



HAL
open science

Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire

Thibaud Parpaite

► To cite this version:

Thibaud Parpaite. Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0275 . tel-01273584

HAL Id: tel-01273584

<https://theses.hal.science/tel-01273584v1>

Submitted on 12 Feb 2016

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

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

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE "Sciences de la Vie et de la Santé"
SPÉCIALITÉ : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

par **Thibaud PARPAITE**
né le 15 février 1989 à la Teste de Buch (33)

**RÔLE DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE
SUR LES CANAUX SENSIBLES À L'ÉTIREMENT
DANS L'HYPERTENSION PULMONAIRE**

Sous la direction du
Dr Thomas DUCRET

Soutenue publiquement le
23 novembre 2015

Membres du jury :

M. Didier DULON, Directeur de recherche INSERM, Université de Bordeaux
M. Philippe GAILLY, Professeur, Université Catholique de Louvain
M. Laurent LOUFRANI, Directeur de recherche CNRS, Université d'Angers
Mme. Halima OUADID-AHIDOUCHE, Professeure, Université de Picardie
M. Jean-Pierre SAVINEAU, Professeur, Université de Bordeaux
M. Thomas DUCRET, Maître de conférences, Université de Bordeaux

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examinateur
Examinateur
Directeur de thèse

Centre de recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux
INSERM U1045

Université de Bordeaux 146 rue Léo Saignat, (case 13)

Zone sud, Bâtiment TP, 2^{ème} étage

33 076 Bordeaux,

France

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mon directeur de thèse, le Docteur **Thomas Ducret** pour son accompagnement, ses conseils avisés et le temps qu'il m'a consacré, tant pour le projet que lors de la rédaction de mon manuscrit. Merci pour ton soutien, ta disponibilité et ta patience. Ton encadrement a permis que je réalise ce travail dans les meilleures conditions possibles.

J'exprime toute ma gratitude à l'ensemble des membres du jury pour le temps consacré à l'évaluation de ce travail, Madame la Professeure **Halima Ouadid-Ahidouch**, Messieurs les Professeurs **Philippe Gailly** et **Jean-Pierre Savineau**, Messieurs les Docteurs **Didier Dulon** et Laurent Loufrani.

Je te tiens également à exprimer toute ma reconnaissance aux Professeurs **Jean-Pierre Savineau** et **Roger Marthan** pour m'avoir accueilli dans leur unité et m'avoir permis de réaliser ces travaux.

Je remercie très sincèrement le Professeur **Philippe Gailly**, grâce à qui nous avons pu obtenir des souris *trpv4* knock-out.

Je tiens également à remercier toutes les personnes que j'ai pu côtoyer au laboratoire, ainsi que l'équipe d'enseignement de physiologie de l'UFR des Sciences de la Vie.

Enfin, un énorme merci à **Angélique** qui a su me supporter et me soutenir jusqu'aux derniers moments.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	I
LISTE DES TABLEAUX	III
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	V
INTRODUCTION	1
1. La circulation pulmonaire : anatomie	1
1.1. Le lit artériel pulmonaire	1
1.2. Architecture de la paroi artérielle	2
1.2.1. L' <i>intima</i> et les cellules endothéliales	3
1.2.2. La <i>media</i> et les cellules musculaires lisses	3
1.2.3. L' <i>adventice</i>	4
2. Physiologie de la circulation pulmonaire	5
2.1. Pressions, débits, résistances	5
2.2. Rôle de la <i>media</i>	6
2.3. Mécanismes de régulation	6
3. Intégration des contraintes physiques	7
4. La vasoconstriction hypoxique pulmonaire	9
4.1. Principe	9
4.2. Régulation	10
5. Physiopathologie de la circulation pulmonaire	11
5.1. Généralités	11
5.2. Classification	12
6. La vasoréactivité dans l'hypertension pulmonaire	15
6.1. Le tonus myogénique	15
6.2. L'hyperréactivité des artères pulmonaires	15
7. Aspects cellulaires de l'hypertension pulmonaire	16
7.1. La dysfonction endothéliale	16
7.2. Les lésions plexiformes	17
7.3. La prolifération des CMLAP	17
7.4. La migration des CMLAP	18
7.4.1. Mécanismes	18
7.4.2. Activation et régulation	20
8. Homéostasie calcique dans l'hypertension pulmonaire	21
8.1. Les différentes sources de calcium dans la CMLAP	21
8.2. Modification de la signalisation calcique dans l'hypertension pulmonaire	23
9. Intégration du stress mécanique au niveau cellulaire	24

10.	Facteurs de transcription impliqués dans l'hypertension pulmonaire	25
10.1.	Hypertension pulmonaire et le facteur de transcription HIF	25
10.1.1.	Voie de signalisation	25
10.1.2.	HIF dans l'hypertension pulmonaire	26
10.2.	La régulation calcium-dépendante du NFAT	26
10.2.1.	Classification	27
10.2.2.	Voie de signalisation	27
10.2.3.	NFAT dans la physiologie vasculaire	28
10.2.4.	NFAT dans l'hypertension pulmonaire	28
11.	Modèles animaux	30
11.1.	Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (modèle d'HTAP de groupe 1)	30
11.2.	Hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique (modèle d'HTP de groupe 3)	31
11.3.	Autres modèles	32
11.3.1.	Hypertension pulmonaire sévère combinant hypoxie chronique et injection de monocrotaline	32
11.3.2.	Rat Fawn-hooded (FHR)	32
11.3.3.	Rat SUGEN	33
11.3.4.	Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (modèle d'HTP de groupe 4)	33
12.	Traitements de l'hypertension pulmonaire	34
12.1.	Traitements médicamenteux	34
12.2.	Chirurgie	34
12.3.	Vers de nouvelles thérapies	35
13.	Les canaux ioniques dans l'hypertension pulmonaire	36
13.1.	Les canaux potassiques	36
13.2.	Les canaux chlorures	36
13.3.	Les canaux calciques	36
14.	Les canaux activés par l'étirement	38
14.1.	Quels critères rassembler pour définir un SAC ?	38
14.2.	Mécanismes d'activation	38
14.3.	Nature moléculaire des SAC	40
15.	Les canaux de type TRP	40
15.1.	Classification	40
15.2.	Structure	41
15.3.	Modes d'activation	42
15.4.	Activité mécanosensible	43
16.	Interaction entre les canaux TRP et le cytosquelette	44
16.1.	Association des TRP avec le cytosquelette	44

16.2.	Régulation du cytosquelette par les TRP.....	44
16.3.	Régulation de l'activité des TRP par le cytosquelette.....	45
17.	Les canaux TRP dans l'hypertension pulmonaire	47
17.1.	Expression/surexpression dans le muscle lisse vasculaire pulmonaire	47
17.2.	Implication dans les mécanismes de l'hypertension pulmonaire	48
18.	TRPV1	49
18.1.	Structure	49
18.2.	Activation	50
18.3.	Régulation	50
19.	TRPV1 dans la circulation pulmonaire	52
19.1.	Expression/surexpression	52
19.2.	Fonction.....	52
20.	TRPV4	53
20.1.	Structure	53
20.2.	Activation	54
20.3.	Régulation	54
21.	TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire	55
21.1.	Expression/surexpression	55
21.2.	Fonction.....	55
OBJECTIFS DE LA THÈSE		57
MATÉRIEL ET MÉTHODES		61
1.	Animaux	63
1.1.	Rats sains.....	63
1.2.	Modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 3 : le rat hypoxique chronique	63
1.3.	Modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 1 : le rat traité à la monocrotaline	63
1.4.	Modèle d'hypertension pulmonaire sévère	64
1.5.	Rapport de Fulton.....	64
1.6.	Souris sauvages saines et souris mutées pour le gène codant pour le canal TRPV4.....	64
1.7.	Maintien d'une lignée de souris mutées pour le gène <i>trpv4</i>	65
2.	Microdissection de l'artère intrapulmonaire et obtention de cellules musculaires lisses ...	66
2.1.	Chez le rat.....	66
2.2.	Chez la souris	67
3.	Approche cellulaire : conditionnement des cellules	69

3.1.	Exposition des cellules à l'hypoxie	69
3.2.	Étirement chronique des cellules.....	69
4.	Étude de l'expression des canaux TRPV	70
4.1.	Étude de l'expression transcriptionnelle : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) quantitative.....	70
4.1.1.	Obtention des ADN complémentaires.....	70
4.1.2.	PCR quantitative en temps réel	70
4.1.3.	Quantification.....	71
4.2.	Étude de l'expression protéique : la technique du Western blot	71
4.2.1.	Extraction des protéines	71
4.2.2.	Marquage et révélation.....	71
5.	Immunofluorescence et microscopie confocale	72
5.1.	Marquage immunologique.....	72
5.2.	Acquisition des images.....	72
5.3.	Phénotypage et marquages du cytosquelette	72
5.4.	Densité du cytosquelette.....	73
5.5.	Mesure de la translocation nucléaire du NFAT.....	73
5.6.	Marquage des canaux TRPV1 et TRPV4.....	74
5.7.	Liste des anticorps utilisés.....	75
6.	Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$	77
6.1.	Principe.....	77
6.2.	Microspectrofluorimétrie et sonde calcique Indo-1.....	78
6.2.1.	Principe.....	78
6.2.2.	Procédure expérimentale	78
6.2.3.	Analyse des résultats	79
6.3.	Imagerie calcique et sonde calcique Fura-PE3.....	79
6.3.1.	Principe.....	79
6.3.2.	Procédure expérimentale	80
6.3.3.	Analyse des résultats	80
7.	Le patch-clamp	81
7.1.	Principe.....	81
7.2.	Configuration "cellule attachée"	81
7.3.	Configuration "cellule entière".....	83
8.	Étude de l'alignement cellulaire	83
9.	Étude de la migration cellulaire	84
9.1.	Technique de l'invasion de brèche	84
9.2.	Vidéo-microscopie	85

10.	Étude de la prolifération cellulaire	86
10.1.	Technique d'incorporation du BrdU	86
10.2.	Suivi du marqueur KI-67	87
11.	Étude de la viabilité cellulaire	87
12.	Liste des agonistes, antagonistes et inhibiteurs utilisés	88
13.	Analyse statistique des résultats	88
 RÉSULTATS ET DISCUSSIONS		89
1.	Avant-propos	91
1.1.	Utilisation du modèle du rat hypoxique chronique	91
1.2.	Effet de l'hypoxie chronique sur la réponse calcique induite par l'activation des canaux TRPV1, V2 et V4.....	92
2.	L'hypoxie exerce-t-elle un effet direct sur les canaux TRPV1 et TRPV4 dans les CMLAP ?	94
2.1.	Principaux résultats	94
2.2.	Publication.....	95
2.3.	Résultats complémentaires à ceux de l'article	116
2.4.	Conclusion effet de l'hypoxie	119
3.	L'étirement exerce-t-il un effet direct sur les canaux TRPV4 dans les CMLAP ?	119
3.1.	Utilisation du rat "monocrotaline"	120
3.2.	Activation des SAC	120
3.3.	Activation de TRPV4	121
3.4.	Description du modèle d'étirement <i>in vitro</i>	122
3.5.	Effet de l'étirement sur l'activité de TRPV4	123
3.6.	Effet de l'étirement sur la localisation cellulaire de TRPV4	125
3.7.	Effet de l'étirement sur la signalisation calcique induite par la vidange des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique	127
3.8.	L'étirement uniaxial cyclique modifie l'organisation du tapis cellulaire.....	128
3.9.	Le réalignement cellulaire induit par l'étirement nécessite l'activation des canaux sensibles à l'étirement.....	130
3.10.	Effet de l'étirement sur la migration	131
3.11.	Effet de l'étirement sur la prolifération cellulaire	132
3.12.	Discussion effet de l'étirement.....	134
4.	Conclusion	139
 PERSPECTIVES		143

1.	Étude <i>in vitro</i> du double conditionnement : stretch et hypoxie.....	145
2.	Étude <i>ex vivo</i> de modèles intégrés	145
2.1.	Microvaisseaux pressurisés	145
2.2.	Tranches de poumon	146
3.	Modèle <i>in vivo</i> : Étude du modèle d'hypertension pulmonaire sévère	147
4.	Étude sur l'humain.....	147
CONCLUSION GÉNÉRALE		149
BIBLIOGRAPHIE.....		153
ANNEXES.....		159
LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....		173
Travaux de thèse.....		173
	Publication.....	173
	Communications orales	173
	Communications affichées sous forme de poster	174
Travaux de Master 2		175
	Publications :	175
	Communications affichées sous forme de poster	175
ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT		175

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le lit artériel pulmonaire.	1
Figure 2 : Composition d'une artère.	2
Figure 3 : Marquages immunofluorescents de cellules endothéliales isolées.	3
Figure 4 : Marquages immunofluorescents de cellules musculaires lisses d'AIP.	4
Figure 5 : La circulation pulmonaire : un système à basse pression.	5
Figure 6 : Recrutement et distension.	7
Figure 7 : Représentation des forces mécaniques agissant sur une artère.	8
Figure 8 : La vasoconstriction hypoxique pulmonaire.	9
Figure 9 : Muscularisation d'une artériole intrapulmonaire induite par l'hypoxie.	16
Figure 10 : Les lésions plexiformes.	17
Figure 11 : Marquages immunofluorescents du cytosquelette de CMLAP.	18
Figure 12 : Mécanismes de la migration cellulaire	19
Figure 13 : Les réserves calciques intracellulaires.	22
Figure 14 : Exemples de voies de signalisation calcique impliquées dans l'HTP.	24
Figure 15 : Voie de signalisation du facteur de transcription HIF-1.	26
Figure 16 : Structure du NFAT.	27
Figure 17 : Voie de signalisation du NFAT.	28
Figure 18 : La monocrotaline.	30
Figure 19 : Analyse histologique d'une coupe d'AIP de rat "monocrotaline".	31
Figure 20 : Analyse histologique d'une coupe d'AIP de rat hypoxique chronique.	32
Figure 21 : Méthodes d'activation des SAC.	39
Figure 22 : Arbre phylogénétique de la superfamille des canaux TRP.	41
Figure 23 : Motifs structuraux des TRP.	42
Figure 24 : Les différentes modes d'assemblage des TRP.	42
Figure 25 : Interactions entre le cytosquelette et les canaux TRP.	46
Figure 26 : Structure 3D de TRPV1.	49
Figure 27 : Sites impliqués dans la régulation de TRPV1.	51
Figure 28 : Différents modes d'activation de TRPV1.	51
Figure 29 : Structure du canal TRPV4.	53
Figure 30 : Activation de TRPV4.	54
Figure 31 : Mesure du rapport de Fulton.	64
Figure 32 : Construction génétique à l'origine de knock-out de <i>trpv4</i>	65
Figure 33 : Génotypage.	66
Figure 34 : Microdissection d'une AIP de rat.	67
Figure 35 : Chambre en silicone et appareil STREX® STX-140-10.	69
Figure 36 : Phénotypage des CMLAP.	73
Figure 37 : Méthode d'analyse de la translocation du NFAT dans le noyau.	74
Figure 38 : Structure de la sonde Indo-1/AM.	78
Figure 40 : Analyse des réponses calciques.	79

Figure 39 : Structure de la sonde Fura-PE3/AM.....	80
Figure 41 : Les différentes configurations en patch-clamp.....	82
Figure 42 : Schémas de la configuration cellule attachée et de l'étirement membranaire.....	82
Figure 43 : Méthode de mesure de l'alignement cellulaire.	83
Figure 44 : Méthode de l'invasion de brèche.	84
Figure 45 : Distance de migration et distance accumulée.....	85
Figure 46 : Structure du Wst-1.....	87
Figure 47 : Rapport de Fulton.	92
Figure 48 : Amplitude des réponses calciques induites par une stimulation à la capsaïcine (10 µM) ou au probénécide (1 µM).....	92
Figure 49 : Expression de TRPV1 et TRPV2 dans les artères intrapulmonaires de rats contrôles et hypoxiques chroniques.	93
Figure 50 : Expression de NFATc1, et NFATc3 dans des CMLAP de rat.....	117
Figure 51 : Cinétique de la translocation de NFATc4 induite par la stimulation de TRPV1.	118
Figure 52 : Translocation nucléaire de NFATc4 au cours du temps suite à la stimulation de TRPV1 et TRPV4.....	118
Figure 53 : Mesure de l'hypertrophie cardiaque droite.....	120
Figure 54 : Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à la stimulation des SAC.....	121
Figure 55 : Réponses calciques induites par l'activation de TRPV4 dans des CMLAP de rat sains et "monocrotaline".....	122
Figure 56 : Effet de l'étirement sur l'activité de TRPV4.....	124
Figure 57 : Localisation de TRPV4 dans des CMLAP en absence d'étirement.	125
Figure 58 : Le conditionnement à l'étirement induit une relocalisation de TRPV4.....	126
Figure 59 : Vidange des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique par l'acide cyclopiazonique (10 µM) et la thapsigargine (1 µM).	128
Figure 60 : L'étirement cyclique uniaxial <i>in vitro</i> mime un environnement <i>in vivo</i>	129
Figure 61 : L'étirement induit une réorganisation du tapis cellulaire.....	130
Figure 62 : Effet de la durée et de l'intensité de l'étirement sur la réorientation des cellules.	130
Figure 63 : Implication des canaux SAC, TRPV et TRPV4 dans la réorientation du tapis cellulaire.	132
Figure 64 : Effet de l'étirement sur la migration des CMLAP.	133
Figure 65 : Effet de l'étirement sur la prolifération des CMLAP.....	134
Figure 66 : TRPV4 un acteur central dans le développement de l'hypertension pulmonaire.	140
Figure 67 : Comparaison des signalisations cellulaires entre le modèle pathologique hypoxique chronique et les deux conditionnements <i>in vitro</i> développés dans cette étude.	142
Figure 68 : Microvaisseaux pressurisés.	146
Figure 69 : Résultats préliminaires dans un modèle d'HTP sévère.	147

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des hypertensions pulmonaires.	14
Tableau 2 : Séquences des différentes amorces utilisées.....	68
Tableau 3 : Composition des différentes solutions utilisées (en mM).....	68
Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés.	76
Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires et fluorochromes utilisés.	76
Tableau 6 : Liste des agonistes, antagonistes et inhibiteurs utilisés.	88

LISTE DES ABBRÉVIATIONS

[Ca ²⁺] _e	Concentration calcique extracellulaire
[Ca ²⁺] _i	Concentration calcique intracellulaire
5-HT	5-hydroxytryptamine ou sérotonine
5-HTT	Transporteur de la sérotonine
α-SMA	α-actine du muscle lisse
AIP	Artère intrapulmonaire
AM	Acétométhylester
ATP	Adénoside triphosphate
BMPR	Bone morphogenic protein receptor
BPCO	Bronchopneumopathie chronique obstructive
BSA	Albumine de sérum bovin
Ca ²⁺	Calcium
CaM	Calmoduline
Cav	Cavéoline
CCDV	Canaux calciques dépendants du voltage
CE	Cellule endothéliale
CICR	Libération de calcium induite par le calcium
Cl ⁻	Chlore
CML	Cellule musculaire lisse
CMLAP	Cellule musculaire lisse d'artère intrapulmonaire
CO ₂	Dioxyde de carbone
CPA	Acide cyclopiazonique
Ctrl	Contrôle
DAG	Diacylglycérol
DHEA	Déhydroépiandrostérone
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DTT	Dithiothréitol
EDHF	Facteur hyperpolarisant dérivé de l'endothélium
eNOS	NO synthase endothéliale
GMP	Guanine monophosphate
HBSS	Hank's balanced salt solution
HC	Hypoxie chronique
HIF	Hypoxia inducible factor
HTAP	Hypertension artérielle pulmonaire
HTP	Hypertension pulmonaire
IP ₃	Inositol trisphosphate
K ⁺	Potassium
KO	Knock-out
MCT	Monocrotaline
NFAT	Nuclear factor of activated-T-cell
NO	Monoxyde d'azote
O ₂	Dioxygène
PAPm	Pression artérielle pulmonaire moyenne
PBS	Phosphate buffer saline
PDE-5	Phosphodiesterase-5
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldéhyde
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasma membrane Ca ²⁺ ATPase

PO ₂	Pression partielle en dioxygène
RE	Réticulum endoplasmique
RIP ₃	Récepteur à l'IP ₃
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
RS	Réticulum sarcoplasmique
RVP	Résistance vasculaire périphérique
RyR	Récepteur à la ryanodine
SAC	Stretch-activated channel
SERCA	Sarco/endoplasmic réticulum Ca ²⁺ ATPase
SOCE	Entrée de calcium induite par la déplétion des stocks
SVF	Sérum de veau foetal
TG	Thapsigargine
TRP	Transient receptor potential
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
vWF	Facteur de von Willebrand

INTRODUCTION

1. La circulation pulmonaire : anatomie

Le système circulatoire des mammifères est un système clos, permettant d'assurer l'approvisionnement en dioxygène et nutriments aux différents organes. Ce système possède deux circulations distinctes, reliées par la pompe cardiaque. **D'une part la circulation systémique**, dite grande circulation, qui amène un sang riche en dioxygène (O_2) et en nutriments du cœur vers les tissus, **et d'autre part la circulation pulmonaire**, ou petite circulation, qui amène le sang veineux pauvre en dioxygène mais riche en dioxyde de carbone (CO_2), issu du métabolisme cellulaire, du cœur droit vers les poumons, où il est réoxygéné et débarrassé du dioxyde de carbone avant de retourner au cœur gauche.

