D., J. Hansen-Schwartz and L. Edvinsson** (2001). "In depth pharmacological characterization of endothelin B receptors in the rat middle cerebral artery." Neurosci Lett**314**(1-2): 69-72.
- Tajima, M., Y. Kurashima, K. Sugiyama, T. Ogura and H. Sakagami** (2009). "The redox state of glutathione regulates the hypoxic induction of HIF-1." Eur J Pharmacol**606**(1-3): 45-49.
- Tan, X. Y. and J. G. He** (2009). "The remodeling of connexin in the hypertrophied right ventricular in pulmonary arterial hypertension and the effect of a dual ET receptor antagonist (bosentan)." Pathol Res Pract**205**(7): 473-482.
- Tirapelli, C. R., D. A. Casolari, A. Yogi, A. C. Montezano, R. C. Tostes, E. Legros, P. D'Orleans-Juste and A. M. de Oliveira** (2005). "Functional characterization and expression of endothelin receptors in rat carotid artery: involvement of nitric oxide, a vasodilator prostanoid and the opening of K⁺ channels in ETB-induced relaxation." Br J Pharmacol**146**(6): 903-912.
- Touyz, R. M. and A. M. Briones** (2010). "Reactive oxygen species and vascular biology: implications in human hypertension." Hypertens Res**34**(1): 5-14.
- Touyz, R. M., A. M. Briones, M. Sedeek, D. Burger and A. C. Montezano** (2011). "NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health." Mol Interv**11**(1): 27-35.
- Touyz, R. M. and E. L. Schiffrin** (2004). "Reactive oxygen species in vascular biology: implications in hypertension." Histochem Cell Biol**122**(4): 339-352.
- Townsley, M. I.** (2012). "Structure and composition of pulmonary arteries, capillaries, and veins." Compr Physiol**2**(1): 675-709.
- Toyofuku, T., Y. Akamatsu, H. Zhang, T. Kuzuya, M. Tada and M. Hori** (2001). "c-Src regulates the interaction between connexin-43 and ZO-1 in cardiac myocytes." J Biol Chem**276**(3): 1780-1788.

- Traub, O., J. Look, R. Dermietzel, F. Brummer, D. Hulser and K. Willecke** (1989). "Comparative characterization of the 21-kD and 26-kD gap junction proteins in murine liver and cultured hepatocytes." J Cell Biol**108**(3): 1039-1051.
- Tugba Durlu-Kandilci, N., M. Ruas, K. T. Chuang, A. Brading, J. Parrington and A. Galione** (2010). "TPC2 proteins mediate nicotinic acid adenine dinucleotide phosphate (NAADP)- and agonist-evoked contractions of smooth muscle." J Biol Chem**285**(32): 24925-24932.
- Ullmer, C., H. G. Boddeke, K. Schmuck and H. Lubbert** (1996). "5-HT_{2B} receptor-mediated calcium release from ryanodine-sensitive intracellular stores in human pulmonary artery endothelial cells." Br J Pharmacol**117**(6): 1081-1088.
- Ullmer, C., K. Schmuck, H. O. Kalkman and H. Lubbert** (1995). "Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels." FEBS Lett**370**(3): 215-221.
- Ushio-Fukai, M.** (2009). "Compartmentalization of redox signaling through NADPH oxidase-derived ROS." Antioxid Redox Signal**11**(6): 1289-1299.
- Uzzaman, M., H. Honjo, Y. Takagishi, L. Emdad, A. I. Magee, N. J. Severs and I. Kodama** (2000). "Remodeling of gap junctional coupling in hypertrophied right ventricles of rats with monocrotaline-induced pulmonary hypertension." Circ Res**86**(8): 871-878.
- Vaidya, D., H. S. Tamaddon, C. W. Lo, S. M. Taffet, M. Delmar, G. E. Morley and J. Jalife** (2001). "Null mutation of connexin43 causes slow propagation of ventricular activation in the late stages of mouse embryonic development." Circ Res**88**(11): 1196-1202.
- van den Borst, B., A. M. Schols, C. de Theije, A. W. Boots, S. E. Kohler, G. H. Goossens and H. R. Gosker** (2013). "Characterization of the inflammatory and metabolic profile of adipose tissue in a mouse model of chronic hypoxia." J Appl Physiol (1985)**114**(11): 1619-1628.
- van Veen, T. A., H. V. van Rijen and H. J. Jongsma** (2000). "Electrical conductance of mouse connexin45 gap junction channels is modulated by phosphorylation." Cardiovasc Res**46**(3): 496-510.
- Vanhoutte, P. M.** (2004). "Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history." Pharmacol Res**49**(6): 503-508.
- Vasington, F. D. and J. V. Murphy** (1962). "Ca ion uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation." J Biol Chem**237**: 2670-2677.
- Victor, V. M., M. Rocha and M. De la Fuente** (2004). "Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis." Int Immunopharmacol**4**(3): 327-347.
- Vierhapper, H., O. Wagner, P. Nowotny and W. Waldhausl** (1990). "Effect of endothelin-1 in man." Circulation**81**(4): 1415-1418.
- Wang, L., A. R. Sapuri-Butti, H. H. Aung, A. N. Parikh and J. C. Rutledge** (2008). "Triglyceride-rich lipoprotein lipolysis increases aggregation of endothelial cell membrane

microdomains and produces reactive oxygen species." Am J Physiol Heart Circ Physiol**295**(1): H237-244.

Wang, L., J. Yin, H. T. Nickles, H. Ranke, A. Tabuchi, J. Hoffmann, C. Tabeling, E. Barbosa-Sicard, M. Chanson, B. R. Kwak, H. S. Shin, S. Wu, B. E. Isakson, M. Witzernath, C. de Wit, I. Fleming, H. Kuppe and W. M. Kuebler (2012). "Hypoxic pulmonary vasoconstriction requires connexin 40-mediated endothelial signal conduction." J Clin Invest**122**(11): 4218-4230.

Ward, J. P. (2006). "Point: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species." J Appl Physiol**101**(3): 993-995; discussion 999.

Ward, J. P. (2006). "Point: Hypoxic pulmonary vasoconstriction is mediated by increased production of reactive oxygen species." J Appl Physiol (1985)**101**(3): 993-995; discussion 999.

Waypa, G. B., R. Guzy, P. T. Mungai, M. M. Mack, J. D. Marks, M. W. Roe and P. T. Schumacker (2006). "Increases in mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced calcium responses in pulmonary artery smooth muscle cells." Circ Res**99**(9): 970-978.

Wei, C. J., X. Xu and C. W. Lo (2004). "Connexins and cell signaling in development and disease." Annu Rev Cell Dev Biol**20**: 811-838.

Weibrecht, I., K. J. Leuchowius, C. M. Clausson, T. Conze, M. Jarvius, W. M. Howell, M. Kamali-Moghaddam and O. Soderberg (2010). "Proximity ligation assays: a recent addition to the proteomics toolbox." Expert Rev Proteomics**7**(3): 401-409.

Weigand, L., J. T. Sylvester and L. A. Shimoda (2006). "Mechanisms of endothelin-1-induced contraction in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**290**(2): L284-290.

Weitzenblum, E. and A. Chaouat (2005). "Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease?" Chest**127**(5): 1480-1482.

Westcott, E. B. and S. S. Segal (2013). "Perivascular innervation: a multiplicity of roles in vasomotor control and myoendothelial signaling." Microcirculation**20**(3): 217-238.

Woodman, S. E., M. W. Cheung, M. Tarr, A. C. North, W. Schubert, G. Lagaud, C. B. Marks, R. G. Russell, G. S. Hassan, S. M. Factor, G. J. Christ and M. P. Lisanti (2004). "Urogenital alterations in aged male caveolin-1 knockout mice." J Urol**171**(2 Pt 1): 950-957.

Yamada, E. (1955). "The fine structure of the renal glomerulus of the mouse." J Biophys Biochem Cytol**1**(6): 551-566.

Yang, B. and V. Rizzo (2007). "TNF-alpha potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol**292**(2): H954-962.

Yeh, H. I., E. Dupont, S. Coppens, S. Rothery and N. J. Severs (1997). "Gap junction localization and connexin expression in cytochemically identified endothelial cells of arterial tissue." J Histochem Cytochem**45**(4): 539-550.

Yeh, H. I., F. Lupu, E. Dupont and N. J. Severs (1997). "Upregulation of connexin43 gap junctions between smooth muscle cells after balloon catheter injury in the rat carotid artery." Arterioscler Thromb Vasc Biol**17**(11): 3174-3184.

Yla-Herttuala, S., J. F. Bentzon, M. Daemen, E. Falk, H. M. Garcia-Garcia, J. Herrmann, I. Hoefer, J. W. Jukema, R. Krams, B. R. Kwak, N. Marx, M. Naruszewicz, A. Newby, G. Pasterkamp, P. W. Serruys, J. Waltenberger, C. Weber and L. Tokgozoglul (2011). "Stabilisation of atherosclerotic plaques. Position paper of the European Society of Cardiology (ESC) Working Group on atherosclerosis and vascular biology." Thromb Haemost**106**(1): 1-19.

Yu, A. Y., M. G. Frid, L. A. Shimoda, C. M. Wiener, K. Stenmark and G. L. Semenza (1998). "Temporal, spatial, and oxygen-regulated expression of hypoxia-inducible factor-1 in the lung." Am J Physiol**275**(4 Pt 1): L818-826.

Yu, J., C. A. Bippes, G. M. Hand, D. J. Muller and G. E. Sosinsky (2007). "Aminosulfonate modulated pH-induced conformational changes in connexin26 hemichannels." J Biol Chem**282**(12): 8895-8904.

Yuan, X. J., R. T. Bright, A. M. Aldinger and L. J. Rubin (1997). "Nitric oxide inhibits serotonin-induced calcium release in pulmonary artery smooth muscle cells." Am J Physiol**272**(1 Pt 1): L44-50.

Zafir, N., B. Zingerman, A. Solodky, D. Ben-Dayan, A. Sagie, J. Sulkes, I. Mats and M. R. Kramer (2007). "Use of noninvasive tools in primary pulmonary hypertension to assess the correlation of right ventricular function with functional capacity and to predict outcome." Int J Cardiovasc Imaging**23**(2): 209-215.

Zaiman, A., I. Fijalkowska, P. M. Hassoun and R. M. Tuder (2005). "One hundred years of research in the pathogenesis of pulmonary hypertension." Am J Respir Cell Mol Biol**33**(5): 425-431.

Zakhari, S. (2013). "Bermuda Triangle for the liver: alcohol, obesity, and viral hepatitis." J Gastroenterol Hepatol**28 Suppl 1**: 18-25.