1.1. Le lit artériel pulmonaire

La circulation pulmonaire possède **une architecture complexe et hiérarchisée**. Elle s'étend du ventricule droit cardiaque jusqu'à l'extrémité de la veine pulmonaire dans l'atrium gauche du cœur.

À la sortie du cœur, le tronc artériel pulmonaire se subdivise en artères extrapulmonaires droite et gauche. Les artères extrapulmonaires deviennent des artères intrapulmonaires au sein des différents lobes pulmonaires. Chez l'Homme, on distingue trois lobes droits et deux gauches, tandis que chez le rat ou la souris, on observe quatre lobes droits et un seul pour le poumon gauche.

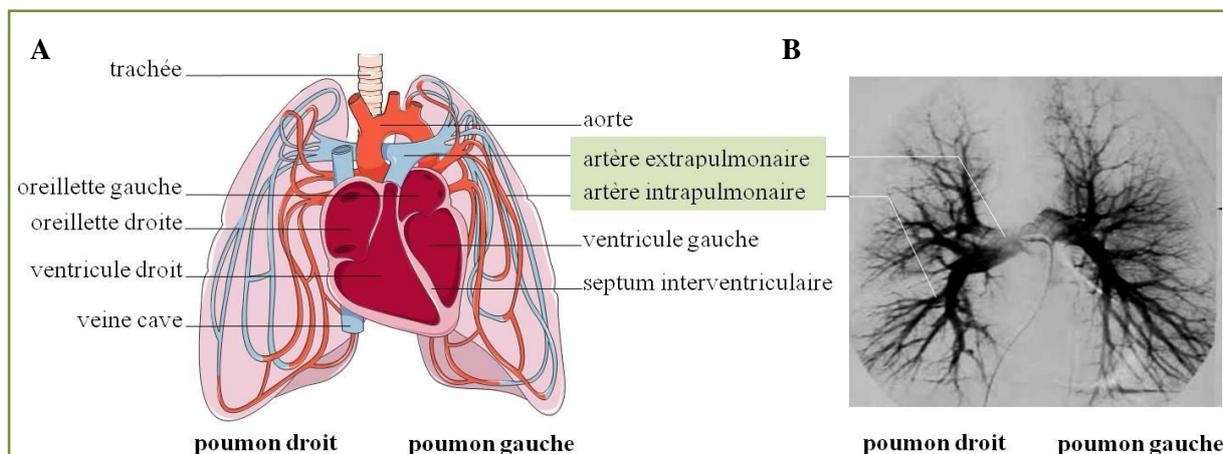


Figure 1 : Le lit artériel pulmonaire.

(A) Schéma du bloc cœur / poumon. Le sang pauvre en O_2 et riche CO_2 arrive dans l'oreillette droite via la veine cave. Puis il passe dans le ventricule droit où il est expulsé dans les artères pulmonaires lors de la systole. Au niveau de la barrière alvéolo-capillaire, le sang s'enrichit en O_2 et s'appauvrit en CO_2 . Le sang réoxygéné rejoint l'oreillette gauche du cœur via les veines pulmonaires, puis est envoyé dans la circulation systémique par contraction du ventricule gauche. (B) Images de la circulation pulmonaire obtenue par scintigraphie. Un agent de contraste radioactif inerte et peu soluble, injecté dans la circulation permet de révéler l'arborescence de la circulation pulmonaire. D'après [1].

Les artères intrapulmonaires se ramifient (17 embranchements chez l'Homme et 11 chez le rat) en artères lobaires, sub-lobaires, de premier, second et troisième ordres... et artérioles de plus en plus fines jusqu'au réseau capillaire parcourant les alvéoles. C'est au niveau de l'interface alvéolo-capillaire qu'a lieu les échanges gazeux. Le sang réoxygéné rejoint ensuite les veines pulmonaires qui convergent dans l'oreillette gauche (Figure 1).

Bien que possédant des similarités avec la circulation systémique, la circulation pulmonaire présente certaines spécificités. Il s'agit notamment de **la seule circulation d'organe à percevoir la totalité du débit cardiaque**. De nombreux globules blancs se retrouvent également piégés dans le poumon. De plus, comme le poumon voit transiter la totalité du débit cardiaque, il joue un rôle métabolique important. En effet, de nombreuses molécules sont modifiées durant leur passage dans la circulation pulmonaire, comme c'est le cas de l'angiotensine I convertie en angiotensine II grâce à l'enzyme de conversion.

1.2. Architecture de la paroi artérielle

Les artères intrapulmonaires sont moins épaisses que les artères de la circulation systémique, mais elles possèdent une structure similaire constituée de trois couches concentriques. De la lumière vers l'extérieur on distingue l'intima, la media et l'adventice. Chacune de ces structures est séparée des autres par une limitante élastique, couche de collagène et d'élastine (Figure 2).

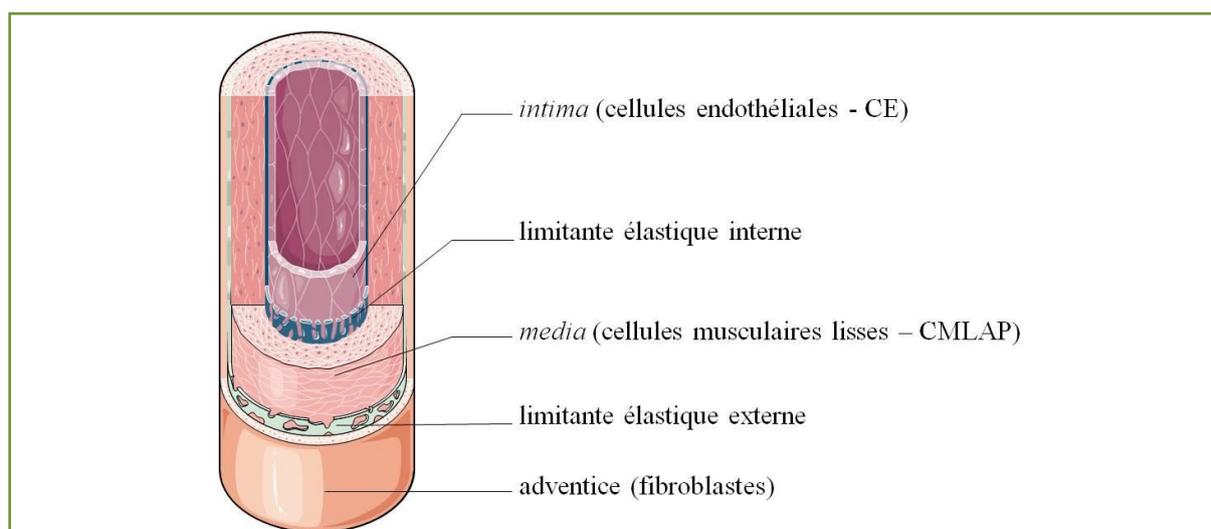


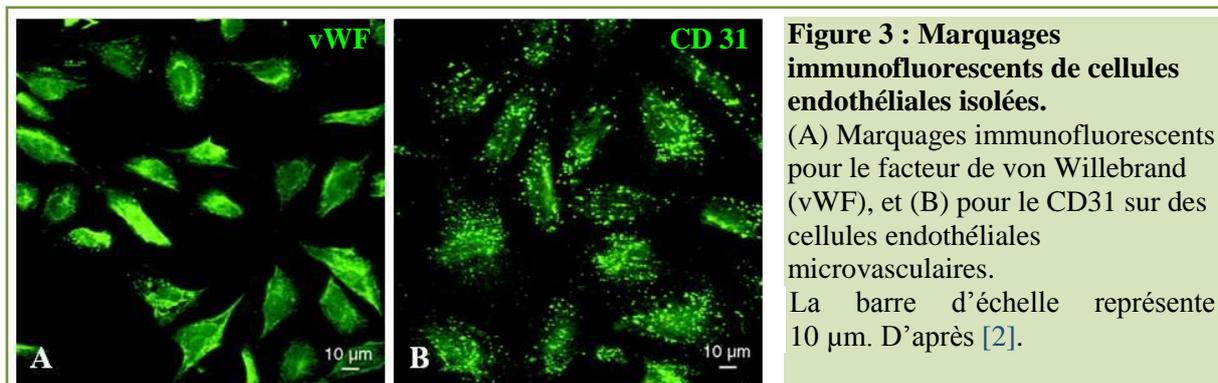
Figure 2 : Composition d'une artère.

Les artères pulmonaires se composent de trois couches concentriques (appelées tuniques). De la lumière vers l'extérieur on distingue : l'intima, composée d'une monocouche de cellules endothéliales en contact avec le milieu sanguin, reposant sur la limitante élastique interne. En contact avec cette limitante se trouve la media, composée de cellules musculaires lisses qui reposent sur la limitante élastique externe. L'adventice est la dernière épaisseur, entourant l'artère à sa périphérie, et est majoritairement composée de fibroblastes.

1.2.1. L'intima et les cellules endothéliales

L'intima est directement en contact avec le milieu sanguin. Elle est composée **d'une monocouche jointive de cellules endothéliales** (CE) partageant les mêmes marqueurs phénotypiques : expression de CD31 et/ou du facteur de von Willebrand (vWF) (Figure 3). Ces cellules qui reposent sur la membrane basale sont organisées longitudinalement par rapport au vaisseau et donc dans le sens de l'écoulement sanguin. Cette orientation est imposée par les forces de cisaillement dues au flux sanguin (shear-stress en anglais). Elles forment une barrière physique entre le milieu sanguin et le muscle lisse sous-jacent, empêchant le passage des liquides, solutés et macromolécules.

L'endothélium détecte les contraintes physiques de l'environnement (forces de frottements dues au flux, forces de tension dues à la pression hydrostatique), ainsi que les variations de la pression partielle artérielle en dioxygène (PO₂). **Les cellules endothéliales grâce à leur position stratégique jouent un rôle primordial dans le métabolisme de la circulation pulmonaire.** De plus, de nombreux médiateurs chimiques favorables au remodelage vasculaire (cytokines inflammatoires, facteurs de croissance...) sont produits par l'endothélium. Ces cellules sont également à l'origine de deux substances vasorelaxantes et antimitotiques importantes : le NO (oxyde nitrique) et la prostacycline.



1.2.2. La media et les cellules musculaires lisses

La média est interposée entre les limitantes élastiques interne et externe. Elle est composée de **cellules musculaires lisses (CML)** (Figure 4). Ces cellules fusiformes d'environ 2 à 5 µm de largeur sont **disposées de façon hélicoïdale perpendiculairement à l'endothélium de l'intima** et possèdent une activité contractile. Cependant, la "composition cellulaire" de l'artère pulmonaire varie selon son diamètre et son rang au sein de l'arbre artériel. Les artères de diamètre important ($\varnothing > 1$ mm chez l'homme adulte) sont des artères dites "élastiques", avec une media composée non seulement de cellules musculaires lisses, mais également de nombreuses fibres d'élastines et de collagène. À l'inverse les artères ayant un diamètre compris entre 1 mm et 100 µm ont peu de fibres élastiques, on parle d'artères musculaires pulmonaires. Dans les artères de petit diamètre ($\varnothing < 100$ µm) l'épaisseur de la couche de cellules musculaires lisses diminue à mesure que l'on descend dans l'arbre vasculaire pulmonaire, pour disparaître dans les capillaires qui ne sont formés que de cellules endothéliales [3].

Des fenêtres au sein des fibres élastiques de la limitante interne permettent la formation de jonctions entre les cellules endothéliales de l'intima et les cellules musculaires lisses de la media. On parle de **jonctions myo-endothéliales**. Ces liaisons sont formées par des connexines qui forment des jonctions communicantes et laissent le passage libre à des petites molécules de moins de 1 kDa. Cette structure permettrait notamment la conduction d'une dépolarisation ou d'une hyperpolarisation de la cellule endothéliale vers la cellule musculaire lisse et inversement, mais également le passage de vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

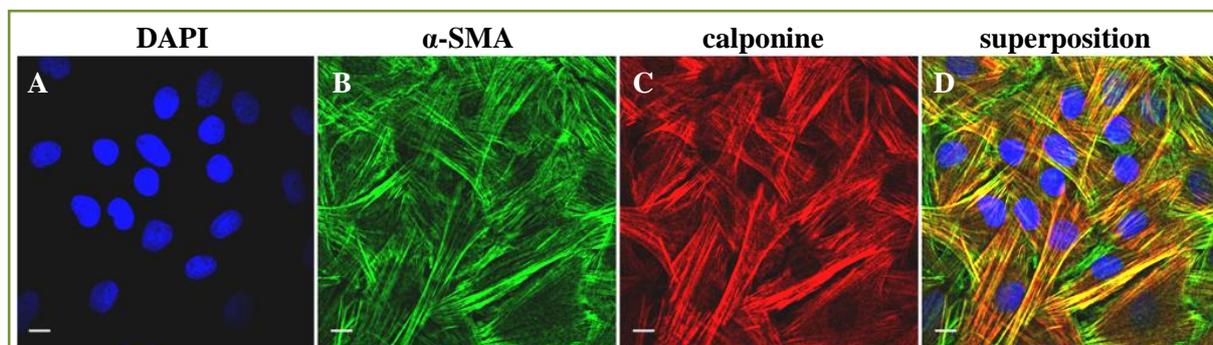


Figure 4 : Marquages immunofluorescents de cellules musculaires lisses d'AIP.

Marquages immunofluorescents de cellules musculaires lisses d'artère intrapulmonaire de rat. (B) L' α -actine du muscle lisse (α -SMA) a été marquée en vert, (C) la calponine en rouge, les noyaux sont marqués en bleu avec du DAPI (A). (D) Superposition des trois canaux. La barre d'échelle représente 10 μ m

1.2.3. L'adventice

Il s'agit de la structure la plus externe de l'artère. Elle joue un rôle de protection et de soutien. Elle est essentiellement composée de **tissu conjonctif**. On y retrouve des fibres de collagène et des fibres élastiques, mais également des **fibroblastes** et des cellules de l'immunité telles que les mastocytes. Dans les vaisseaux de diamètre important, de minuscules vaisseaux sanguins parcourent cette adventice, permettant l'irrigation de la partie externe de la média : ce sont les *vasa vasorum*. C'est également au niveau de l'adventice que les artères sont innervées par les systèmes nerveux sympathique et parasympathique qui participent au contrôle du tonus vasculaire.

2. Physiologie de la circulation pulmonaire

2.1. Pressions, débits, résistances

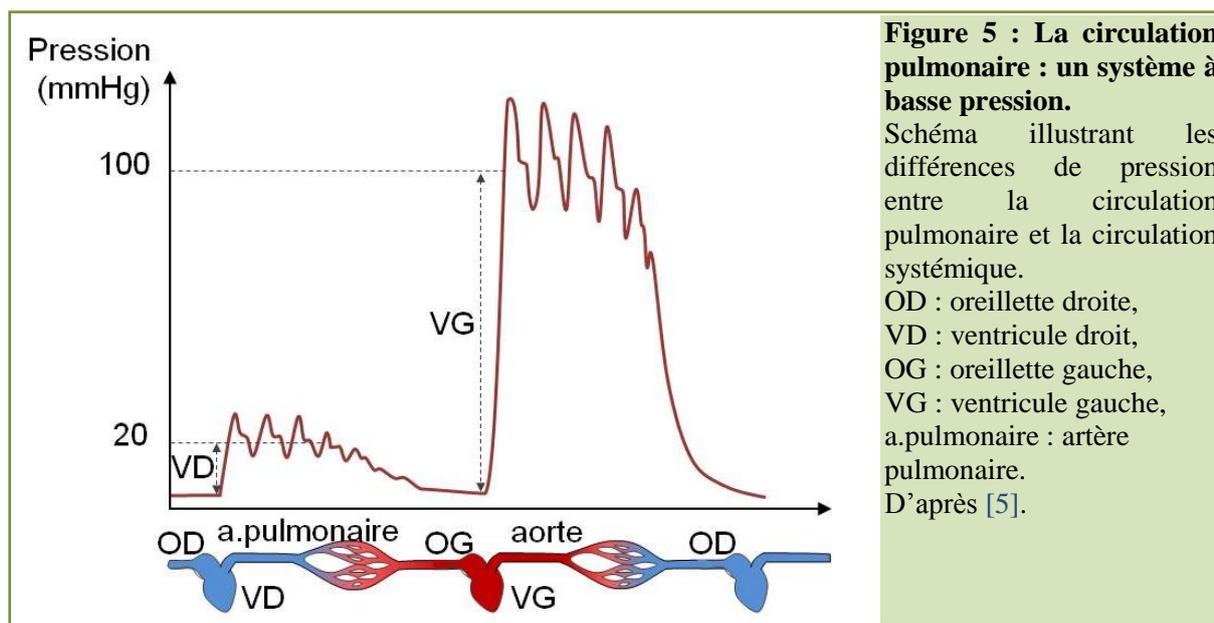
Contrairement à la circulation systémique, la circulation pulmonaire est un **système dit à basse pression**. Mesurée pour la première fois par A. Cournaud et R. A. Bloomfield [4] par cathétérisme cardiaque, la pression artérielle pulmonaire moyenne est d'environ 10 à 15 mmHg (chez un sujet au repos). La pression systolique moyenne est d'environ 22 mmHg et la pression diastolique de 10 mmHg. Le flux sanguin dans l'artère pulmonaire est pulsatile de la même manière que dans l'aorte (Figure 5).

La pression artérielle moyenne (PAPm) se calcule à partir des pressions systolique ($P_{\text{systolique}}$) et diastolique ($P_{\text{diastolique}}$).

$$PAPm = P_{\text{diastolique}} + \frac{1}{3} \times (P_{\text{systolique}} - P_{\text{diastolique}})$$

La circulation pulmonaire est un **système dit à haut débit** et à **faible résistance à l'écoulement**. En conditions physiologiques, la décroissance de la pression sanguine le long du lit vasculaire pulmonaire est constante, alors que dans la circulation systémique la majeure chute de pression s'observe juste en amont des capillaires. En plus d'être faible au repos, la pression artérielle pulmonaire varie peu, même lorsque le débit cardiaque augmente. En effet, les résistances vasculaires pulmonaires ont la capacité de varier lorsque le débit sanguin est modifié.