Zalba, G., G. San Jose, M. U. Moreno, M. A. Fortuno, A. Fortuno, F. J. Beaumont and J. Diez (2001). "Oxidative stress in arterial hypertension: role of NAD(P)H oxidase." Hypertension**38**(6): 1395-1399.

Zaobornyj, T. and P. Ghafourifar (2012). "Strategic localization of heart mitochondrial NOS: a review of the evidence." Am J Physiol Heart Circ Physiol**303**(11): H1283-1293.

Zhang, A. Y., F. Yi, G. Zhang, E. Gulbins and P. L. Li (2006). "Lipid raft clustering and redox signaling platform formation in coronary arterial endothelial cells." Hypertension**47**(1): 74-80.

- Zhang, D. X. and D. D. Gutterman** (2007). "Mitochondrial reactive oxygen species-mediated signaling in endothelial cells." Am J Physiol Heart Circ Physiol**292**(5): H2023-2031.
- Zhang, Y. W., M. Kaneda and I. Morita** (2003). "The gap junction-independent tumor-suppressing effect of connexin 43." J Biol Chem**278**(45): 44852-44856.
- Zhao, Y. Y., Y. Liu, R. V. Stan, L. Fan, Y. Gu, N. Dalton, P. H. Chu, K. Peterson, J. Ross, Jr. and K. R. Chien** (2002). "Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice." Proc Natl Acad Sci U S A**99**(17): 11375-11380.
- Zhao, Y. Y., Y. D. Zhao, M. K. Mirza, J. H. Huang, H. H. Potula, S. M. Vogel, V. Brovkovych, J. X. Yuan, J. Wharton and A. B. Malik** (2009). "Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration." J Clin Invest**119**(7): 2009-2018.
- Zhong, W. Q., G. Chen, W. Zhang, X. P. Xiong, J. G. Ren, Y. Zhao, B. Liu and Y. F. Zhao** (2014). "Down-regulation of connexin43 and connexin32 in keratocystic odontogenic tumours: potential association with clinical features." Histopathology.
- Zhu, P., L. Huang, X. Ge, F. Yan, R. Wu and Q. Ao** (2006). "Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling." Int J Exp Pathol**87**(6): 463-474.
- Zorov, D. B., C. R. Filburn, L. O. Klotz, J. L. Zweier and S. J. Sollott** (2000). "Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes." J Exp Med**192**(7): 1001-1014.
- Zorov, D. B., M. Juhaszova and S. J. Sollott** (2014). "Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release." Physiol Rev**94**(3): 909-950.
- Zuckerbraun, B. S., P. George and M. T. Gladwin** (2011). "Nitrite in pulmonary arterial hypertension: therapeutic avenues in the setting of dysregulated arginine/nitric oxide synthase signalling." Cardiovasc Res**89**(3): 542-552.

ANNEXE



Contents lists available at ScienceDirect

The International Journal of Biochemistry & Cell Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biociel

Organelles in focus

Mitochondria: Roles in pulmonary hypertension



Véronique Freund-Michel^{a,b,*}, Nafisha Khoyarattee^{a,b}, Jean-Pierre Savineau^{a,b},
Bernard Muller^{a,b}, Christelle Guibert^{a,b}

^a Univ. Bordeaux, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000, Bordeaux, France

^b INSERM, Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 July 2014

Accepted 13 August 2014

Available online 20 August 2014

Keywords:

Mitochondria

Pulmonary hypertension

Pulmonary arterial remodelling

Right ventricular hypertrophy

Mitochondrial dysfunction

ABSTRACT

Mitochondria are essential cell organelles responsible for ATP production in the presence of oxygen. In the pulmonary vasculature, mitochondria contribute to physiological intracellular signalling pathways through production of reactive oxygen species and play the role of oxygen sensors that coordinate hypoxic pulmonary vasoconstriction. Mitochondria also play a pathophysiological role in pulmonary hypertension (PH). This disease is characterized by increased pulmonary arterial pressure and remodelling of pulmonary arteries, leading to increased pulmonary vascular resistance, hypertrophy of the right ventricle, right heart failure and ultimately death. Mitochondrial alterations have been evidenced in PH in pulmonary arteries and in the right ventricle, in particular a chronic shift in energy production from mitochondrial oxidative phosphorylation to glycolysis. This shift, initially described in cancer cells, may play a central role in PH pathogenesis. Further studies of these metabolic mitochondrial alterations in PH may therefore open new therapeutic perspectives in this disease.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Organelle facts

- Mitochondria play essential physiological roles in the pulmonary vasculature, through oxygen sensing and production of reactive oxygen species.
- Mitochondrial dysfunction plays a role in pathogenesis of pulmonary hypertension (PH).
- Suppression of glucose oxidation and subsequent increase in glycolysis has been evidenced in PH in all pulmonary arterial layers (endothelium, smooth muscle and adventitia) and in the remodelled right ventricle.
- Several intra- and extra-mitochondrial causes of mitochondrial dysfunction in PH have been described in pulmonary arteries, whereas ischemia and decreased angiogenesis seem to be the main triggers of mitochondrial dysfunction in the remodelled right ventricle.
- Mitochondria-targeted therapies are currently investigated and may open novel therapeutic perspectives in PH.

1. Introduction and organelle function

In eukaryotic cells, mitochondria are essential organelles that produce energy through oxidative phosphorylation. Mitochondria provide metabolites for synthesis of fatty acids and carbohydrates in proliferating cells, but can also, if necessary, initiate apoptosis to maintain homeostasis (Zamzami and Kroemer, 2001). In the pulmonary vasculature, mitochondria are a physiological source of reactive oxygen species (ROS) (Freund-Michel et al., 2013), and play the role of oxygen sensors that coordinate hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) (Ward and McMurtry, 2009). Mitochondrial dysfunction is involved in the pathogenesis of pulmonary hypertension (PH), playing a central role in the metabolic theory of this disease (Archer et al., 2013; Paulin and Michelakis, 2014; Sutendra and Michelakis, 2014).

2. Cell physiology

In pulmonary vascular cells, as in other cells, mitochondria are providers of adenosine 5'-triphosphate (ATP) (Fig. 1). On one hand, after its cellular uptake, glucose is transformed into pyruvate by cytoplasmic glycolysis. Pyruvate enters the mitochondria and is transformed into acetyl-CoA by pyruvate dehydrogenase (PDH). On the other hand, fatty acids transported into cells undergo β -oxidation to produce acetyl-CoA as well.

* Corresponding author at: Véronique Freund-Michel, INSERM U1045, Laboratoire de Pharmacologie, UFR des Sciences Pharmaceutiques, Université de Bordeaux, Case 83, 146 Rue Léo Saignat, 33076 BORDEAUX Cedex, France. Tel.: +33 5 57 57 45 70; fax: +33 5 57 57 12 01.

E-mail address: veronique.michel@u-bordeaux.fr (V. Freund-Michel).

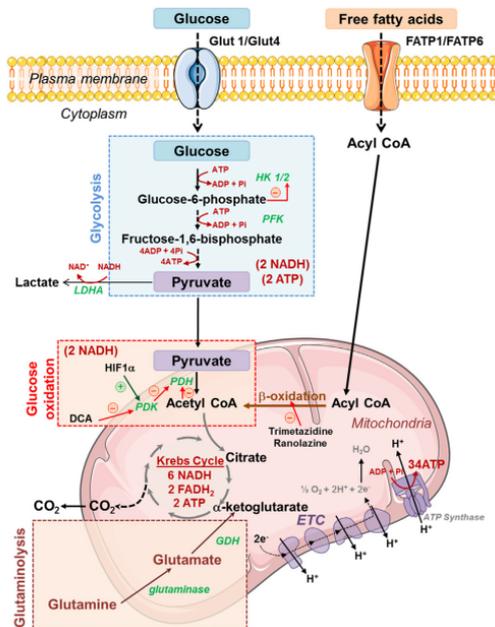


Fig. 1. Schematic summary of mitochondrial metabolic pathways: glycolysis, β -oxidation, glucose oxidation and glutaminolysis. DCA: dichloroacetate; ETC: electron transport chain; FADH₂: flavin adenine dinucleotide; FATP1/6: fatty acids transport protein 1 and 6; GDH: glutamate dehydrogenase; GLUT-1/4: glucose transporter-1 and 4; HIF-1 α : hypoxia induced factor-1 α ; HK1/2: hexokinase 1 and 2; LDHA: lactate dehydrogenase A; NADH: nicotinamide adenine dinucleotide; PDH: pyruvate dehydrogenase; PDK: pyruvate dehydrogenase kinase; PFK: phosphofruktokinase.

Acetyl-CoA enters the Krebs cycle which produces the electron donors nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) and flavin adenine dinucleotide (FADH₂). Electrons flow down the redox gradient on the electron transport chain, creating the mitochondrial membrane potential used by ATP synthase to produce ATP (Dromparis and Michelakis, 2013) (Fig. 1). In case of mitochondrial dysfunction, there is a metabolic shift towards glycolysis with less ATP production since pyruvate is transformed into lactate instead of entering the Krebs cycle (Dromparis et al., 2010).

Mitochondria also regulate inflammation, autophagy, redox- and calcium-dependent signals (Dromparis and Michelakis, 2013). In addition, mitochondria control cell apoptosis, with mitochondrial depolarisation activating the voltage-sensitive transition pore to release pro-apoptotic factors. Cells with hyperpolarised mitochondria are therefore more resistant to apoptosis (Zamzami and Kroemer, 2001).

Finally, mitochondria play a major role in HPV, an important physiological mechanism that distributes blood flow to highly ventilated areas of the lung, therefore optimizing pulmonary gas exchanges. Mitochondria in pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC) are oxygen sensors and induce PASMC contraction, thereby initiating HPV. However, in case of chronic hypoxia, sustained pulmonary arterial contraction occurs and is associated to vascular remodelling, leading to PH development (Ward and McMurtry, 2009).

3. Organelle pathology

PH is characterised by increased pulmonary arterial pressure and remodelling of pulmonary arteries. Increased resistance in these vessels causes hypertrophy of the right ventricle (RV), whose function progressively declines and leads to right heart failure and ultimately death (Montani et al., 2013). Mitochondrial abnormalities have been evidenced in pulmonary arteries and in the RV and may therefore play a major role in this disease (Fig. 2).

3.1. Mitochondria in remodelled pulmonary arteries

Pulmonary arterial remodelling is characterised by structural modifications of pulmonary vascular cells, with PASMC, pulmonary arterial endothelial cells (PAEC) and fibroblasts (PAF) acquiring a hyperproliferative and apoptosis-resistant phenotype. These structural changes contribute to pulmonary arterial wall thickening and increased resistance (Crosswhite and Sun, 2014).