Ce système perçoit la totalité du débit cardiaque. Cependant, le volume sanguin traversant la circulation pulmonaire est plutôt réduit en comparaison de la circulation systémique avec un volume courant de 500 mL (et seulement 75 mL dans le lit capillaire), alors que la circulation systémique totalise plus de 4 000 mL de sang. La distribution du débit sanguin au sein du poumon est également hétérogène. En effet, du fait de la gravité, le haut du poumon est moins perfusé que le bas, et ce au repos et en position verticale.



2.2. Rôle de la *media*

L'état contractile des CML définit le tonus vasculaire responsable de la régulation de la pression artérielle (via les résistances périphériques, cf. loi de Poiseuille). La paroi des artérioles pulmonaires est relativement fine en comparaison des artérioles de la circulation systémique, et le tonus vasculaire pulmonaire à l'état de base est faible en comparaison de la circulation systémique.

Relation pression/débit:

$$\Delta P = R \cdot \dot{Q}$$

P : pression artérielle

\dot{Q} : débit cardiaque

R = résistances périphériques dues aux frottements du sang contre la paroi des vaisseaux

R est défini par la loi de Poiseuille :

$$R = (8 \cdot \eta \cdot L) / (\pi \cdot r^4)$$

η : coefficient de viscosité du sang

L : longueur du vaisseau

r : rayon du vaisseau

2.3. Mécanismes de régulation

Deux mécanismes passifs permettent également d'assurer le maintien des pressions basses dans la circulation pulmonaire dans des conditions normales : **le recrutement et la distensibilité**.

Le **recrutement** vient du fait que la distribution du sang dans la circulation pulmonaire est extrêmement hétérogène. En effet, chez l'adulte en position assise ou debout, la pression sanguine pulmonaire est décroissante en allant vers les zones supérieures du poumon, et à l'extrême, peut être nulle dans la zone la plus apicale du lobe pulmonaire. Cette zone est donc ventilée mais non perfusée, on parle d'un volume mort alvéolaire. En cas d'augmentation du débit cardiaque (lors d'un exercice par exemple), cette zone peut être recrutée entièrement, il y a recrutement de vaisseaux préalablement non perfusés (Figure 6 B). Il s'agit du principal mécanisme qui permet la diminution des résistances vasculaires pulmonaires suite à une hausse du débit cardiaque.

La **distension** vient de la faible épaisseur de la paroi des vaisseaux et de leurs propriétés viscoélastiques. Les vaisseaux pulmonaires voient leur rayon varier directement avec les variations de pression et de flux (Figure 6 C). Ce mécanisme entrerait en jeu lorsque les pressions deviennent relativement élevées, et que le recrutement est déjà intervenu pour des modifications de pression plus faibles.

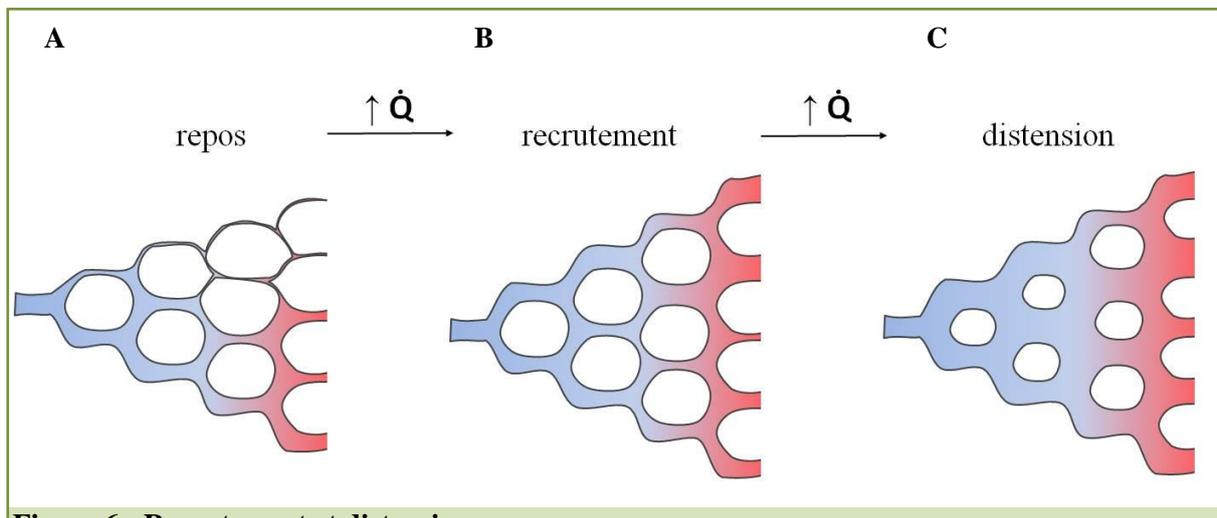


Figure 6 : Recrutement et distension.

Représentation schématique des différents mécanismes permettant de maintenir des résistances vasculaires pulmonaires faibles. (A) Au repos, la perfusion sanguine est nulle dans la partie apicale du poumon. (B) En cas de hausse du débit cardiaque (\dot{Q}), la perfusion de vaisseaux préalablement fermés permet de réduire les résistances à l'écoulement. (C) Si les pressions restent élevées, le rayon des vaisseaux va varier en même temps que les modifications de pression grâce à la faible épaisseur de la paroi des vaisseaux pulmonaires, mais aussi grâce à leurs propriétés viscoélastiques.

3. Intégration des contraintes physiques

De par leur environnement, les cellules du système cardio-vasculaire, et plus particulièrement celles de la circulation pulmonaire sont soumises à des contraintes mécaniques. De nombreux mécanismes opèrent pour détecter les changements hémodynamiques de façon à fournir les réponses adéquates nécessaires au maintien de l'homéostasie. La transduction des forces mécaniques est donc un élément clé dans la régulation du tonus vasculaire et du flux sanguin local. Le Ca^{2+} joue un rôle central dans ces régulations, et l'endothélium aussi bien que le muscle lisse sont impliqués.

On peut distinguer plusieurs formes majeures de stress mécanique : **les forces de cisaillement (shear-stress en anglais), et les forces de compression et de tension au sein de la paroi artérielle (stretch)** qui diffèrent beaucoup en termes d'amplitude, de direction et d'oscillation en fonction du lit vasculaire, mais varient également en intensité et en fréquence au cours du cycle cardiaque (Figure 7).

Les forces de cisaillement sont l'action du flux sanguin sur la surface luminale des vaisseaux sanguins, et en **conditions physiologiques seules les cellules endothéliales y sont exposées**. Il s'agit d'une force de friction (flux parallèle). Comme les cellules musculaires lisses ne sont pas directement exposées au flux sanguin, la réponse de ces dernières au stress mécanique est alors définie comme une réponse à la pression seule et à la tension en absence de tout shear-stress. Une équipe a toutefois montré qu'en conditions pathologiques (en cas de lésions de l'endothélium), le muscle lisse peut lui aussi être exposé à ce shear-stress [6]. L'exposition de CMLAP humaines à un flux génère une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, que les auteurs attribuent à l'activation des canaux TRPM7 et TRPV4 [6].

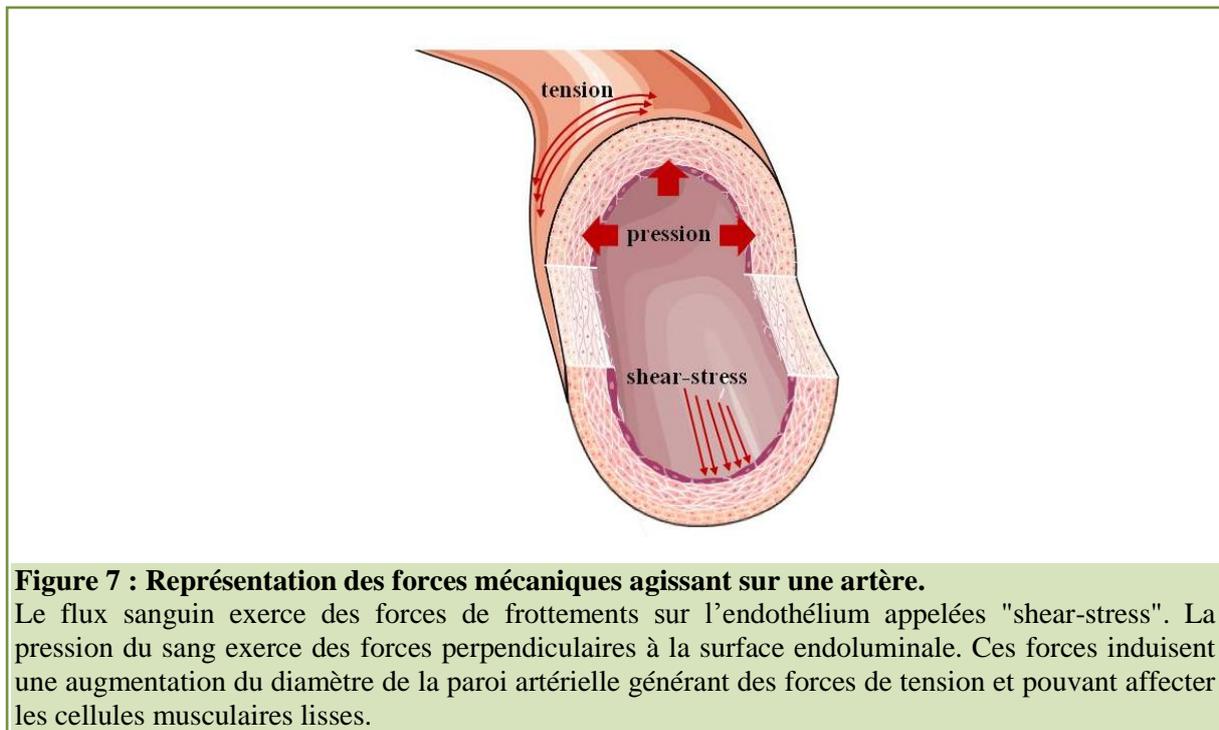


Figure 7 : Représentation des forces mécaniques agissant sur une artère.

Le flux sanguin exerce des forces de frottements sur l'endothélium appelées "shear-stress". La pression du sang exerce des forces perpendiculaires à la surface endoluminale. Ces forces induisent une augmentation du diamètre de la paroi artérielle générant des forces de tension et pouvant affecter les cellules musculaires lisses.

Les forces de tension sont la résultante de l'étirement de la circonférence de la paroi vasculaire due à une distension du diamètre de ce dernier (cf. loi de Laplace). La pression sanguine exerce sur la paroi vasculaire des forces perpendiculaires à la surface endoluminale. Celles-ci sont compensées par des forces intrapariétales tangentielles qui s'opposent aux effets de distension de la pression sanguine. Donc lorsque la pression augmente, les forces de tension augmentent elles aussi, augmentant le stress mécanique et étirant les composants de la paroi artérielle.

Loi de Laplace

$$T = P \cdot \frac{r}{2h}$$

T est la tension pariétale ; P la pression et r le rayon de l'artère et h l'épaisseur de la paroi artérielle

Les cellules musculaires lisses vasculaires sont donc constamment exposées à des déformations mécaniques changeantes et/ou oscillantes de leur environnement direct, et ce de façon répétée. Peu de choses sont connues à l'heure actuelle sur le rôle que joue ce stress mécanique sur ce type cellulaire, et plus particulièrement au sein de la circulation pulmonaire. Il est intéressant de noter que les vaisseaux pulmonaires, en plus des contraintes mécaniques similaires à celles de la circulation systémique, sont soumis à des variations de tension longitudinale due à l'élongation axiale du tissu pulmonaire durant le cycle respiratoire [7].

4. La vasoconstriction hypoxique pulmonaire

4.1. Principe

La vasoconstriction hypoxique pulmonaire est le réflexe de contraction du muscle lisse vasculaire pulmonaire en réponse à une baisse locale de la pression partielle en oxygène (PO_2) en dessous du seuil de 60 mmHg. C'est **la seule circulation d'organe capable de réagir à une hypoxie par une vasoconstriction**, et cette réponse à l'hypoxie constitue la principale différence entre la circulation pulmonaire et la circulation systémique, qui répond à l'hypoxie par une vasodilatation.

C'est en 1946 qu'Ulf von Euler et Göran Liljestrand [8] proposent le mécanisme de vasoconstriction hypoxique pulmonaire comme étant **un mécanisme d'adaptation physiologique** lors d'une hypoxie alvéolaire localisée. Cette réponse spécifique à l'hypoxie dévie le flux sanguin vers les alvéoles les mieux ventilées (avec une PO_2 alvéolaire élevée). Ceci ajuste, dans une zone restreinte, le rapport entre la ventilation alvéolaire et la perfusion sanguine à une valeur la plus proche de la valeur optimale, et permet ainsi de maintenir une oxygénation artérielle efficace. En d'autres termes, si le sang veineux circule au contact des alvéoles en hypoxie (PO_2 alvéolaire faible) au détriment des alvéoles bien oxygénées, la circulation pulmonaire n'assure plus la réoxygénation du sang, action délétère pour l'organisme tout entier. Cette vasoconstriction hypoxique concourt donc **au maintien de la réoxygénation du sang**, c'est un mécanisme de régulation (Figure 8).

En condition optimale, le rapport entre la ventilation alvéolaire (V_a) et la perfusion sanguine (\dot{Q}) est maintenu proche de 1 :

$$\frac{V_a}{\dot{Q}} = 1$$

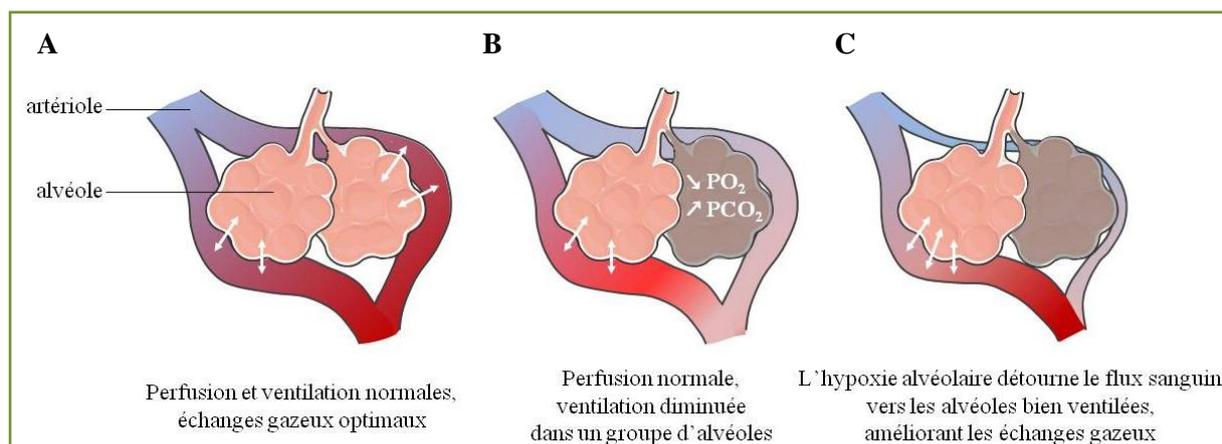


Figure 8 : La vasoconstriction hypoxique pulmonaire.

(A) Lorsque l'on a une ventilation alvéolaire et une perfusion sanguine normale, les échanges gazeux sont optimaux (rapport ventilation / perfusion = 1). (B) En cas de ventilation alvéolaire diminuée, si la perfusion ne change pas, le bilan final aura une efficacité moindre (moins de réoxygénation). (C) La vasoconstriction hypoxique pulmonaire permet de détourner la perfusion sanguine vers les zones bien ventilées, améliorant ainsi les échanges gazeux.

4.2. Régulation

La vasoconstriction hypoxique pulmonaire est déjà **présente chez le fœtus** et y joue un rôle essentiel. En effet, avant la naissance, les poumons ne sont pas ventilés, le sang est réoxygéné via le placenta. On observe alors une forte vasoconstriction hypoxique pulmonaire qui permet de rediriger le flux sanguin vers la circulation fœtale systémique. À la naissance, après la première inspiration les poumons se gonflent. On observe alors une forte augmentation du débit dans la circulation pulmonaire permettant ainsi au système d'assurer la bonne oxygénation du sang.

L'effet maximal de cette vasoconstriction hypoxique pulmonaire est observé pour des PO_2 alvéolaires comprises entre 25 et 50 mmHg. Cependant pour des PO_2 alvéolaires inférieures à 25 mmHg, la vasoconstriction hypoxique pulmonaire devient moins efficace : l'hypoxie est trop importante, et la vasoconstriction hypoxique n'est plus suffisante, empêchant la perfusion correcte du poumon [9]. Cette vasoconstriction hypoxique pulmonaire est bénéfique en cas d'hypoxie alvéolaire localisée, mais elle est délétère en cas d'hypoxie généralisée (lors d'un séjour prolongée en altitude par exemple).

Le mécanisme de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire n'est pas encore bien élucidé. Il est cependant admis que **les cellules musculaires lisses des petites artères (de calibre inférieur à 300 μm) sont le siège de cette réaction**. Ces artéioles longent les bronchioles terminales et respiratoires, il est donc probable que la PO_2 de la paroi de ces petites artères soit plus proche de la PO_2 alvéolaire que de la PO_2 du sang riche en CO_2 [10].

Des expériences de patch-clamp ont montré que l'hypoxie aiguë provoquait l'inhibition de canaux potassiques des cellules musculaires lisses vasculaires pulmonaires, conduisant à la dépolarisation de ces dernières, à un influx de calcium (via des canaux calciques voltage-dépendants) et à la contraction du muscle lisse [11-14].

5. Physiopathologie de la circulation pulmonaire

5.1. Généralités

Au cours d'une hypoxie généralisée (hypoxie d'altitude, lésions pulmonaires diffuses), la vasoconstriction hypoxique pulmonaire se généralise elle aussi et entraîne une élévation de la pression artérielle pulmonaire qui peut être considérable. Si l'hypoxie perdure, des modifications structurales des artères pulmonaires de petit calibre interviennent. On observe notamment une diminution de la lumière des artérioles, due en partie à un épaississement de la paroi musculaire, mais aussi **une muscularisation de vaisseaux normalement dépourvus de muscle lisse** : les artères distales et pré-capillaires. On observe également une réduction du nombre d'artérioles fonctionnelles [15-17]. Ces modifications aboutissent à une hypertension pulmonaire dite **fixée**.

Ces phénomènes sont notamment provoqués par la **prolifération** des cellules musculaires lisses de la media, des fibroblastes du tissu conjonctif de l'adventice et à la turgescence des cellules endothéliales. La diminution de la lumière alors engendrée provoque **une augmentation des résistances vasculaires** et donc une augmentation de la pression sanguine intraluminale (cf. loi de Poiseuille). Toutefois ces altérations sont réversibles après retour à la normoxie. Ces phénomènes varient considérablement en fonction de l'âge (plus important chez le nouveau-né que chez l'adulte), du sexe (protection par les œstrogènes), et de l'espèce étudiée.

En altitude par exemple, la pression partielle en oxygène de l'air atmosphérique est diminuée. À 4500 m, celle-ci est proche de 55 mmHg, et cette chute de la PO₂ est responsable d'une hypoxie généralisée à tout le poumon. À court terme, l'hypoxie entraîne des mécanismes d'adaptation afin de palier à la baisse de la PO₂, avec par exemple, une augmentation de la production de globules rouges par la moelle osseuse via l'érythropoïétine (EPO). Cependant, une hypoxie généralisée induit également une vasoconstriction globale qui peut être responsable de la survenue d'une hypertension pulmonaire chez des sujets séjournant en haute altitude [15, 16, 18-22].