Both structural and functional alterations of mitochondria occur in PH (Fig. 2). Recent studies show that hyperproliferative PAF isolated from patients suffering from idiopathic pulmonary arterial hypertension (iPAH) exhibit upregulated glycolytic gene expression and increased glucose uptake (Zhao et al., 2012, 2013). These results therefore suggest existence of mitochondrial modifications in these cells that may contribute to adventitial remodelling in PH, but such mechanisms merit further attention. By contrast, the role of mitochondria has been extensively studied in PASMC, and also begins to attract attention in PAEC. Mitochondrial abnormalities and their consequences in these two cell types are summarised below.

3.1.1. Mitochondrial alterations in pulmonary arterial smooth muscle cells

In experimental and human PH, a chronic shift in energy production from mitochondrial oxidative phosphorylation to glycolysis occurs in PASMC. This phenotype, originally described in cancers and termed the Warburg effect, contributes to PASMC hyperproliferation and resistance to apoptosis (Paulin and Michelakis, 2014; Sutendra and Michelakis, 2014) (Fig. 2).

Compared to healthy cells, in PASMC from experimental models and various forms of human PH (PH-PASMC), the metabolic shift towards glycolysis increases availability of non-oxidised amino acids, lipids and sugars, all necessary for rapid cell proliferation (Paulin and Michelakis, 2014). PH-PASMC have hyperpolarised mitochondria which produce less ROS (McMurtry et al., 2004; Bonnet et al., 2006, 2007; Sutendra et al., 2010, 2011a, 2011b; Dromparis and Michelakis, 2013). Decrease in mitochondrial ROS production is associated to Kv channel's decreased activity and expression at the plasma membrane, increased intracellular calcium levels and increased activity of the transcription factors nuclear factor of activated T cells (NFAT) and hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α), leading to increased proliferation and decreased apoptosis (Yuan et al., 1998; Papandreou et al., 2006; Bonnet et al., 2007; Sutendra et al., 2010). Suppression of glucose oxidation inhibits the Krebs cycle, with decreased synthesis of α -ketoglutarate (α -KG) leading to HIF-1 α stabilization, and decreased synthesis of citrate that may be linked to decreased histone acetylation in PH (Zhao et al., 2012; Paulin and Michelakis, 2014).

In PH-PASMC, suppression of glucose oxidation is essentially due to inhibition of PDH, a key mitochondrial enzyme regulating pyruvate influx into the mitochondria (Bonnet et al., 2006; Papandreou et al., 2006; Sutendra et al., 2010, 2011a). Expression of pyruvate dehydrogenase kinase (PDK) is increased after HIF-1 α activation, leading to increased PDH phosphorylation and inhibition (Papandreou et al., 2006) (Figs. 1 and 2). Mechanisms of PDH inhibition involving inflammation and growth factors have

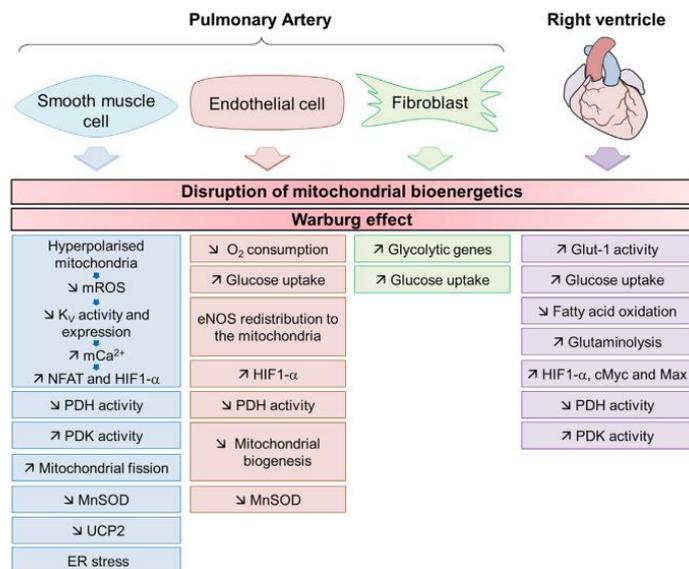


Fig. 2. Schematic summary of PH mitochondrial alterations occurring in remodelled pulmonary arteries (pulmonary arterial fibroblasts, smooth muscle and endothelial cells) and right ventricle. ER: endoplasmic reticulum; eNOS: endothelial nitric oxide synthase; HIF-1 α : hypoxia induced factor-1 α ; MnSOD: manganese superoxide dismutase; NFAT: nuclear factor of activated T cells; PDH: pyruvate dehydrogenase; PDK: pyruvate dehydrogenase kinase; ROS: reactive oxygen species; UCP2: uncoupling protein 2.

also been evidenced (Paulin and Michelakis, 2014; Sutendra and Michelakis, 2014).

Other intra- or extramitochondrial abnormalities have been reported in PH-PASMC. Expression and activity of the mitochondrial manganese superoxide dismutase (MnSOD) is decreased, due to hypermethylation of the *SOD2* gene (Bonnet et al., 2006; Archer et al., 2010). Iron homeostasis is disturbed in PH patients, and as iron is an essential component of mitochondrial activity, this may contribute to mitochondrial dysfunction in PH (Rhodes et al., 2011a, 2011b; Paulin and Michelakis, 2014). Lack of the mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in healthy PASMC decreases calcium influx from the endoplasmic reticulum (ER) to mitochondria, resulting in suppression of mitochondrial function (Dromparis et al., 2013b; Pak et al., 2013). ER is the major calcium supplier of mitochondria and ER stress has been evidenced in PH-PASMC (Yeager et al., 2012). Neurite outgrowth inhibitor (Nogo) is a member of the reticulon family of proteins that regulate ER shape. Nogo upregulation causes disruption of a functional ER-mitochondrial unit, resulting in decreased mitochondrial calcium levels, whereas its downregulation increases mitochondrial calcium levels and restores glucose oxidation in PH-PASMC (Dromparis et al., 2013a).

Mitochondrial structural modifications have also been observed in PH-PASMC, with disruption of the normal mitochondrial filamentous reticulum (Bonnet et al., 2006). Excessive mitochondrial fission occurs through increased expression and activity of Dynamin-related protein 1 (DRP1), contributing to PH-PASMC excessive proliferation (Marsboom et al., 2012).

3.1.2. Mitochondrial alterations in pulmonary arterial endothelial cells

Although less extensively studied than in PH-PASMC, mitochondrial abnormalities have also been reported in PH-PAEC (Xu and Erzurum, 2011; Tang et al., 2014) (Fig. 2). Decreased mitochondrial

numbers are observed in these cells, with increased glucose uptake, decreased oxygen consumption, decreased mitochondrial PDH activity leading to increased glycolytic metabolism (Xu et al., 2007). Increased HIF-1 α expression is associated to decreased expression of MnSOD (Fijalkowska et al., 2010). Another dysfunction involves asymmetric dimethylarginine (ADMA), an endogenous competitive inhibitor of endothelial nitric oxide synthase (eNOS). ADMA levels are increased in PH-PAEC and induce eNOS redistribution from the plasma membrane to the mitochondria, leading to decreased levels of nitric oxide (NO) in the cytoplasm. By contrast, levels of NO are increased in the mitochondria, inducing mitochondrial protein nitration and dysfunction (Sud et al., 2008; Sun et al., 2013).

3.2. Mitochondria in the remodelled right ventricle

RV hypertrophy and dilatation are characteristic of all categories of PH, with RV failure being the ultimate cause of death in this disease. Initial myocardial hypertrophy is followed by progressive contractile weakening and ventricle dilatation to allow compensatory preload. Decompensated RV failure then appears, with rising filling pressures and decreased cardiac output.

Relatively few studies have addressed RV metabolic changes in PH, but have evidenced mitochondrial shift from glucose oxidation to glycolysis in the hypertrophied RV in both experimental and human PH (Nouette-Gaulain et al., 2005, 2011; Redout et al., 2007; Archer et al., 2013) (Fig. 2). Reduced coronary perfusion pressure and capillary rarefaction do not allow sufficient oxygen supply and participate to RV ischemia, which contributes to glycolysis activation. Less ATP is produced, leading to reduced RV contractility, decreased cardiac output and electrical remodelling (increase in RV action potential duration and QT interval). Decreased cardiac output then further induces ischemia as a vicious cycle (Archer et al., 2013; Piao et al., 2013b).

Activation of transcription factors such as HIF-1 α , cMyc and Max has been shown in hypertrophied RV in various PH experimental models (Redout et al., 2007; Bogaard et al., 2009; Piao et al., 2013a). Ischemia-induced activation of HIF-1 α stimulates glycolysis by inducing transcription of glucose transporters, hexokinase and lactate dehydrogenase kinase. HIF-1 α also inhibits glucose oxidation by activating PDK which decreases PDH activity in mitochondria (Redout et al., 2007; Piao et al., 2010; Archer et al., 2013; Sutendra et al., 2013) (Fig. 1). RV ischemia also increases activity of cMyc and Max, leading to increased expression of glutamine transporters and glutaminolysis (conversion of glutamine into α -KG) (Piao et al., 2013a) (Fig. 1).

Expression of several genes involved in fatty acid oxidation is also modified in the remodelled RV in a severe rat PH model (Gomez-Arroyo et al., 2013). Inhibition of fatty acid oxidation with trimetazidine and ranolazine (Fig. 1) enhances RV glucose oxidation, reduces RV hypertrophy and improves RV function in experimental PH (Guarnieri and Muscari, 1988; Fang et al., 2012).

Besides drugs known to act directly on the mitochondrial metabolism, other compounds are also effective to improve RV mitochondrial function in PH. Dehydroepiandrosterone (DHEA) prevents mitochondrial fragmentation in the remodelled RV, with increased activity of citrate synthase and of the mitochondrial electron transport chain (Dumas de La Roque et al., 2012). Combination of current PH treatments (bosentan, a dual antagonist of endothelin-1 receptors, plus sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor) also increases RV mitochondrial capacity (Mouchaers et al., 2009).

4. Conclusion and future outlook

Mitochondrial dysfunction is observed in PH, both in remodelled RV and pulmonary arteries, but with different triggering mechanisms. In pulmonary arteries, various intra- and extramitochondrial causes have been described. In the heart, mitochondrial dysfunction is triggered by ischemia due to low coronary arterial flow and angiogenesis decrease. However, these different mechanisms all lead to the same metabolic abnormality: reduction of mitochondrial glucose oxidation towards glycolysis.

Mitochondria-targeting therapies, aimed to enhance glucose oxidation, are therefore currently investigated, with ongoing clinical trials in PH patients for some of them (Paulin and Michelakis, 2014; Sutendra and Michelakis, 2014). For example, dichloroacetate (DCA) displays beneficial effects on both RV and pulmonary arterial remodelling in PH patients. Several different therapeutic targets are currently studied, but given the complexity of metabolic mitochondrial pathways with multiple substrates, enzymes and crosstalks, many more targets may be considered in the future and may open new therapeutic perspectives in the treatment of this life-threatening disease.