Il est toutefois intéressant de noter que des différences existent entre des personnes acclimatées à l'altitude (c'est-à-dire qui sont nées dans des conditions de normoxie avant de vivre en altitude) et des personnes natives. Des études ont été menées sur les populations humaines natives des hauts plateaux (population des Andes, du Tibet et des hauts plateaux d'Éthiopie) et ont montré que ces populations présentaient des adaptations différentes à la vie en altitude. En Amérique du Sud, les sujets nés en altitude présentent une moins grande sensibilité aux variations d'oxygène par rapport aux sujets des plaines. Cette particularité n'est pas partagée par les populations tibétaines qui ont développé au fil des générations des mécanismes d'adaptation différents [23]. Les populations andines présentent un hémocrite (le pourcentage volumétrique occupé par les globules rouges dans le sang) élevé, or **chez les Tibétains, l'hématocrite est identique à celui des hommes vivant au niveau de la mer**, et ils ne développent pas d'hypertension pulmonaire. Ils présentent également des pressions artérielles pulmonaires plus faibles.

L'hypertension pulmonaire est **l'une des principales pathologies de la circulation pulmonaire**. Cette pathologie répertoriée comme rare en n'est pas moins mortelle. À l'heure actuelle, aucun traitement curatif n'est disponible. Il s'agit d'une pathologie complexe, possédant de multiples causes génétiques et pathogéniques.

L'hypertension pulmonaire est une maladie invalidante de mauvais pronostic. La pathologie se caractérise par **une augmentation progressive des résistances vasculaires pulmonaires** principalement due à des changements structuraux et fonctionnels des petites artères pulmonaires ($\varnothing < 500 \mu\text{m}$). Cette pathologie se caractérise par une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne (PAPm) au dessus de 25 mmHg au repos (au lieu de 10 mmHg dans les conditions physiologiques) [24-26]. Cette augmentation des résistances vasculaires pulmonaires s'oppose à l'éjection ventriculaire droite (augmentation de la post-charge) et augmente le travail du cœur droit. Ce dernier subit une hypertrophie qui aboutit à **une insuffisance cardiaque droite** au cours de laquelle le débit cardiaque est inadapté même au repos, et à terme, peut **mener au décès du patient**.

Un dépistage peut être effectué à l'hôpital par une échographie cardiaque et permet de déceler l'hypertension pulmonaire (en décelant une éventuelle hypertrophie cardiaque droite). Par ailleurs, l'échographie couplée au test de marche de 6 minutes permet un dépistage non invasif de l'hypertension pulmonaire [27, 28]. Ce test consiste à évaluer la distance parcourue par le patient en 6 minutes. Cette distance est significativement plus courte chez les patients atteints d'une HTP. Cependant, **seule la procédure invasive de la mesure de la pression artérielle pulmonaire par cathétérisme cardiaque droit** permet d'établir un diagnostic formel.

5.2. Classification

Il existe plusieurs types d'hypertension pulmonaire, classés par l'Organisation Mondiale de la Santé. En 2008, le quatrième symposium mondial de l'hypertension pulmonaire a mis en place une nouvelle classification, divisant l'hypertension pulmonaire en cinq groupes [29, 30]. Cette classification a été revue en 2013, lors du 5^{ème} congrès mondial de l'hypertension pulmonaire à Nice et mise à jour en août 2015 (Tableau 1). Cette classification permet notamment d'avoir une classification commune pour les adultes et les enfants.

Le groupe 1 : Il regroupe les **hypertensions artérielles pulmonaires (HTAP)**. Les HTAP sont divisées en 5 sous-groupes : (1) les formes idiopathiques, qui correspondent aux formes de la maladie dont le facteur de risque n'est pas identifié. (2) Les formes héritables (familiales) qui surviennent en présence d'une mutation au niveau d'un des gènes identifiés comme étant à prédisposition. (3) Les HTAP induites par des drogues/toxines et les anorexigènes. (4) Les HTAP liées à diverses pathologies telles que l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), l'hypertension portale, les cardiopathies congénitales avec un shunt gauche-droit : la schistosomiase. La prévalence de l'hypertension artérielle pulmonaire est de 15 cas par million d'habitant en France, avec 2,4 nouveaux cas par million par an [31]. Elle touche 1,7 femme pour un homme. Le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans.

Il est important de distinguer "**l'hypertension pulmonaire (HTP)**" qui regroupe toutes les groupes d'hypertensions pulmonaires et "**l'hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)**" qui regroupe uniquement les hypertensions pulmonaires du groupe 1.

Le groupe 2 regroupe les **hypertensions pulmonaires liées à une cardiopathie gauche**. Il s'agit de la cause la plus fréquente d'HTP. On note par exemple des HTP associée à une maladie de l'oreillette ou du ventricule gauche, mais également des maladies valvulaires du cœur gauche.

Le groupe 3 concerne les **hypertensions pulmonaires liées à une maladie pulmonaire obstruant les voies aériennes** : asthme, broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou à une hypoxie chronique, incluant la vie en haute altitude. L'apnée obstructive du sommeil peut également être une cause de développement d'une HTP de groupe 3. Il est intéressant de noter que les individus développant une HTP de ce groupe présentent une PAPm n'excédant pas 35 mmHg. Ces HTP sont donc moins sévères que les HTAP (HTP du groupe 1) qui provoquent des PAPm supérieures à 40 mmHg [32].

Le groupe 4 est constitué des **hypertensions pulmonaires thromboemboliques chroniques (CTEPH)**, c'est-à-dire secondaires à une obstruction des artères pulmonaires.

Le groupe 5 concerne les **hypertensions pulmonaires ayant des mécanismes multifactoriels incertains**, incluant les désordres hématologiques et systémiques.

1. Hypertension artérielle pulmonaire (HTAP)
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. HTAP idiopathique 1.2. HTAP héritable <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. Gène BMPR2 1.2.2. Gène autre 1.3. Induite par toxines ou des médicaments 1.4. Associée à : <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Une connectivité 1.4.2. Une infection par le VIH 1.4.3. Une hypertension portale 1.4.4. Une cardiopathie congénitale 1.4.5. Une schistosomiase
1'. Maladie veino-occlusive pulmonaire et hémangiomatose capillaire pulmonaire
<ul style="list-style-type: none"> 1'.1. Idiopathique 1'.2. Héréditaire <ul style="list-style-type: none"> 1.2.1. Gène EIF2AK4 1.2.2. Gène inconnu 1'.3. Induite par la prise de toxines ou de médicaments ou à une irradiation 1'.4. Associée à : <ul style="list-style-type: none"> 1.4.1. Une connectivite 1.4.2. Une infection par le VIH
1''. Hypertension pulmonaire persistante du nouveau-né
2. Hypertension pulmonaire associée à une maladie du cœur gauche
<ul style="list-style-type: none"> 2.1. Dysfonction systolique du ventricule gauche 2.2. Dysfonction diastolique du cœur gauche 2.3. Maladies valvulaires 2.4. Obstructions congénitales ou acquises au niveau du tract d'éjection ou de remplissage du ventricule gauche et cardiomyopathies congénitales
3. Hypertension pulmonaire (HTP) due à une maladie pulmonaire ou à une hypoxie chronique
<ul style="list-style-type: none"> 3.1. Broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) 3.2. Maladie pulmonaire interstitielle 3.3. Autres maladies respiratoires avec un profil restrictif et obstructif mixte 3.4. Troubles d'apnée du sommeil 3.5. Hypoventilation alvéolaire 3.6. Exposition chronique aux hautes altitudes 3.7. Anomalies du développement pulmonaire
4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (CTEPH) et obstruction artérielle pulmonaire
<ul style="list-style-type: none"> 1.1. CTEPH 1.2. Autre obstruction artérielle pulmonaire
5. Hypertension pulmonaire ayant des mécanismes multifactoriels incertains
<ul style="list-style-type: none"> 5.1. Troubles hématologiques : anémie hémolytique chronique, syndromes myéloprolifératifs, splénectomie 5.2. Troubles systémiques : sarcoïdose, lymphangioléiomyomatose, histiocytose à cellules de Langerhans pulmonaires 5.3. Troubles métaboliques : glycogénose, maladie de Gaucher, dysthyroïdies 5.4. Divers : obstruction pulmonaire tumorale, médiastinite fibrosante, insuffisance rénale chronique, hypertension pulmonaire segmentaire <p>BMPR : Bone Morphogenic Protein Receptor type II ; VIH : Virus de l'immunodéficience Humaine</p>

Tableau 1 : Classification des hypertensions pulmonaires.

Classification de Dana Point de 2008, modifiée à Nice en 2013 et revue en 2015 [33, 34].

6. La vasoréactivité dans l'hypertension pulmonaire

L'HTP se manifeste en partie par une vasoconstriction trop importante et soutenue des artères intrapulmonaires. Différents stimuli perçus par les artères intrapulmonaires ont pour effet d'induire une contraction via une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ au niveau des CMLAP.

6.1. Le tonus myogénique

Les artères de petit diamètre de la circulation systémique ont la capacité de répondre aux variations de pression intraluminaire. Ainsi, une augmentation de la pression va induire une vasoconstriction des ces artères pré-capillaires, augmentant la résistance à l'écoulement, et prévenant l'augmentation de pression au niveau du lit capillaire. **Ce phénomène adaptatif permet de protéger les capillaires de toutes variations brusques de pression**, ces derniers ne pouvant supporter une hausse de la pression hydrostatique. Décrit pour la première fois par William Bayliss en 1902 [35], il s'agit d'un mécanisme appelé tonus myogénique car il est uniquement dû à une intervention du muscle lisse vasculaire indépendamment de tout facteur neuronal ou hormonal.

Cependant, **ce mécanisme n'a pas encore été clairement démontré en conditions physiologiques dans la circulation pulmonaire**, [36-40]. Cette réponse inhérente au muscle lisse vasculaire existe pourtant dans la circulation pulmonaire fœtale humaine [41]. De plus, des études décrivent une réponse du muscle lisse vasculaire pulmonaire (contraction) en réponse à un étirement (augmentation de la charge) d'artères pulmonaires *in vitro*. Ces travaux ont été menée aussi bien chez le cobaye [42], le lapin [43, 44], le mouton [45] et le chat [46]. Mais son observation reste controversée chez le rat sain. Une étude montre la présence d'un tonus myogénique dans les petites artères intrapulmonaires (\varnothing entre 50 et 150 μ m) de rat [39], mais d'autres études ne montrent aucune contraction suite à l'augmentation de la pression intraluminaire [40], ou en réponse à un étirement [47]. À ce jour aucune étude n'a démontré ce mécanisme dans la circulation pulmonaire chez l'Homme.

À l'inverse, il a été montré *in vitro* que les artères intrapulmonaires issues de rats souffrant d'HTP (rats hypoxiques chroniques décrit dans la section modèles animaux) présentaient un tonus myogénique [39, 47]. **L'apparition et/ou l'exacerbation de ce tonus myogénique au sein des artères intrapulmonaires dans l'HTP participent à l'augmentation des résistances à l'écoulement.**

6.2. L'hyperréactivité des artères pulmonaires

Au cours de l'HTP, les artères intrapulmonaires présentent une hyperréactivité aux agonistes vasoconstricteurs, notamment à la sérotonine (5-HT) [48-50]. En effet, chez les patients souffrant d'HTP, **le taux plasmatique de 5-HT est augmenté** [51]. En plus d'être transportée par les plaquettes, la 5-HT est synthétisée au niveau pulmonaire [52]. De plus, les cellules endothéliales issues de patients souffrant d'HTP expriment plus d'ARNm codant pour la tryptophane hydrolase 1, enzyme de voie de synthèse de la 5-HT [53]. Cette augmentation du taux de 5-HT augmente la vasoconstriction par sa fixation sur ses récepteurs 5-HT-2A et 5-HT-2B [54]. Enfin, l'analyse de tissus issus de patients HTAP révèle une surexpression du transporteur de la sérotonine (5-HTT) [55], augmentant son internalisation et son rôle mitotique. **Les taux pulmonaires et circulants d'endothéline-1 (ET-1) sont également augmentés** chez l'humain et l'animal au cours de l'HTP [56]. Sa fixation sur son récepteur

ET-A, au niveau de la CMLAP, provoque une augmentation rapide de la $[Ca^{2+}]_i$, une activation de la protéine-kinase C (PKC) et une vasoconstriction [57].

7. Aspects cellulaires de l'hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire se caractérise également par un **remodelage vasculaire pulmonaire** qui concerne les différentes épaisseurs de la paroi artérielle. Cet épaissement est dû à une hypertrophie (croissance cellulaire) et une hyperplasie (prolifération) des cellules vasculaires qui aboutissent à **une muscularisation des petites artères précédemment non-muscularisées** (Figure 9) ainsi qu'à une augmentation de l'épaisseur de la média.

Ce remodelage de la paroi vasculaire s'accompagne d'une production exagérée de matrice extracellulaire et d'une résistance à l'apoptose [58]. Ces phénomènes concourent à une augmentation des résistances vasculaires pulmonaires aboutissant à une élévation de la pression artérielle pulmonaire moyenne.

Au cours du développement de l'HTP, des lésions de l'endothélium apparaissent et contribuent à l'augmentation des résistances périphériques.

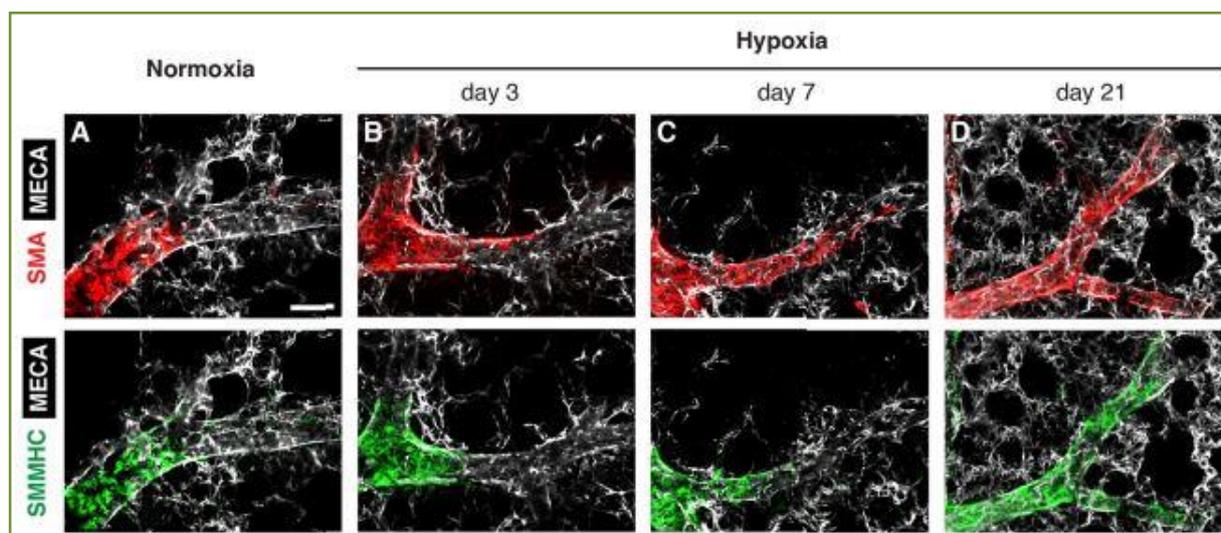


Figure 9 : Muscularisation d'une artériole intrapulmonaire induite par l'hypoxie.

Images obtenues par immunofluorescence confocale d'un poumon de souris adulte exposée à la normoxie (A) ou à l'hypoxie durant 3, 7 et 21 jours (B-D). Le poumon a été marqué pour l' α -actine de muscle lisse (SMA, en rouge), pour la chaîne lourde de la myosine de muscle lisse (SMMHC-en vert) et pour le MECA-32 (en blanc), un marqueur des cellules endothéliales. La barre d'échelle représente 25 μ m. D'après [59].

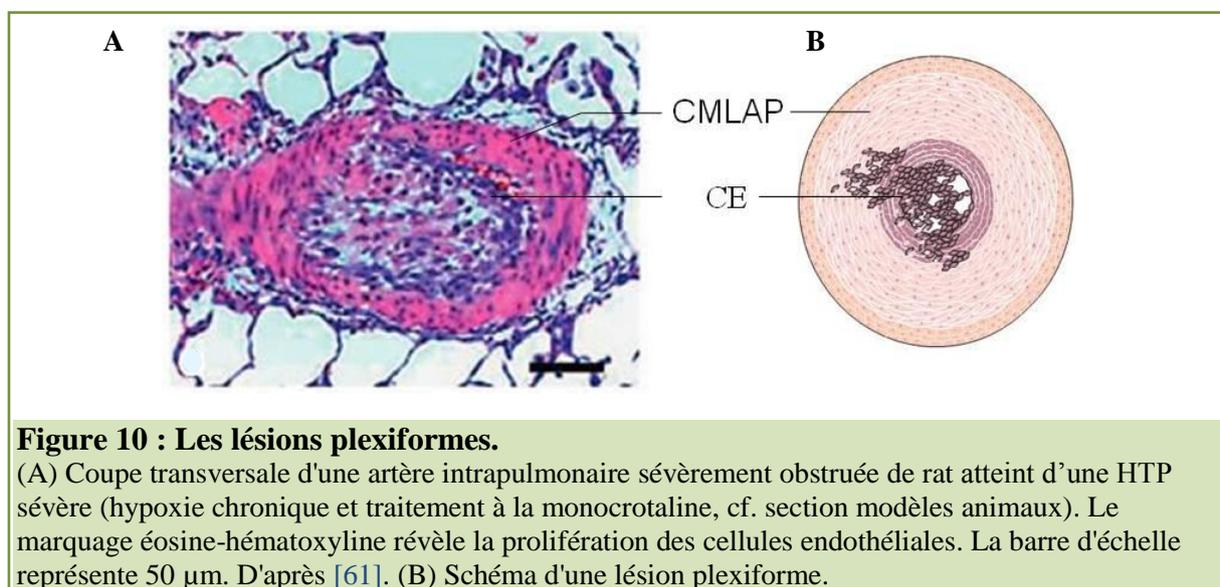
7.1. La dysfonction endothéliale

On parle de dysfonction endothéliale lorsque **l'équilibre entre production de vasoconstricteurs et vasodilatateurs est déplacé en faveur d'une vasoconstriction** [60]. Chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire, la production endogène de vasodilatateurs est faible. Les niveaux de prostacyclines sont également faibles, c'est pourquoi l'administration de prostaglandine I_2 (prostacycline) fait partie de l'une des stratégies médicamenteuses mises en place pour palier aux symptômes de l'HTP. La majorité

des traitements de l'HTP actuels vise à contrer cette dysfonction endothéliale en cherchant à rétablir la balance de production vasoconstricteurs/vasodilatateurs des artères pulmonaires.

7.2. Les lésions plexiformes

Une des caractéristiques de l'hypertension pulmonaire chez l'Homme est une surprolifération des cellules endothéliales qui conduit à la formation de **lésions plexiformes**. Ces lésions complexes et désorganisées sont constituées d'un plexus de petits canaux bordés de cellules endothéliales soutenues par un stroma contenant des myofibroblastes et des protéines de la matrice extracellulaire (Figure 10). Cette fibrose concentrique réduit la lumière des artères intrapulmonaires. Les mécanismes précurseurs de cette prolifération des cellules endothéliales restent encore inconnus, notamment à cause de la difficulté d'étudier ces lésions, car **absentes de plusieurs modèles animaux d'HTP** (cf. partie modèles animaux), seuls quelques uns d'entre eux présentent de telles lésions : le modèle sévère d'hypoxie chronique couplé à l'injection de monocrotaline [61], et le modèle de rat SUGEN (inhibition du récepteur 2 du VEGF avec le SU 5416) [62].