References

- Archer SL, Fang YH, Ryan JJ, Piao L. Metabolism and bioenergetics in the right ventricle and pulmonary vasculature in pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2013;3:144–52.
- Archer SL, Marsboom G, Kim GH, Zhang HJ, Toth PT, Svensson EC, et al. Epigenetic attenuation of mitochondrial superoxide dismutase 2 in pulmonary arterial hypertension: a basis for excessive cell proliferation and a new therapeutic target. *Circulation* 2010;121:2661–71.
- Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, Long CS, Kraskauskas D, Smithson L, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to explain right heart failure. *Circulation* 2009;120:1951–60.
- Bonnet S, Michelakis ED, Porter CJ, Andrade-Navarro MA, Thebaud B, Bonnet S, et al. An abnormal mitochondrial-hypoxia inducible factor-1 α -Kv channel pathway disrupts oxygen sensing and triggers pulmonary arterial hypertension in fawn hooded rats: similarities to human pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 2006;113:2630–41.
- Bonnet S, Rochefort G, Sutendra G, Archer SL, Haromy A, Webster L, et al. The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:11418–23.
- Crosswhite P, Sun Z. Molecular mechanisms of pulmonary arterial remodelling. *Mol Med* 2014;20:191–201.
- Dromparis P, Michelakis ED. Mitochondria in vascular health and disease. *Annu Rev Physiol* 2013;75:95–126.
- Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Sutendra G, Michelakis ED. Attenuating endoplasmic reticulum stress as a novel therapeutic strategy in pulmonary hypertension. *Circulation* 2013a;127:115–25.
- Dromparis P, Paulin R, Sutendra G, Qj AC, Bonnet S, Michelakis ED. Uncoupling protein 2 deficiency mimics the effects of hypoxia and endoplasmic reticulum stress on mitochondria and triggers pseudohypoxic pulmonary vascular remodelling and pulmonary hypertension. *Circ Res* 2013b;113:126–36.
- Dromparis P, Sutendra G, Michelakis ED. The role of mitochondria in pulmonary vascular remodelling. *J Mol Med (Berl)* 2010;88:1003–10.
- Dumas de La Roque E, Bellance N, Rossignol R, Begueret H, Billaud M, dos Santos P, et al. Dehydroepiandrosterone reverses chronic hypoxia/reoxygenation-induced right ventricular dysfunction in rats. *Eur Respir J* 2012;40:1420–9.
- Fang YH, Piao L, Hong Z, Toth PT, Marsboom G, Bache-Wiig P, et al. Therapeutic inhibition of fatty acid oxidation in right ventricular hypertrophy: exploiting Randle's cycle. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:31–43.
- Fijalkowska I, Xu W, Comhair SA, Janocha AJ, Mavrakis LA, Krishnamachary B, et al. Hypoxia inducible-factor1 α regulates the metabolic shift of pulmonary hypertensive endothelial cells. *Am J Pathol* 2010;176:1130–8.
- Freund-Michel V, Guibert C, Dubois M, Courtois A, Marthan R, Savineau JP, et al. Reactive oxygen species as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Thor Adv Respir Dis* 2013;7:175–200.
- Gomez-Arroyo J, Mizuno S, Szczepanek K, Van Tassel B, Natarajan R, dos Remedios CG, et al. Metabolic gene remodelling and mitochondrial dysfunction in failing right ventricular hypertrophy secondary to pulmonary arterial hypertension. *Circ Heart Fail* 2013;6:136–44.
- Guarnieri C, Muscari C. Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle of monocrotaline-treated rats. *Biochem Pharmacol* 1988;37:4685–8.
- Marsboom G, Toth PT, Ryan JJ, Hong Z, Wu X, Fang YH, et al. Dynamically-related protein-1-mediated mitochondrial mitotic fission permits hyperproliferation of vascular smooth muscle cells and offers a novel therapeutic target in pulmonary hypertension. *Circ Res* 2012;110:1484–97.
- McMurtry MS, Bonnet S, Wu X, Dyck JR, Haromy A, Hashimoto K, et al. Dichloroacetate prevents and reverses pulmonary hypertension by inducing pulmonary artery smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res* 2004;95:830–40.
- Montani D, Gunther S, Dorfmueller P, Perros F, Giererd B, Garcia G, et al. Pulmonary arterial hypertension. *Orphanet J Rare Dis* 2013;8:97.
- Mouchaers KT, Schalij I, Versteilen AM, Hadi AM, van Nieuw Amerongen GP, van Hinsbergh VW, et al. Endothelin receptor blockade combined with phosphodiesterase-5 inhibition increases right ventricular mitochondrial capacity in pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009;297:H200–7.
- Nouette-Gaulain K, Biais M, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, Letellier T, et al. Chronic hypoxia-induced alterations in mitochondrial energy metabolism are not reversible in rat heart ventricles. *Can J Physiol Pharmacol* 2011;89:58–66.
- Nouette-Gaulain K, Malgat M, Rocher C, Savineau JP, Marthan R, Mazat JP, et al. Time course of differential mitochondrial energy metabolism adaptation to chronic hypoxia in right and left ventricles. *Cardiovasc Res* 2005;66:132–40.
- Pak O, Sommer N, Hoeres T, Bakr A, Waisbrod S, Sydykov A, et al. Mitochondrial hyperpolarization in pulmonary vascular remodelling. Mitochondrial uncoupling protein deficiency as disease model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2013;49:358–67.
- Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 2006;3:187–97.
- Paulin R, Michelakis ED. The metabolic theory of pulmonary arterial hypertension. *Circ Res* 2014;115:148–64.
- Piao L, Fang YH, Parikh K, Ryan JJ, Toth PT, Archer SL. Cardiac glutaminolysis: a maladaptive cancer metabolism pathway in the right ventricle in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2013a;91:1185–97.
- Piao L, Marsboom G, Archer SL. Mitochondrial metabolic adaptation in right ventricular hypertrophy and failure. *J Mol Med (Berl)* 2010;88:1011–20.
- Piao L, Sidhu VK, Fang YH, Ryan JJ, Parikh KS, Hong Z, et al. FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4 (PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension: therapeutic benefits of dichloroacetate. *J Mol Med (Berl)* 2013b;91:333–46.
- Redout EM, Wagner MJ, Zuidwijk MJ, Boer C, Musters RJ, van Hardeveld C, et al. Right-ventricular failure is associated with increased mitochondrial complex II activity and production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 2007;75:770–81.
- Rhodes CJ, Howard LS, Busbridge M, Ashby D, Kondili E, Gibbs JS, et al. Iron deficiency and raised hepcidin in idiopathic pulmonary arterial hypertension: clinical prevalence, outcomes, and mechanistic insights. *J Am Coll Cardiol* 2011a;58:300–9.
- Rhodes CJ, Wharton J, Howard L, Gibbs JS, Vonk-Noordegraaf A, Wilkins MR. Iron deficiency in pulmonary arterial hypertension: a potential therapeutic target. *Eur Respir J* 2011b;38:1453–60.
- Sud N, Wells SM, Sharma S, Wiseman DA, Wilham J, Black SM. Asymmetric dimethylarginine inhibits HSP90 activity in pulmonary arterial endothelial cells: role of mitochondrial dysfunction. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;294:C1407–18.

- Sun X, Sharma S, Fratz S, Kumar S, Rafikov R, Aggarwal S, et al. Disruption of endothelial cell mitochondrial bioenergetics in lambs with increased pulmonary blood flow. *Antioxid Redox Signal* 2013;18:1739–52.
- Sutendra G, Bonnet S, Rochefort G, Haromy A, Folmes KD, Lopaschuk GD, et al. Fatty acid oxidation and malonyl-CoA decarboxylase in the vascular remodelling of pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2010;2:44ra58.
- Sutendra G, Dromparis P, Bonnet S, Haromy A, McMurtry MS, Bleackley RC, et al. Pyruvate dehydrogenase inhibition by the inflammatory cytokine TNF α contributes to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2011a;89:771–83.
- Sutendra G, Dromparis P, Paulin R, Zervopoulos S, Haromy A, Nagendran J, et al. A metabolic remodelling in right ventricular hypertrophy is associated with decreased angiogenesis and a transition from a compensated to a decompensated state in pulmonary hypertension. *J Mol Med (Berl)* 2013;91:1315–27.
- Sutendra G, Dromparis P, Wright P, Bonnet S, Haromy A, Hao Z, et al. The role of Nogo and the mitochondria–endoplasmic reticulum unit in pulmonary hypertension. *Sci Transl Med* 2011b;3:88ra55.
- Sutendra G, Michelakis ED. The metabolic basis of pulmonary arterial hypertension. *Cell Metab* 2014;19:558–73.
- Tang X, Luo YX, Chen HZ, Liu DP. Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases. *Front Physiol* 2014;5:175.
- Ward JP, McMurtry IF. Mechanisms of hypoxic pulmonary vasoconstriction and their roles in pulmonary hypertension: new findings for an old problem. *Curr Opin Pharmacol* 2009;9:287–96.
- Xu W, Erzurum SC. Endothelial cell energy metabolism, proliferation, and apoptosis in pulmonary hypertension. *Compr Physiol* 2011;1:357–72.
- Xu W, Koeck T, Lara AR, Neumann D, DiFilippo FP, Koo M, et al. Alterations of cellular bioenergetics in pulmonary artery endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:1342–7.
- Yeager ME, Reddy MB, Nguyen CM, Colvin KL, Ivy DD, Stenmark KR. Activation of the unfolded protein response is associated with pulmonary hypertension. *Pulm Circ* 2012;2:229–40.
- Yuan JX, Aldinger AM, Juhaszova M, Wang J, Conte JV Jr, Gaine SP, et al. Dysfunctional voltage-gated K⁺ channels in pulmonary artery smooth muscle cells of patients with primary pulmonary hypertension. *Circulation* 1998;98:1400–6.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:67–71.
- Zhao L, Ashek A, Wang L, Fang W, Dabral S, Dubois O, et al. Heterogeneity in lung (18)F-FDG uptake in pulmonary arterial hypertension: potential of dynamic (18)F-FDG positron emission tomography with kinetic analysis as a bridging biomarker for pulmonary vascular remodelling targeted treatments. *Circulation* 2013;128:1214–24.
- Zhao L, Chen CN, Hajji N, Oliver E, Cotroneo E, Wharton J, et al. Histone deacetylation inhibition in pulmonary hypertension: therapeutic potential of valproic acid and suberoylanilide hydroxamic acid. *Circulation* 2012;126:455–67.