7.3. La prolifération des CMLAP

La muscularisation des artères de faible diamètre s'explique en partie par la prolifération des CMLAP.

La prolifération excessive des CMLAP survenant au cours de l'HTP est dite concentrique : elle augmente l'épaisseur de la media et conduit à la diminution de la lumière du vaisseau. Plusieurs mécanismes et facteurs interviennent dans ces phénomènes de prolifération. On peut noter une augmentation du taux de facteurs de croissance circulants. Par exemple le PDGF (Platelet Derived Growth Factor), l'EGF (Endothelium Growth Factor) sont augmentés dans les artérioles de patients avec hypertension pulmonaire [63].

L'augmentation du taux de sérotonine (5-HT) circulant observée chez les patients HTP induit une prolifération excessive des CMLAP [64-66]. La sérotonine induit également une hypertrophie et une hyperplasie des CMLAP bovines en culture [67]. Les mécanismes par lesquels la 5-HT exerce son rôle mitogène impliquent une production d'anions superoxydes [68], qui activent ensuite des MAP kinases qui à leur tour induisent l'expression de facteurs de

transcription tels que c-Fos et GATA-4, menant à l'hypertrophie et l'hyperplasie des CMLAP [64, 69, 70].

Des microARN interviennent également dans l'induction de la prolifération des CMLAP, comme le montrent les travaux de S. Malenfant et ses collègues [71].

Des études récentes proposent des mécanismes de transdifférenciation comme source de l'excès de CMLAP dans l'HTP, notamment les fibroblastes, les péricytes, les cellules endothéliales et des cellules hématopoïétiques. Ces cellules concourraient à l'extension de la *media* par des mécanismes de transdifférenciation [60, 72-75].

7.4. La migration des CMLAP

Un autre processus important intervenant dans la muscularisation des petites artères au cours de l'HTP est la migration cellulaire. Il s'agit d'un processus complexe qui intervient via une déformation de la cellule et qui permet à cette dernière de se déplacer au sein de son environnement.

7.4.1. Mécanismes

Rappelons tout d'abord que la forme de la cellule dépend de la présence et de l'organisation de **trois types de filaments qui forment son cytosquelette**. On distingue : le cytosquelette d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules (Figure 11). Les réseaux d'actine et de microtubules sont directement liés aux phénomènes migratoires grâce à leurs propriétés de polymérisation/dépolymérisation, ainsi qu'aux propriétés contractiles du réseau d'actine en présence de myosine, une autre protéine importante. La cellule produit deux types de prolongements membranaires au cours de la migration : le lamellipode et le filopode qui impliquent des facteurs moléculaires et des mécanismes d'association de l'actine différents.

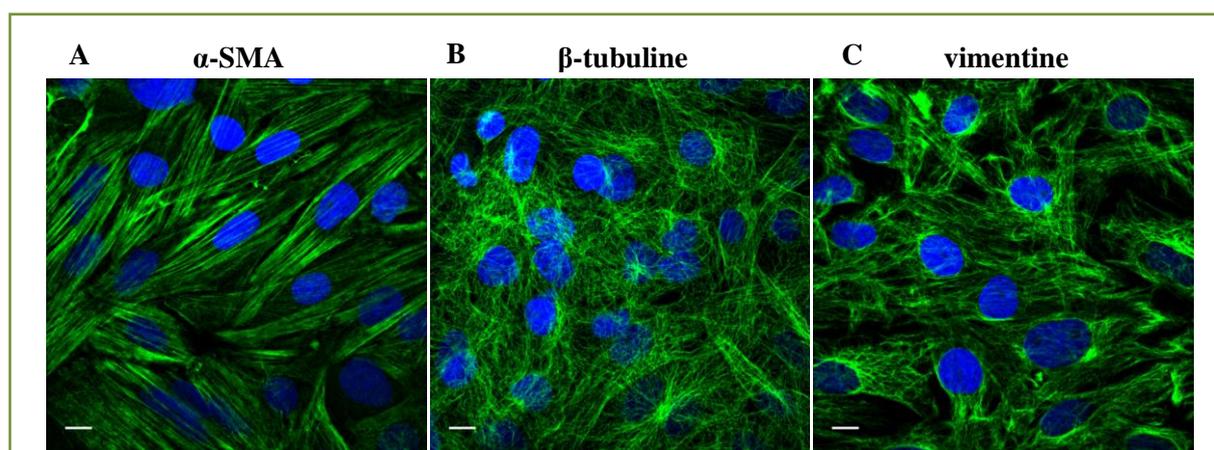


Figure 11 : Marquages immunofluorescents du cytosquelette de CMLAP.

(A) Marquage du cytosquelette d'actine avec un anticorps dirigé contre l' α -actine du muscle lisse (α -SMA). (B) Marquage des microtubules avec un anticorps dirigé contre la β -tubuline. (C) Marquage des filaments intermédiaires avec un anticorps dirigé contre la vimentine. Les noyaux sont marqués au DAPI. La barre d'échelle représente 10 μ m.

La migration est un processus en trois étapes. Ce processus commence par la stimulation de récepteurs de surface qui vont transduire le signal externe à une série d'événements de restructuration du cytosquelette (Figure 12). Des signaux précoces visent essentiellement le remodelage du cytosquelette d'actine, notamment via la polymérisation qui permet de créer des protrusions cellulaires au niveau de l'extrémité "avant" de la cellule (au niveau du front de migration). On nomme cette frange de la cellule, lamellipode. Cette extension de la cellule permet d'avoir une large surface de contact avec la matrice extracellulaire. Souvent, cette réaction de la cellule "suit" des chemoattractants, tels que PDGF (platelet derived growth factor) ou VEGF (vascular endothelium growth factor).

Ensuite, l'adhésion du lamellipode s'effectue par des contacts cellulaires au niveau de la matrice sous-jacente. Ces contacts jouent également un rôle dans la transduction de signaux qui vont intervenir dans le phénomène de migration (Figure 12).

Enfin, la contraction de l'arrière de la cellule par le complexe d'actomyosine (queue de rétraction), accompagnée du détachement des adhésions cellulaires avec le remodelage du cytosquelette, permettent à la cellule de se projeter en avant (Figure 12).

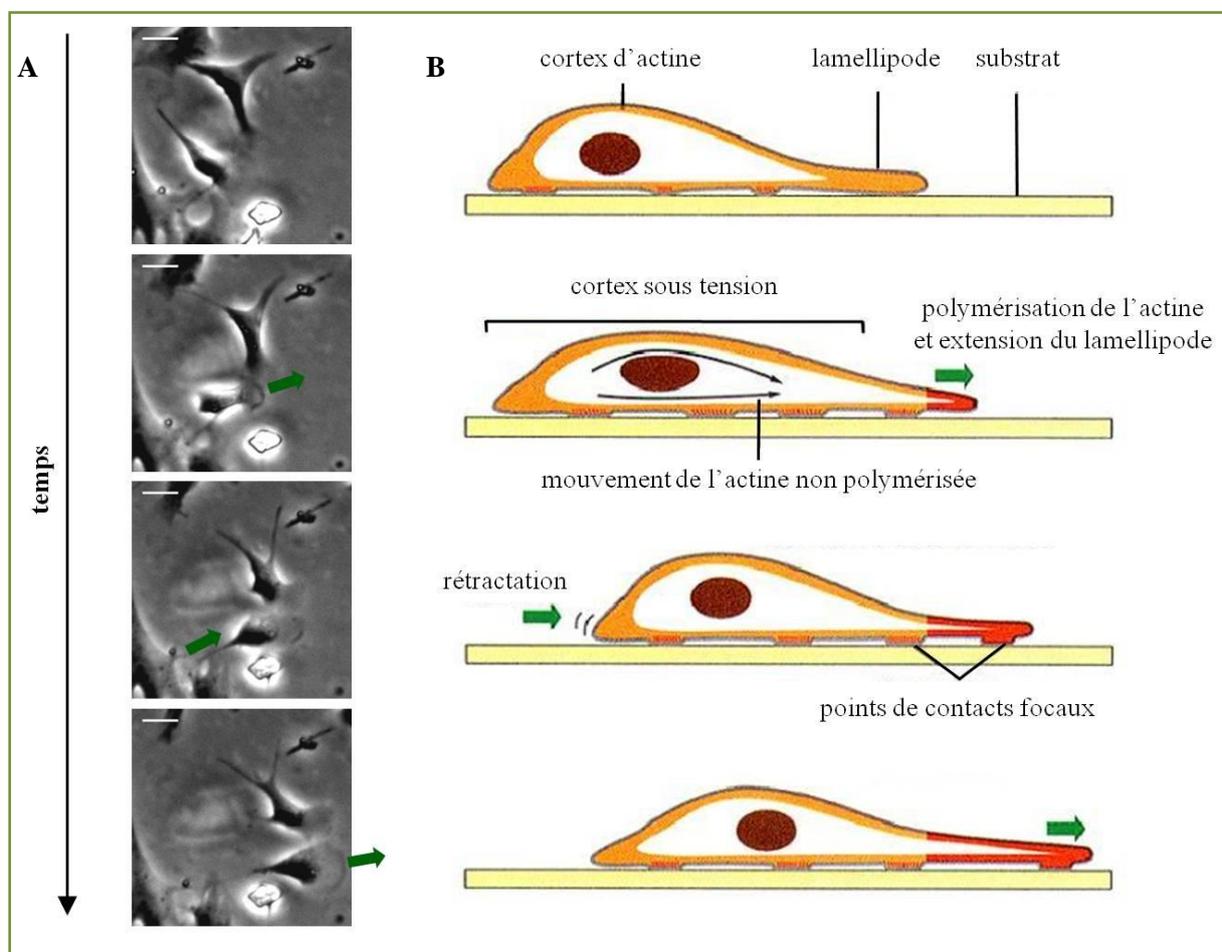


Figure 12 : Mécanismes de la migration cellulaire

(A) Suivi d'une CMLAP migrante en 'time-lapse'. La CMLAP en migration avance sur son support en créant une extension cytoplasmique à l'avant : le front de migration, puis la queue de la cellule se détache et se rétracte. Acquisition "time-lapse" en contraste de phase de CMLAP de souris en migration. Chaque image est prise à un intervalle de 10 minutes. La barre d'échelle représente 50 µm.

(B) Schémas illustrant les différents mécanismes intervenant lors de la migration. D'après [76].

7.4.2. Activation et régulation

Un influx calcique dans la cellule est capable d'activer la protéase calcium-dépendante : la calpaïne. Cette protéine est connue pour être impliquée dans l'élongation et la locomotion des cellules adhérentes [77, 78]. Dans les myoblastes du muscle squelettique, cette activation résulte en la dégradation de MARCKS (myrystoylated alanin rich C kinase substrates), une famille de protéines qui lient l'actine et réguleraient probablement l'adhésion cellulaire à la matrice [79].

La migration des cellules musculaires lisses pulmonaires est connue non seulement pour être modulée par les variations de la $[Ca^{2+}]_i$, mais aussi pour être **induite par l'hypoxie** [80, 81]. D'autres mécanismes moléculaires interviennent également dans la migration des CMLAP. R. Paulin et ses collègues [82] montrent que l'inhibition des FAK kinases fait diminuer la motilité des cellules musculaires lisses d'artères pulmonaires et réprime la prolifération de ces cellules, diminuant ainsi le remodelage au niveau vasculaire. Une étude montre également que les métalloprotéinases de la matrice extracellulaire (MMP) MMP2 et MMP9, enzymes impliquées dans la migration, sont surexprimées au cours de l'HTP au niveau des lésions plexiformes.

L'aquaporine (AQP1 - protéine canalaire) est également connue pour jouer un rôle dans la migration. Au cours de l'hypoxie on observe une augmentation de l'expression d'AQP1 de façon calcium dépendante [83]. Cette augmentation d'expression d'AQP1 peut être due au flux d'eau sur la membrane cellulaire, et pourrait jouer sur la direction prise par les cellules au cours de la migration [84]. Des études récentes montrent qu'AQP1 agit également avec des microARN et RhoB dans la migration induite par l'hypoxie (répression, activation ou changement du Ca^{2+}). De plus, il est désormais admis qu'AQP1 participe au **remodelage du cytosquelette**, phénomène requis pour la migration cellulaire [85]. Une autre étude montre une surexpression de deux protéines associées à l'actine (CapG et la transgeline) dans des PASMCM humaines après un séjour en hypoxie [86].

Une étude du laboratoire [87] montre également **un remodelage du cytosquelette après activation des canaux TRPV1 ou TRPV4**. L'activation de ces canaux induit une potentialisation de la migration des cellules musculaires lisses issues d'artères intrapulmonaires de rat.

8. Homéostasie calcique dans l'hypertension pulmonaire

Le calcium est l'un des principaux messagers intracellulaires, notamment dans la CMLAP où **il joue un rôle central en intervenant dans les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de l'HTP** : la contraction, la prolifération et la migration.

8.1. Les différentes sources de calcium dans la CMLAP

La $[Ca^{2+}]_i$ cytoplasmique basale est maintenue à des niveaux bas en conditions de repos (100-200 nM) par rapport à la concentration calcique extracellulaire (1-2 mM). Cette quantité de calcium libre présente dans le cytoplasme à un instant t est finement régulée, c'est ce que l'on appelle **l'homéostasie calcique**. Des élévations transitoires ou soutenues de la concentration calcique intracellulaire suite à un stimulus sont décodées par la cellule en vue de donner une réponse adaptative. En effet, **l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ basale** au sein de la cellule musculaire lisse vasculaire pulmonaire est requise pour la croissance cellulaire [88, 89] et la migration [83]. À l'inverse, une élévation soutenue de la $[Ca^{2+}]_i$ peut déclencher l'apoptose de la cellule [90]. L'augmentation du calcium libre cytoplasmique peut être due à une libération de calcium des réserves calciques intracellulaires ou à un influx de calcium du milieu extracellulaire vers le cytosol via l'activation de canaux et transporteurs calciques membranaires.

Les réserves calciques intracellulaires regroupent principalement le réticulum endoplasmique (aussi appelé réticulum sarcoplasmique dans le muscle lisse et strié), les mitochondries, et les lysosomes (Figure 13). Le réticulum endo-sarcoplasmique joue notamment **un rôle de tampon** (recapture du calcium du cytoplasme vers le réticulum) via l'activation des pompes SERCA (sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase - comprenant trois isoformes : SERCA 1-3). Mais **le réticulum permet également la libération de calcium dans le cytoplasme** via les récepteurs à la ryanodine (RyR), comprenant trois isoformes (RyR 1-3), et les récepteurs à l' IP_3 , existant également sous trois isoformes (RIP₃ 1-3). Toutes ces structures sont exprimées dans les PASMOC [91, 92] (Figure 13).

Au niveau de la membrane plasmique, plusieurs structures protéiques participent à la signalisation calcique. Tout d'abord, **la calcium ATPase** de la membrane plasmique (PMCA) permet l'extrusion du calcium du cytosol en échange de proton via la consommation d'une molécule d'ATP (avec une stœchiométrie de deux ions H^+ pour chaque ion Ca^{2+}) (Figure 13). La PMCA joue également un rôle important dans la régulation du pH intracellulaire [93, 94]. Puis **l'échangeur sodium/calcium** permet l'extrusion d'un ion Ca^{2+} contre trois ions Na^+ [95]. La Na^+ rentre dans le cytosol selon son gradient électrochimique, l'activité de l'échangeur Na^+/Ca^{2+} est donc réversible puisqu'elle dépend uniquement du gradient électrochimique de ces deux ions. Enfin, les canaux calciques regroupés en deux grands groupes : les canaux activés par le potentiel de membrane (**canaux calciques voltage-dépendants ou CCVD**, détaillés dans la section "13 les canaux ioniques dans l'hypertension pulmonaire") et les **canaux indépendants du voltage** (Figure 13). Ces derniers sont regroupés selon leurs modes d'activation et sont généralement non sélectifs du calcium.

Les canaux SOC (store-operated channel) sont activés par la libération du Ca^{2+} contenu dans le reticulum [96]. Putney a défini l'entrée du calcium par ces canaux sous le terme "d'entrée capacitive de calcium" (CCE en anglais) aussi appelé **store-operated calcium entry (SOCE)** [97]. Il est largement admis que STIM1 est le senseur calcique du réticulum qui transmet le signal à la membrane plasmique où Orai1 déclenche le mécanisme de SOCE [98-102].

Les récepteurs canaux (ROC ou receptor operated channel) sont activés par la fixation d'un agoniste (hormone, neurotransmetteur, second messenger) sur le récepteur du canal indépendamment de toute variation du potentiel de la membrane plasmique. Dans la plupart des canaux, cette activation déclenche une voie de signalisation impliquant des protéines.

Les canaux SAC (stretch-activated channel) sont quant à eux activés par l'étirement de la membrane plasmique (stretch). La section "14" décrit plus en détail ce type de canal.

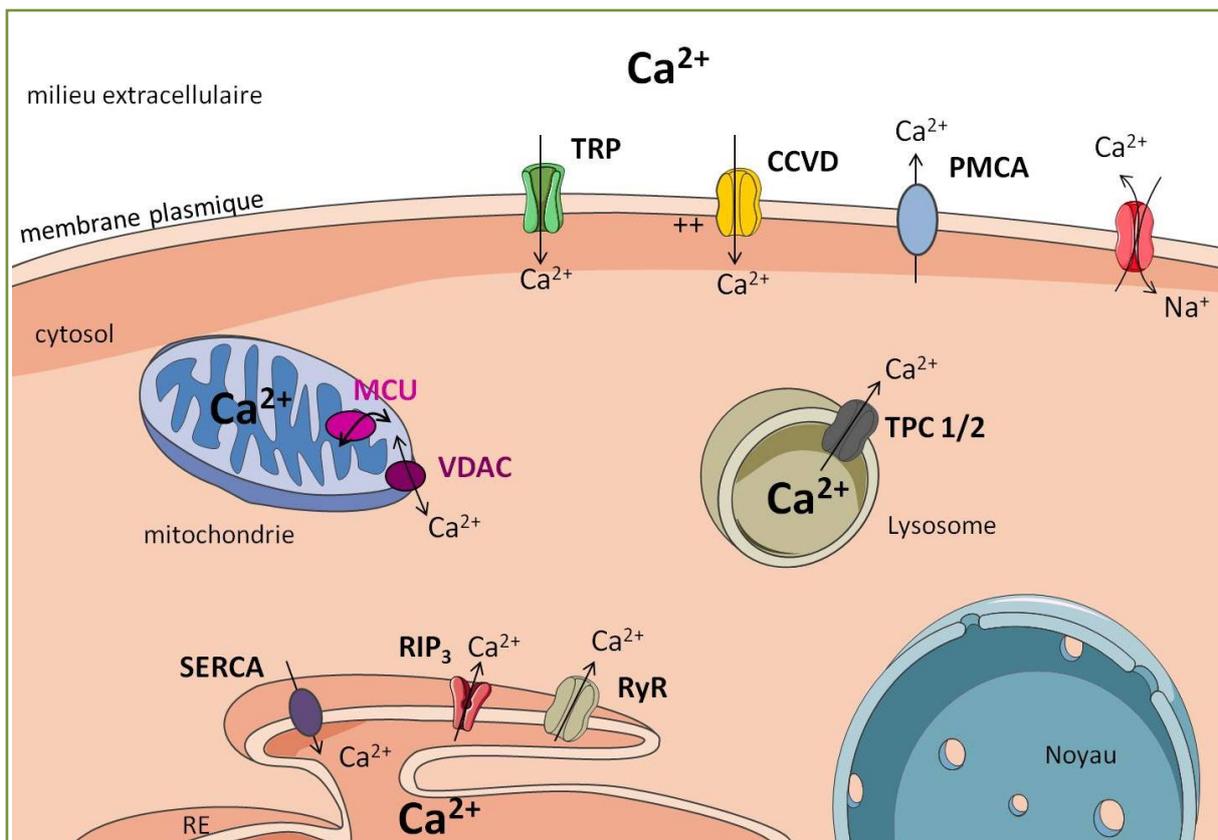


Figure 13 : Les réserves calciques intracellulaires.

Pour maintenir l'homéostasie calcique le Ca^{2+} est rapidement tamponné par les organites intracellulaires (réticulum endo/sarcoplasmique, les mitochondries, les lysosomes et l'enveloppe nucléaire). Des canaux, pompes et échangeurs exprimés sur ces organites permettent de réguler finement la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, afin d'assurer une propagation contrôlée des signaux calciques. TRP : transient receptor potential channel ; CCVD : canaux calciques voltage-dépendants ; PMCA : plasmic membrane calcium ATPase ; TPC : two pores channel ; SERCA : sarco/endoplasmique reticulum calcium ATPase ; RyR : récepteur à la ryanodine ; RIP_3 : récepteur à l' IP_3 . MCU : mitochondrial calcium uniport ; VDAC : voltage dependant anion channel.

Il existe également un couplage direct entre les RyR, RIP₃ et les canaux calciques de la membrane plasmique. En effet, une étude du laboratoire [103] montre un lien entre les canaux TRPV4 et les RyR pour augmenter la [Ca²⁺]_i et la contraction des CMLAP (Figure 14). De plus, les RIP₃ et les RyR peuvent s'activer mutuellement puisqu'ils sont tous les deux sensibles au Ca²⁺. Le Ca²⁺ libéré via les RIP₃ produit une augmentation de la [Ca²⁺]_i qui, secondairement, active les RyR situés à proximité et déclenche ainsi une sortie massive de Ca²⁺ du réticulum. Ce mécanisme de libération de calcium induite par le calcium, appelé **CICR (calcium-induced calcium release)**, provoque une élévation rapide la [Ca²⁺]_i et la contraction de la CMLAP [104] (Figure 14).

8.2. Modification de la signalisation calcique dans l'hypertension pulmonaire

Dans l'HTP, **l'homéostasie calcique est perturbée** et les CMLAP ne sont plus capables de fournir une réponse adaptée à un stimulus donné. Ainsi une hausse de la [Ca²⁺]_i basale a été observée dans des cellules issues d'animaux hypoxiques chroniques [105] ou traités à la monocrotaline [106], ainsi que dans des cellules issues de patients souffrant d'hypertension artérielle pulmonaire (groupe 1) [88, 107].

L'expression de nombreux canaux et protéines impliquées dans l'homéostasie calcique est modifiée au cours de l'HTP. **Des études montrent une diminution de l'expression de la pompe SERCA2a** dans les CMLAP de patients HTAP et de rats "monocrotaline". La recapture du calcium dans le réticulum est réduite et ce mécanisme participe au maintien d'une [Ca²⁺]_i basale plus élevée [108]. Des études suggèrent également que **l'hypoxie augmente l'activité de la phospholipase C-γ (PLC-γ)**, augmentant la production d'IP₃ et donc l'activation de RIP₃ et la libération de calcium [109].

Le mécanisme de SOCE est augmenté dans les CMLAP soumises à une hypoxie chronique [110-112]. On retrouve également une augmentation de l'expression d'Orai1, STIM1 [113] et STIM2 [107].

L'exposition à l'hypoxie induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) [9], activant d'une part les RIP₃, et d'autre part les RyR via la synthèse d'ADPR cyclique (cADPR). Une étude a par ailleurs montré que le calcium libéré de cette façon par les RyR activait les canaux chlorure TMEM16A (Figure 14). L'exposition à l'hypoxie est également associée avec une dépolarisation persistante des CMLAP [114, 115] conduisant à une élévation de la [Ca²⁺]_i par les canaux calciques voltage-dépendants de la membrane plasmique. Cette dépolarisation est notamment provoquée par la baisse d'expression et d'activité de canaux potassiques [114, 116, 117] [118] (Figure 14).

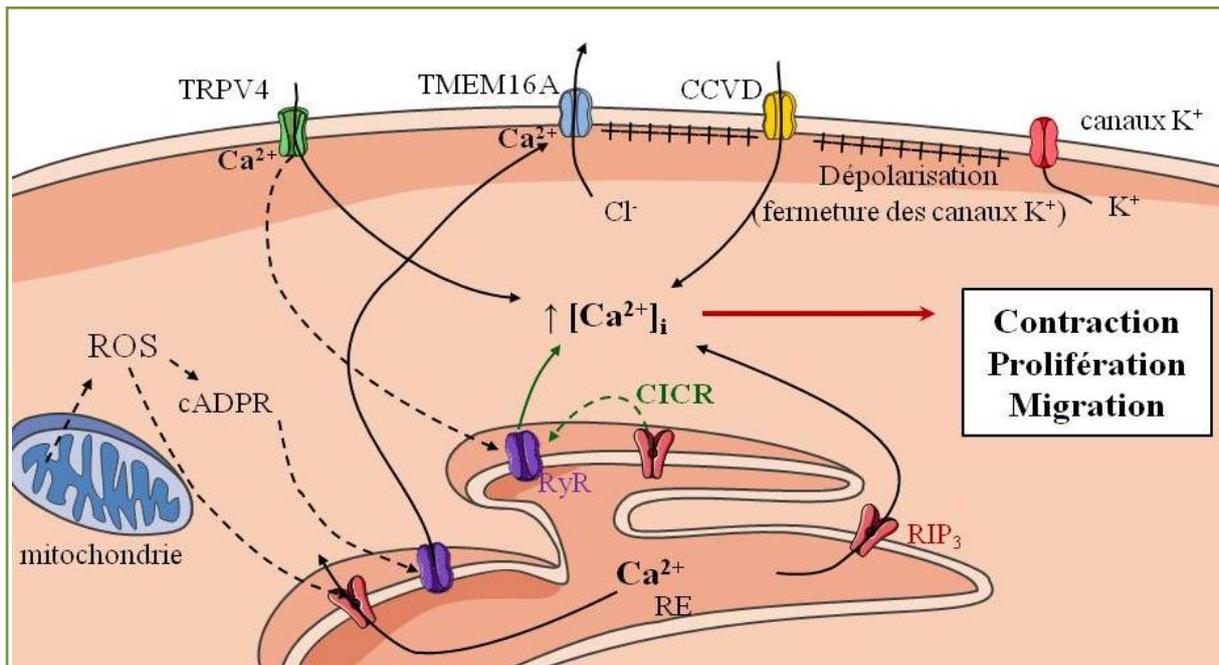


Figure 14 : Exemples de voies de signalisation calcique impliquées dans l'HTP.

Le Ca^{2+} est libéré du réticulum sarcoplasmique (SR) par les RyR et les RIP₃ et contribue à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. Les RyR interagissent avec TRPV4 et les canaux Cl^- activés par le calcium (TMEM16A). Les CCVD peuvent également être activés par l'inhibition des canaux K^+ . La libération de Ca^{2+} par les RIP₃ peut également activer les RyR par le mécanisme de CICR (Calcium Induced Calcium Release). Le cADPR active les RyR. Les ROS sont impliqués dans l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ par l'activation des RIP₃. Tous ces mécanismes concourent à l'augmentation de la contraction, de la prolifération et de la migration.

9. Intégration du stress mécanique au niveau cellulaire

Au niveau de la circulation systémique, des études ont déjà été menées sur l'implication du stress mécanique, et plus particulièrement sur l'étirement cyclique (stretch).

L'étirement cyclique exerce un effet important sur le phénotype et la croissance de nombreux types cellulaires. Sumpio et ses collègues ont trouvé une synthèse altérée des protéines du cytosquelette dans les cellules endothéliales aortiques suite à un étirement de 24 % à 0,5 Hz durant 5 jours [119]. De plus, des études ont montrées une suppression de la sécrétion de prostacyclines par les cellules endothéliales vasculaires en réponse à l'étirement [120, 121].

Des études menées sur des CML de rat par différents groupes ont montré qu'une surexposition des cellules musculaires lisses à **un étirement cyclique *in vitro* provoque un changement de leur phénotype contractile, vers un phénotype de type prolifératif**. Ce changement de phénotype s'accompagne d'une augmentation de la synthèse protéique et de la prolifération [122, 123]. De plus, l'augmentation de l'exposition du muscle lisse artériel aortique de lapin à un étirement cyclique *in vitro* induit une augmentation de la synthèse de protéines de la matrice extracellulaire (collagène, hyaluronate et chondroïtine-6-sulfate) [124]. L'étirement cyclique provoque également **la prolifération des cellules musculaires lisses** d'artères systémiques par la production et l'action autocrine du PDGF [125]. Une autre étude montre qu'un étirement des CMLAP d'agneau induit l'expression de VEGF [126].

D'autres expériences menées sur des cellules endothéliales artérielles bovines (BAEC) isolées *in vitro*, ont montré que la signalisation induite par un étirement circonférentiel (en synergie avec le shear-stress) induisait un changement de morphologie de la cellule [127].

Des études chez le rat et le cobaye ont montré qu'un stress dû à une augmentation de la tension accélérât la synthèse d'ADN et activait les canaux sensibles à l'étirement [128, 129], bien que **la nature moléculaire de ces candidats comme récepteurs mécanosensibles n'ait pas encore été établie.**

L'étude de l'impact de ces facteurs mécaniques sur les cellules vasculaires constitue donc un axe d'étude pertinent dans la mesure où les maladies cardiovasculaires telles que l'hypertension ou l'athérosclérose sont souvent associées à des modifications de l'environnement mécanique et donc des signaux qui en découlent. De plus, **la croissance et la migration cellulaire sont deux phénomènes clés lors du développement de l'hypertension pulmonaire** et peuvent être fortement influencées par les contraintes mécaniques de la même manière que les cellules de la circulation systémique [130].

Au niveau cellulaire, des structures comme les canaux sensibles à l'étirement sont probablement amenés à jouer un rôle physiologique important dans la circulation pulmonaire. Ceci est d'autant plus vrai chez les patients souffrant d'hypertension pulmonaire, du fait de l'augmentation des résistances à l'écoulement.

10. Facteurs de transcription impliqués dans l'hypertension pulmonaire

L'hypertension pulmonaire induit de nombreux changements au niveau cellulaire, dont beaucoup dépendent de changement d'expression protéique. Ces changements sont déclenchés par des facteurs de transcription. Certains comme HIF-1 sont sensibles à l'hypoxie, d'autres comme le NFAT font intervenir le Ca^{2+} .

10.1. Hypertension pulmonaire et le facteur de transcription HIF

10.1.1. Voie de signalisation

De nombreuses réponses adaptatives à l'hypoxie sont médiées par le facteur de transcription HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor 1). HIF-1 existe sous la forme d'un hétérodimère composé des sous-unités HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 β est exprimé de façon ubiquitaire, alors que HIF-1 α est peu exprimé en conditions normoxiques de par une ubiquitination et une dégradation par le protéasome. En effet, HIF-1 α est hydroxylé par l'enzyme PHD (prolyl-hydroxylase) permettant la fixation de VHL (von Hippel Lindau protein), une ubiquitinase. En condition d'hypoxie, la diminution de l'ubiquitination est corrélée avec la stabilisation de HIF-1 α et une accumulation dans le noyau. L'absence d'O₂ ne permet plus à PHD d'hydroxyler HIF-1 α , empêchant ainsi son ubiquitination par VHL. Dans le noyau HIF-1 α se dimérise avec HIF-1 β et se fixe sur l'ADN génomique au niveau de la séquence consensus 5'-RCGTG-3' qui déclenche la transcription de nombreux gènes cibles comme l'EPO ou le VEGF. HIF-1 constitue ainsi une réponse cible de l'hypoxie (Figure 15).

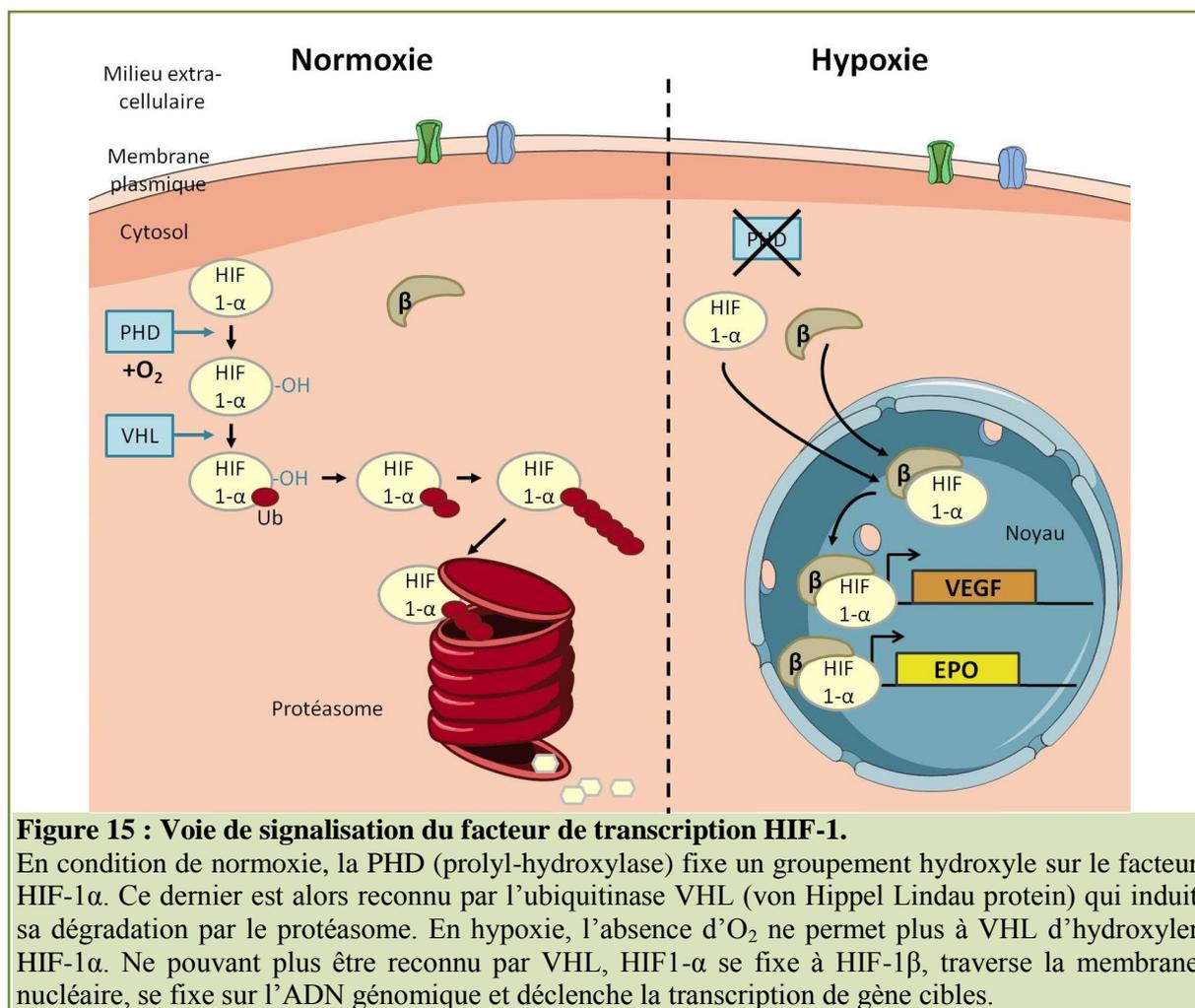


Figure 15 : Voie de signalisation du facteur de transcription HIF-1.

En condition de normoxie, la PHD (prolyl-hydroxylase) fixe un groupement hydroxyle sur le facteur HIF-1 α . Ce dernier est alors reconnu par l'ubiquitine VHL (von Hippel Lindau protein) qui induit sa dégradation par le protéasome. En hypoxie, l'absence d'O₂ ne permet plus à VHL d'hydroxyler HIF-1 α . Ne pouvant plus être reconnu par VHL, HIF-1 α se fixe à HIF-1 β , traverse la membrane nucléaire, se fixe sur l'ADN génomique et déclenche la transcription de gènes cibles.

10.1.2. HIF dans l'hypertension pulmonaire

Des études sur des souris transgéniques hétérozygotes avec un allèle *hif1 α* muté (*hif1 α ^{+/-}*) ont montré que le développement de l'hypertension pulmonaire était diminué. La polycythémie, le remodelage vasculaire, ainsi que la dépolarisation des cellules musculaires lisses sont diminués chez ces souris soumises à une hypoxie chronique [131]. Récemment, il a été montré que HIF-1 participe à l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire basale [132], via l'augmentation de l'expression de canaux de type TRPC (canaux SOC), augmentant ainsi l'entrée capacitive de calcium.

10.2. La régulation calcium-dépendante du NFAT

Le Nuclear Factor of Activated T-cell (NFAT) a tout d'abord été décrit dans les lymphocytes T. Il s'agit d'un facteur de transcription activé par le calcium. Il est actuellement admis qu'il joue un rôle important dans les cellules non-immunes, notamment les cellules du système cardiovasculaire.

10.2.1. Classification

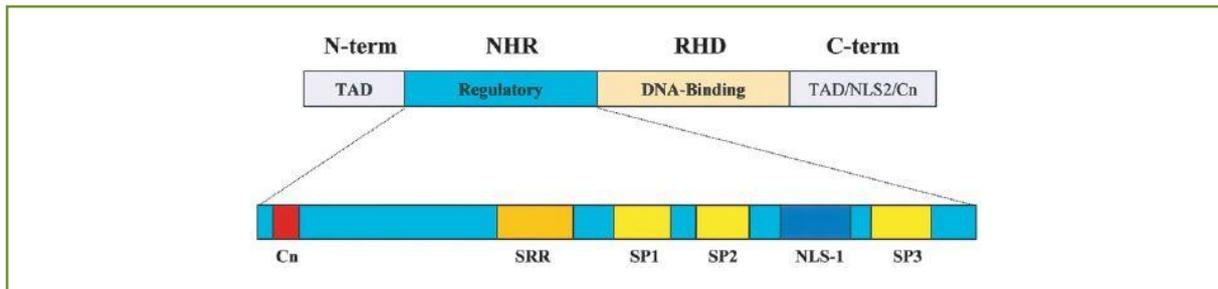


Figure 16 : Structure du NFAT.

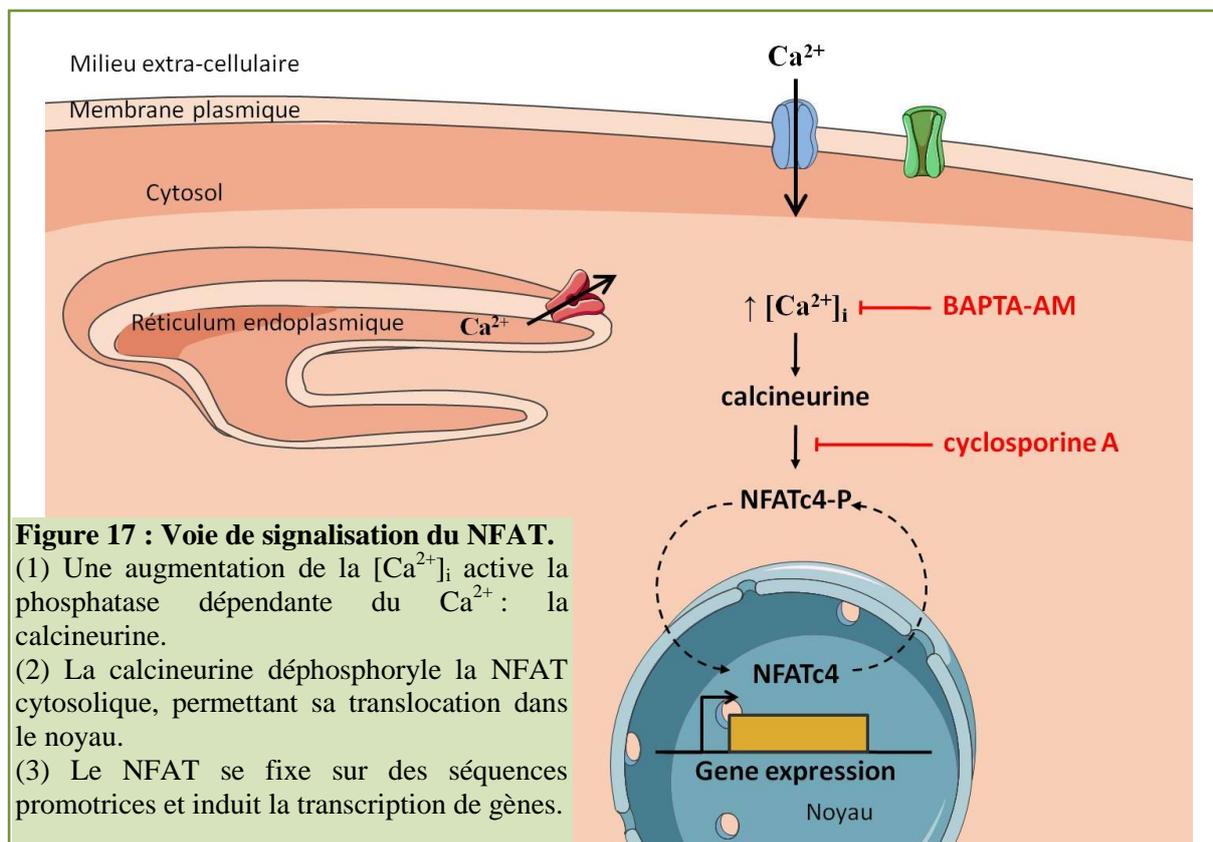
Schéma présentant les différents domaines structuraux du NFAT. (NHR) séquence d'homologie de la famille NFAT qui sert de domaine de régulation, (RHD) domaine d'homologie Rel qui permet la liaison à l'ADN, et (TAD) un domaine de transactivation en N-terminal (N-term), riche en résidus proline. (C-term), région C-terminale variable. (B) Schématisation de la région de régulation, avec un motif de liaison à la calcineurine (Cn) via un motif PXIXIT, où "X" représente n'importe quel acide aminé (SRR) région riche en résidus sérine. (SP 1-3) motifs de répétition sérine-proline. (NLS) séquence de localisation nucléaire. D'après [133].

Les facteurs de transcription NFAT forment une famille composée de quatre membres bien caractérisés : NFATc1 (NFAT2/c), NFATc2 (NFAT1/p), NFATc3 (NFAT4/x) et NFATc4 (NFAT3) [134]. Toutes les isoformes partagent une région d'homologie en N-terminal (Figure 16). Cette région contrôle les fonctions régulatrices, notamment l'interaction avec la calcineurine, nécessaire pour la translocation nucléaire. Cette région contient également des séquences de localisation et d'export nucléaire, ainsi que de nombreux sites de phosphorylation pour plusieurs sérine/thréonine kinases. Beaucoup sont d'ailleurs localisées dans une région caractérisée par trois répétitions sérine-proline (SP) (Figure 16). Le domaine C-terminal de la protéine NFAT contient un domaine de liaison à l'ADN.

Il existe un cinquième membre de cette famille de facteur de transcription : NFAT5 qui est constitutivement phosphorylé et localisé dans le noyau. Cette isoforme est insensible à l'activité de la calcineurine et est uniquement reliée aux autres membres de la famille des NFAT par son homologie de séquence [135].

10.2.2. Voie de signalisation

L'activation de NFAT est régulée principalement de par sa localisation cellulaire [136]. Dans les cellules non stimulées, NFAT est une protéine hyperphosphorylée cytoplasmique. Une augmentation du calcium cytosolique provoque une augmentation de l'activité de la phosphatase calcium-dépendante : la calcineurine [137]. L'activation de la calcineurine provoque la déphosphorylation des résidus sérine au sein du domaine de régulation du NFAT. Ceci induit un changement de conformation de NFAT qui permet l'exposition du domaine de localisation nucléaire et provoque ainsi sa translocation au sein du noyau [138-140] (Figure 17). Cependant les mécanismes moléculaires de la translocation de NFAT dans le noyau ne sont pas encore bien décrits. Il semblerait que NFAT soit transporté dans le noyau sous forme d'un complexe avec la calcineurine à travers les pores nucléaires.



10.2.3. NFAT dans la physiologie vasculaire

Les isoformes NFATc1 et NFATc2 ont été les premières observées dans le muscle lisse vasculaire, dans de l'aorte thoracique de rat, à l'aide de techniques immunohistochimiques et de Western blot sur lysat total de cellules [141]. Les isoformes NFATc3 et NFATc4 sont également toutes deux exprimées dans le muscle lisse vasculaire [142]. Il a notamment été montré qu'elles jouaient un rôle dans la vasculogénèse [143].

L'activation de NFAT est liée au maintien du phénotype musculaire lisse [143-147]. De plus, il agirait sur la régulation de l'expression des gènes de la chaîne lourde de la myosine du muscle lisse, l' α -actine du muscle lisse, l'intégrine $\alpha 1$ et la caldesmone. En effet, l'inhibition de l'expression de NFAT par stratégie ARN antisens provoque une diminution de l'expression protéique de ces protéines [144, 145].

10.2.4. NFAT dans l'hypertension pulmonaire

L'équipe de Laura Gonzalez Bosc a montré que l'isoforme NFATc3 était particulièrement impliquée dans l'hypertension pulmonaire. En effet, ils ont par ailleurs montré que l'exposition de souris à l'hypoxie chronique (caisson hypobare) provoquait la translocation nucléaire du NFATc3 dans les artères pulmonaires. De plus, cette isoforme serait responsable de la surexpression de l' α -actine du muscle lisse [148]. Ces résultats sont en accord avec l'expression accrue de l' α -actine du muscle lisse observée au cours de l'HTP [149, 150], et expliqueraient en partie l'hypertrophie des CMLAP et le remodelage vasculaire [151].

Enfin, dans la même étude, cette équipe montre que les souris knock-out pour NFATc3 ne présentent pas cette surexpression de l' α -actine du muscle lisse ni d'un épaissement de la media des artères intrapulmonaires [148]. Une étude de Bierer R. et al [152] a également montré que NFATc3 était responsable de l'hypertrophie du ventricule droit qui survient au cours du développement de l'hypertension pulmonaire. C'est pourquoi cette isoforme en particulier, serait nécessaire au développement de l'hypertension pulmonaire chez les souris adultes [153].

S. Bonnet et ses collègues [154] ont montré un rôle du NFATc2 chez les rats injectés à la monocrotaline, ainsi que chez des patients humains atteints d'hypertension pulmonaire idiopathique (groupe 1).

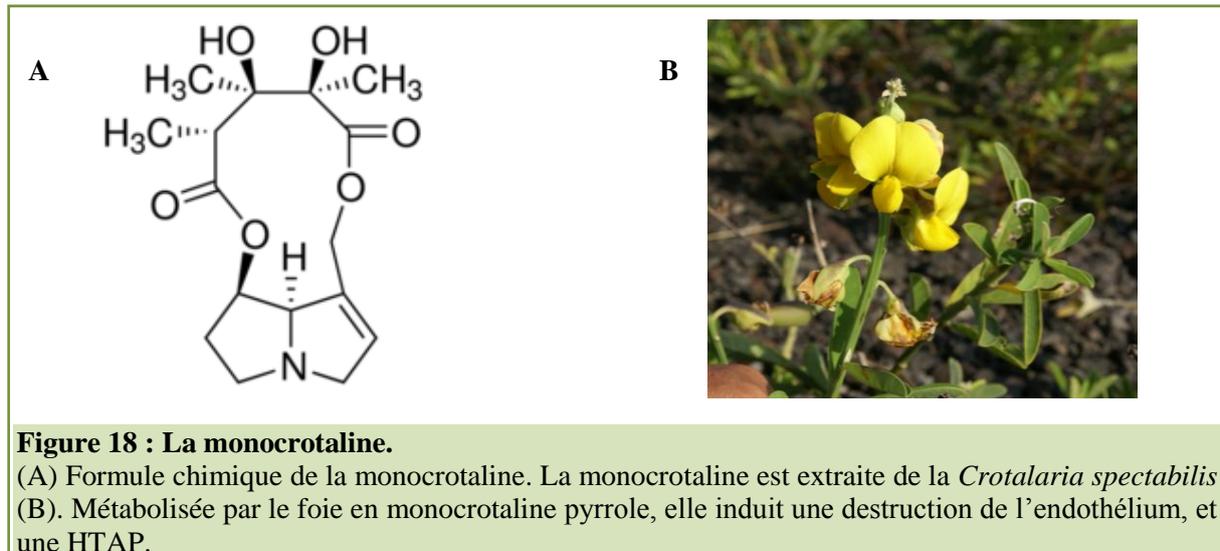
Seule l'isoforme NFATc4 semble répondre à une stimulation par un vasoconstricteur dans le muscle lisse pulmonaire (cellules isolées de rat et cellules humaines "saines"), et notamment à une stimulation au 20-HETE, un produit du métabolisme du cytochrome c [155].

L'utilisation d'inhibiteurs de la voie du NFAT, tels que le VIVIT (peptide mimétique se fixant à la calcineurine) et la cyclosporine A (inhibiteur spécifique de la calcineurine) pourrait donc constituer une nouvelle alternative thérapeutique [154].

11. Modèles animaux

11.1. Hypertension pulmonaire induite par la monocrotaline (modèle d'HTAP de groupe 1)

La monocrotaline (MCT) est un alcaloïde de la famille de la pyrrolizidine (Figure 18) issu de la *Crotalaria spectabilis*, une plante qui se trouve dans les régions tropicales et subtropicales. La toxicité de la monocrotaline est essentiellement hépatique et pulmonaire. En effet, les animaux intoxiqués à la monocrotaline présentent des lésions similaires à l'hépatite nécrotique et à celles de la cirrhose, avec des degrés variables d'œdème pulmonaire hémorragique et de fibrose.



Le modèle d'hypertension artérielle pulmonaire chez le rat consiste en une injection unique de monocrotaline par voie intrapéritonéale, à la dose de 60 mg/kg de masse corporelle. Dans le foie, la monocrotaline est métabolisée en monocrotaline pyrrole, sous l'action d'enzymes dépendantes du cytochrome P450 de la famille 3A [156]. Ce métabolite est la forme active, il est transporté via les globules rouges et entraîne une toxicité cardio-pulmonaire. Au niveau de la circulation pulmonaire, la monocrotaline pyrrole entraîne des œdèmes et une destruction progressive de l'endothélium [157].

Au bout de quatre semaines, ce modèle présente des modifications de la réactivité vasculaire pulmonaire à divers agonistes (notamment la sérotonine [158]) semblables à la pathologie humaine. De plus, on retrouve une diminution de l'expression du BMP-RII et une destruction de l'endothélium, induisant une diminution de l'expression et de l'activité de la NO synthase endothéliale (eNOS). Ce modèle, de la même façon que les HTAP humaines présente une part importante de l'immunité (surexpression de plusieurs cytokines inflammatoires : IL-1 β , IL-6, TGF- β [159]). Contrairement aux hypertensions artérielles pulmonaires (groupe 1, cf. tableau) humaines, ce modèle animal ne développe pas de lésions plexiformes [159].

Chez la souris n'est pas capable de métaboliser, ou de façon moins efficace, la monocrotaline en monocrotaline pyrrole, le modèle consiste en une injection hebdomadaire de monocrotaline à des doses beaucoup plus importantes (600 mg/kg de masse corporelle) par voie intrapéritonéale pendant 3 à 10 semaines [160-162].

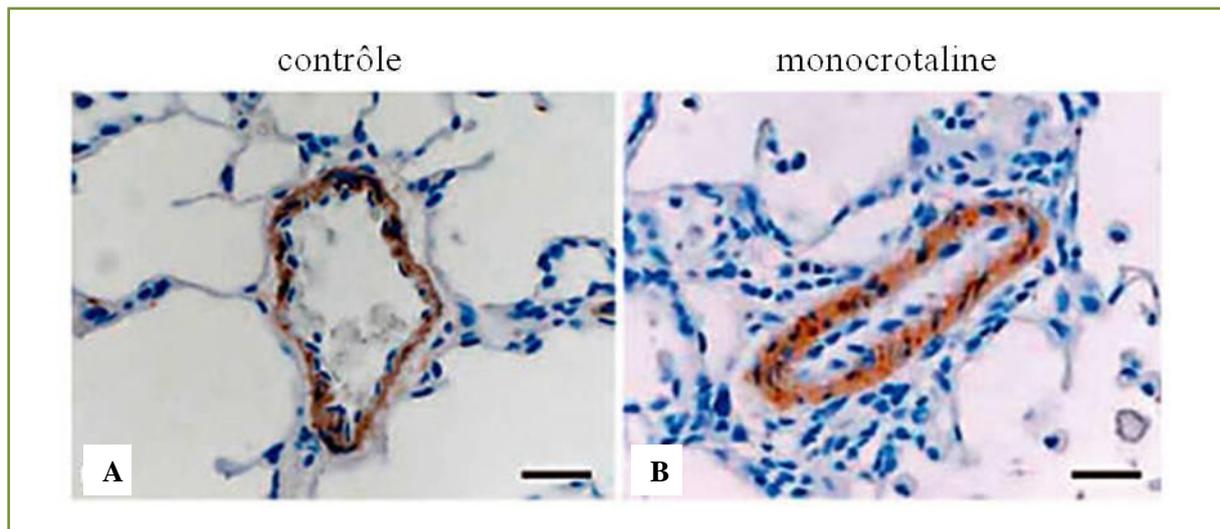


Figure 19 : Analyse histologique d'une coupe d'AIP de rat "monocrotaline". Coupes transversales d'artères intrapulmonaires de rats contrôle (A) et ayant reçu une injection de monocrotaline (B). Le muscle lisse a été marqué par le facteur HHF35 (en brun). La barre d'échelle représente 25 μm . D'après [61].

11.2. Hypertension pulmonaire induite par l'hypoxie chronique (modèle d'HTP de groupe 3)

Le modèle d'HTP induite par une hypoxie chronique est un modèle pouvant être généré aussi bien chez le rat que chez la souris. Les animaux sont placés dans un caisson hypobare pendant trois semaines. Le caisson simule un séjour en haute altitude (5 500 m) avec une pression atmosphérique de 380 mmHg (contre 760 mmHg au niveau de la mer). La PO_2 se retrouve diminuée de moitié (équivalent à 10 % O_2 dans l'air contre 21 % dans l'atmosphère au niveau de la mer).

Suite à ce séjour, la pression artérielle pulmonaire moyenne de ces animaux passe d'environ 15 mmHg pour les individus sains à 25-30 mmHg pour les animaux hypoxiques chroniques [163, 164]. Cette hypertension pulmonaire s'accompagne d'une réactivité vasculaire accrue à différents agonistes (notamment la sérotonine), mais également d'un remodelage vasculaire important (épaississement de la media, cf. Figure 20). On peut noter également l'infiltration de cellules inflammatoires dans les premiers jours d'exposition à l'hypoxie. Cependant, ce modèle ne permet pas d'observer de lésions plexiformes chez les animaux hypertendus.

Au niveau cellulaire, on peut notamment remarquer l'augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basale dans les cellules musculaires lisses, caractéristique d'une hypertension pulmonaire [165, 166], ainsi qu'une augmentation de la réponse calcique aux agonistes vasoconstricteurs tels que la 5-HT [49]. De plus, on observe une surexpression du récepteur à la sérotonine (5-HTT) [167], de la phosphodiesterase 5 (PDE-5) [168] et une sous expression des canaux potassiques voltage-dépendants [169].

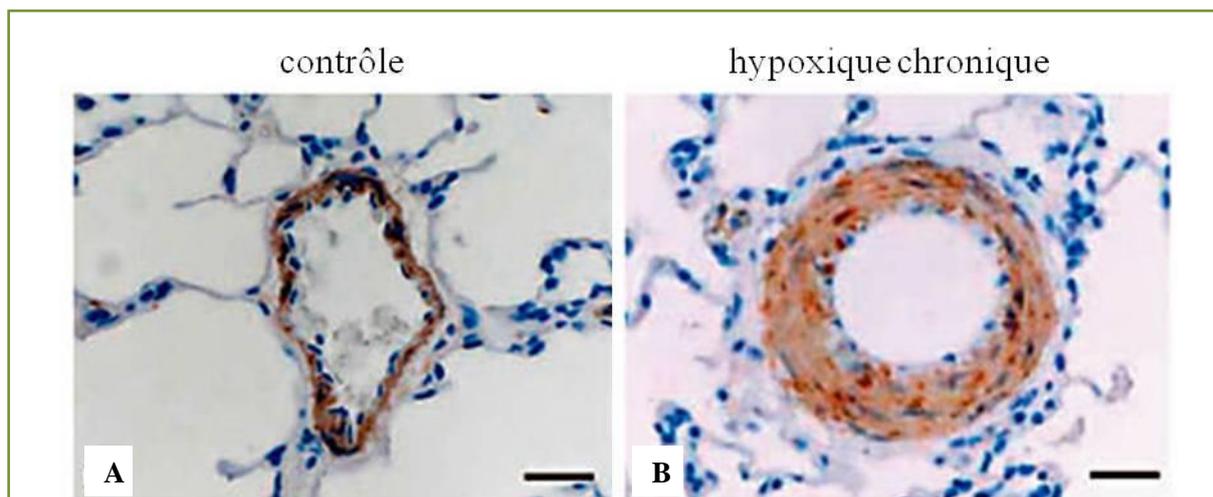


Figure 20 : Analyse histologique d'une coupe d'AIP de rat hypoxique chronique. Coupes transversales d'artères intrapulmonaires de rats normoxique (A-contrôle) et soumis à une hypoxie chronique (B). Le muscle lisse a été marqué par le facteur HHF35 (en brun). La barre d'échelle représente 25 µm. D'après [61].

11.3. Autres modèles

Les deux modèles précédents sont les plus couramment utilisés, mais ils ne permettent pas l'observation de lésions plexiformes, présentes dans certaines hypertensions pulmonaires humaines. Récemment d'autres modèles ont alors été développés.

11.3.1. Hypertension pulmonaire sévère combinant hypoxie chronique et injection de monocrotaline

Un modèle d'hypertension pulmonaire sévère combinant à la fois une hypoxie chronique et une intoxication à la monocrotaline a été développé au laboratoire [61].

Les rats ayant reçu ce double traitement présentent une pression ventriculaire droite systolique plus importante que les animaux du modèle hypoxique ou monocrotaline seul (68 mmHg contre 40 mmHg pour les rats "monocrotaline" et 50 mmHg pour les rats hypoxiques chroniques, [61]). On observe également un remodelage artériel pulmonaire, ainsi qu'un remodelage du ventricule droit bien plus important. Le remodelage est essentiellement dû à une hypertrophie de la media. Cette forme sévère d'hypertension pulmonaire s'accompagne de lésions plexiformes et de thrombi. Ce modèle présente des similitudes plus importantes avec la pathologie humaine.

11.3.2. Rat Fawn-hooded (FHR)

Les rats Fawn-hooded (FHR) sont une souche de rats sélectionnés génétiquement qui développent spontanément une hypertension pulmonaire. Ces rats présentent un déficit de stockage plaquettaire de la 5-HT et ont donc un taux de 5-HT circulant plus élevé [70], augmentant l'action vasoconstrictrice et mitogène de la 5-HT à l'origine d'une HTP.

11.3.3. Rat SUGEN

Ce modèle permet de reproduire les pathologies liées à une malformation cardiaque, grâce à l'injection du SUGEN 5416 (SU5416), un antagoniste des récepteurs au VEGF (récepteur 1 (Flt) et 2 (KDR)) [170]. L'injection sous-cutanée de SU5416 à 20 mg/kg, ainsi qu'une exposition à une hypoxie chronique permet le développement d'une hypertension pulmonaire sévère qui n'est pas réversible suite à un retour à la normoxie, à l'inverse des animaux hypoxiques chroniques seuls. Ce modèle sert notamment dans les études précliniques dans le but d'éprouver l'efficacité du traitement dans le cas d'une hypertension pulmonaire établie. Comme il s'agit d'un modèle sévère, on observe non seulement un remodelage des artères pulmonaires, mais également l'apparition de lésions proches des lésions plexiformes humaines. [171].

À la manière de la monocrotaline, la métabolisation du SUGEN 5416 par le foie via des enzymes du cytochrome (CYP1A) semble différer selon les espèces.

Les modèles murins d'hypertensions pulmonaires répondent différemment aux injections de toxines. En effet, il faut souvent de plus grandes doses (quantité par masse corporelle) ou des injections plus fréquentes pour obtenir des effets similaires à ceux observés dans les modèles de rats. Ceci peut s'expliquer par le fait que le composé (monocrotaline et SU5416 principalement) est peu ou pas métabolisé par l'organisme, ou inversement, plus rapidement métabolisé et inactivé en comparaison du rat.

11.3.4. Hypertension pulmonaire thromboembolique chronique (modèle d'HTP de groupe 4)

L'hypertension pulmonaire thromboembolique est induite par la ligature de l'artère pulmonaire gauche, suivie de séances hebdomadaires d'embolisation. Ce modèle a été mis au point chez le cochon par l'équipe d'O. Mercier et n'existe pas encore chez le rongeur [172]. En cinq semaines, le modèle reproduit les caractéristiques morphologiques, hémodynamiques et microscopiques de la pathologie.

12. Traitements de l'hypertension pulmonaire

À l'heure actuelle, il existe des traitements qui permettent d'améliorer la survie des patients en agissant sur les symptômes de la pathologie, mais environ 10 % des patients décèdent chaque année, et les mécanismes cellulaires et moléculaires des hypertensions pulmonaires sont encore mal élucidés.

12.1. Traitements médicamenteux

Les traitements proposés sont essentiellement des vasodilatateurs, des inhibiteurs des canaux calciques de type L, des inhibiteurs des phosphodiesterases de type 5, des antagonistes des récepteurs à l'endothéline, et des prostacyclines [173]. Ces traitements améliorent la qualité de vie du patient en améliorant les signes cliniques sans les supprimer.

Les inhibiteurs des canaux calciques de type L s'opposent uniquement à la contraction du muscle lisse (vasoconstriction), mais n'agissent pas sur le remodelage vasculaire pulmonaire. Plusieurs molécules sont disponibles : le diltiazem, la nifédipine, ou l'amlodipine.

Les inhibiteurs de la phosphodiesterase-5 déclenchent une relaxation du muscle lisse via l'augmentation du GMP cyclique intracellulaire. Cette augmentation permet de prévenir la prolifération des cellules musculaires lisses. Le sildénafil est l'un des plus puissants inhibiteurs de la PDE-5 [108]. Deux autres inhibiteurs des PDE-5 sont en cours d'étude : le tadalafil et le vardénafil.

L'endothéline est un vasoconstricteur qui favorise la prolifération des cellules musculaires lisses, et contribue donc à l'augmentation des résistances vasculaires. Le bosentan (Tracleer) est un inhibiteur non sélectif des récepteurs de type A et B de l'endothéline-1. Le Bosentan possède également une action antiproliférative sur les CML car il prévient la surexpression du canal TRPC6. D'autres inhibiteurs comme l'ambrisentan (Volibris) sont utilisés.

L'époprosténol (Flolan), un analogue de la prostacycline, permet de réduire de manière significative les symptômes. Cependant, la pose d'un cathéter pour son administration (prise par voie intraveineuse) en plus de sa courte demi-vie, en font un traitement contraignant à mettre en place. Il reste tout de même le traitement de référence dans le cas des hypertensions pulmonaires les plus sévères.

12.2. Chirurgie

En cas d'échec aux différents traitements, la transplantation bipulmonaire, voire du bloc cœur/poumons dans son ensemble reste la seule alternative thérapeutique à la pathologie. Le taux de survie est malheureusement faible avec 75 % de survie à 1 an et 50 % de survie à 5 ans [174].

12.3. Vers de nouvelles thérapies

De nouvelles cibles thérapeutiques sont en cours d'étude. En effet, de nombreuses études pointent du doigt des facteurs de croissance tels que le PDGF, l'EGF et le FGF. Tous sont des agonistes des récepteurs tyrosine kinase, et induisent une forte prolifération des CML participant de manière significative au remodelage des artères pulmonaires. C'est pourquoi l'Imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase a été proposé comme traitement de l'HTP et est à l'heure actuelle en cours d'évaluation [175].

13. Les canaux ioniques dans l'hypertension pulmonaire

Les CMLAP expriment une grande variété de canaux ioniques qui contrôlent le potentiel de membrane et les concentrations calciques intracellulaires, deux paramètres altérés durant l'HTP. C'est pourquoi les canaux potassiques (K^+), calciques (Ca^{2+}) et chlorures (Cl^-) ont déjà fait l'objet de nombreuses études aussi bien dans un contexte physiologique que physiopathologique. L'utilisation de traitements ciblant ces canaux pourrait avoir un effet bénéfique sur l'HTP.

13.1. Les canaux potassiques

Le potentiel membranaire de repos des CMLAP est en partie dû à une sortie d'ions positifs de la cellule tels que les ions K^+ . Or chez les rats "hypoxiques chroniques" ainsi que chez les patients HTAP, on constate une réduction de l'expression de nombreux canaux potassiques (K_v , K_{ATP} , TASK-1 et BK_{Ca}) [114, 116, 117, 132], conduisant à une dépolarisation de la CMLAP, facilitant ainsi l'entrée de Ca^{2+} par les canaux calciques voltage-dépendants et conduisant à une contraction [176]. Des études réalisées sur des CMLAP humaines ont montré que l'hypoxie inhibe un courant potassique (I_K), entraînant une dépolarisation membranaire et une entrée secondaire de calcium, menant à la contraction musculaire. Parmi les canaux potassiques activés par le calcium, la famille des BK_{Ca} (caractérisée par leur grande conductance au potassium : > 50 pS) est largement exprimée dans les CMLAP. Leur rôle est d'induire une relaxation vasculaire lorsque la $[Ca^{2+}]_i$ est élevée. Des études ont montré que dans les modèles de rats hypertendus (hypoxiques chroniques ou "monocrotaline"), le courant BK_{Ca} est réduit de façon significative à cause d'une diminution de l'expression de la sous-unité α du canal [164]. Cet effet entraîne secondairement une accumulation d'ions potassium dans la cellule qui conduit à une inhibition de l'apoptose [177].

13.2. Les canaux chlorures

Une surexpression et une suractivation des canaux TMEM16A contribuent également, via une dépolarisation de la CMLAP, à potentialiser la vasoréactivité durant l'HTP [178, 179]. De plus, une étude du laboratoire montre que l'angiotensine II déclenche via une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ un courant d'ions chlorures qui participerait à la dépolarisation de la CMLAP et à la contraction de la cellule via l'influx de calcium à travers des canaux calciques voltage-dépendants [180].

13.3. Les canaux calciques

L'hypoxie chronique dépolarise les CMLAP et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est attribuée en partie à l'activation consécutive des canaux calciques voltage-dépendants (CCVD). Des études montrent également une augmentation de l'expression de $Ca_{v3.2}$ et $Ca_{v1.2}$ [181], participant à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$. D'autres études montrent d'ailleurs une augmentation de la prolifération des CMLAP par des agents vasoconstricteurs via les canaux $Ca_{v3.1}$ [182, 183]. Comme indiqué dans la section « traitements », les CCDV sont déjà la cible de traitements curatifs. L'administration d'antagonistes des CCVD (nifédipine, diltiazem) chez des patients souffrant d'HTAP permet de réduire la PAPm et les résistances vasculaires [184, 185].

Le calcium joue un rôle central dans les mécanismes cellulaires liés à l'HTP, mais les CCDV ne suffisent pas à expliquer à eux seuls la perturbation de l'homéostasie calcique des CMLAP. De plus, les traitements proposés agissent principalement sur la vasoconstriction sans modifier le remodelage vasculaire qui, pourtant, occupe une place importante dans l'HTP. De nombreux canaux calciques non dépendants du voltage participent également à l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, notamment par le mécanisme de SOCE.

L'augmentation du stress mécanique joue probablement un rôle dans la physiopathologie de l'HTP. D'une part parce que les contraintes mécaniques sont augmentées avec l'augmentation des tensions pariétales induite par l'hypertension et par la vasoconstriction ; et d'autre part parce que les CMLAP sont, du fait de leur environnement, continuellement exposés à des contraintes mécaniques. Il est donc intéressant d'étudier l'implication des canaux sensibles à l'étirement exprimés par les CMLAP dans un contexte d'HTP.

14. Les canaux activés par l'étirement (stretch-activated channels ou SAC)

14.1. Quels critères rassembler pour définir un SAC ?

Les "stretch-activated channels" (SAC) sont des **mécanotransducteurs** puisqu'ils convertissent un signal physique (déformations de la membrane plasmique) en signal biologique permettant d'induire une réponse. Pour être considéré comme un mécanotransducteur, un canal doit remplir les critères suivants :

- La perte d'expression du canal doit conduire à une perte de la mécanosensibilité.
- L'expression hétérologue de ce canal dans un autre système doit conduire à l'acquisition d'une réponse induite par un stimulus mécanique.
- Les propriétés pharmacologiques et biophysiques du canal candidat doivent correspondre au courant endogène étudié.
- Des modulateurs de la mécanosensibilité doivent montrer des effets sur l'activité du canal.
- Le canal doit, dans l'idéal, former un complexe mécanotransducteur au sein d'une bicouche lipidique.

Les SAC peuvent être inactivés par un peptide issu du venin de tarentule *Grammostola spatulata* : la GsMTx-4. Ce peptide bloque l'ouverture du SAC sans en bloquer le pore [186]. D'autres molécules sont utilisées pour bloquer les SAC, bien que moins sélectives : le gadolinium (Gd^{3+}), la streptomycine (un antibiotique).

14.2. Mécanismes d'activation

Le mécanisme d'activation des SAC n'est pas encore bien établi. Cependant à l'heure actuelle trois modèles d'activation de ces SAC sont proposés.

L'activation du canal directement via des variations de tension au sein de la membrane plasmique (pression positive, négative, étirement, flux laminaire) (Figure 21 A). L'étirement de la bicouche lipidique de la membrane plasmique induit une diminution de l'épaisseur de cette dernière induisant un changement de l'environnement proche du canal et/ou des mésappariements hydrophobiques. Ces variations changent la conformation du canal et l'activent. Ce modèle dit de la "bicouche" ou "bilayer model" en anglais est attesté par des expériences de solubilisation et de reconstitution de liposomes dans lesquels l'activité des SAC a été maintenue.

L'activation du canal par l'intermédiaire des protéines du cytosquelette (Figure 21 B). Les mouvements des protéines de la matrice extracellulaire ou du cytosquelette sont transmis au canal directement connecté à ces dernières et provoque son ouverture. L'implication du cytosquelette a été proposée après l'application d'agents pharmacologiques capables de démanteler les filaments d'actine et de désorganiser les microtubules (cytochalasine et colchicine) [187-189]. Ces traitements sensibiliseraient le système au stress mécanique. Au contraire, les agents qui stabilisent l'actine, comme la phalloïdine par exemple, inhibent la mécanosensibilité [187].

Cependant, un canal peut être impliqué dans la transmission du stress mécanique sans être forcément le senseur direct de ce stress.

En effet, il peut y avoir **une activation indirecte où le canal est activé par l'intermédiaire d'une autre protéine**, elle-même sensible aux propriétés physiques de la membrane plasmique (Figure 21 C). Des acteurs transmembranaires comme les intégrines, pourraient jouer le rôle de mécanosenseurs et guider l'activation du canal [190] via l'activation de kinases ou via un second messenger.

L'étirement membranaire pourrait également induire **une modification de la membrane en libérant des phospholipides** et phospholipases tels que la PLA2 (phospholipase A2) et PLC (phospholipase C). Leur "clivage" générerait un second messenger comme l'acide arachidonique et le DAG (diacylglycérol).

De nombreux canaux sont impliqués dans l'intégration du stress mécanique et possèdent des caractéristiques permettant de les considérer comme des SAC. On retrouve notamment les canaux de la famille TRP (transient receptor potential).

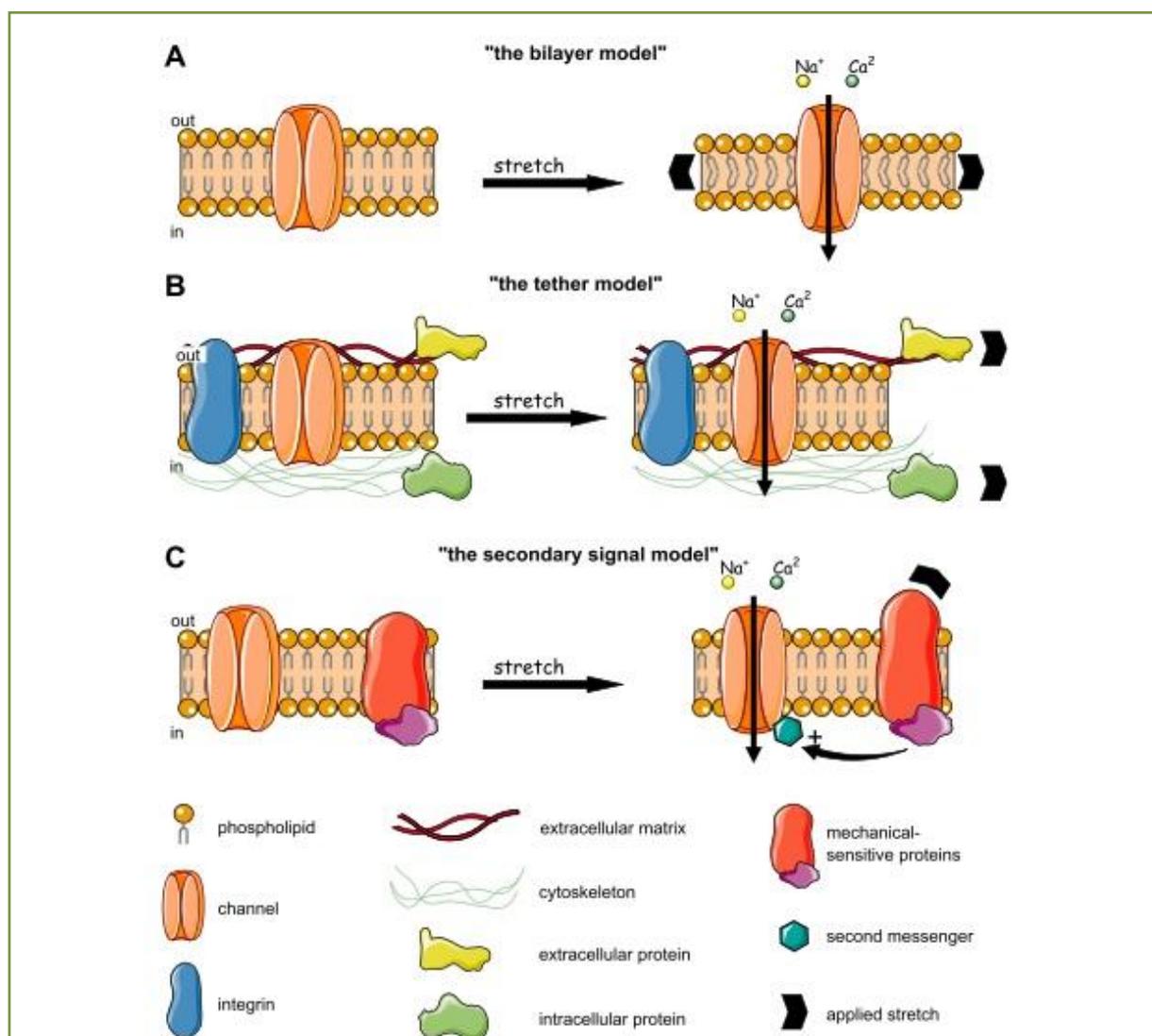


Figure 21 : Méthodes d'activation des SAC.

(A) La canal est activé directement par les déformations de la membrane plasmique. (B) Le canal interagit avec le cytosquelette, lui même en interaction avec le senseur du stress mécanique en interaction avec la matrice extracellulaire (ex. intégrines). (C) Le senseur du stress mécanique génère un second messenger qui va activer le canal. D'après [191].

14.3. Nature moléculaire des SAC

La nature moléculaire des canaux sensibles à l'étirement n'est pas encore clairement établie. Récemment, deux nouveaux canaux directement sensibles à l'étirement ont été découverts : les canaux Piezo1 et Piezo2 [192]. Ce sont des canaux cationiques non sélectifs possédant un nombre important de domaines transmembranaires (30 à 40 selon les prédictions). L'expression hétérologue de ces protéines est suffisante pour induire un courant sensible à l'étirement dans des cellules n'en présentant pas à la base. Piezo1 et 2 sont exprimés dans de nombreux organismes et tissus, dont le poumon [192-194].

Chez les mammifères de nombreuses études proposent plusieurs membres de la famille des canaux de type TRP comme étant des candidats potentiellement mécanosensibles en répondant aux forces de tension, de flux et de variations du volume cellulaire [195].

15. Les canaux de type TRP

Le premier canal TRP a été découvert chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) par Cosens et Manning [196] lors de l'étude du processus de phototransduction. Les canaux de type TRP sont essentiels dans de nombreux processus impliquant une mécanotransduction : dans les cellules ciliées de la cochlée et les neurones sensoriels impliqués dans le toucher par exemple [197].

15.1. Classification

Les canaux TRP forment **une super famille de protéines codées par 32 gènes**. Sur la base des homologies de séquences, les canaux de type TRP ont été classés en **sept sous familles** (Figure 22) : les TRPC (canonique ou classique), les TRPV (vanilloïde), les TRPM (mélastatine), TRPP (polycystine), TRPML (mucoïpine), TRPA (ankyrine) et TRPN (ou NOMPC pour no mechanoreceptor potential C) (Figure 22) [198, 199].

Les sous-familles TRPC et TRPV sont constituées de sept et six membres respectivement (TRPC1-TRPC7 et TRPV1-TRPV6). Les TRPM possèdent huit membres (TRPM1-TRPM8). Les TRPP et TRPML comprennent cinq membres non canaux et trois membres "channel-like" respectivement. Bien que chacune de ces familles n'ait pas été entièrement caractérisée, l'intérêt que l'on porte à ces canaux est croissant, notamment de par leur implication dans de nombreuses pathologies humaines. La sous-famille la plus récemment ajoutée, TRPA possède seulement un membre (TRPA1), et le TRPN ou NOMPC a seulement été identifié chez le ver *Caenorhabditis elegans*, la drosophile (*Drosophila melanogaster*) et le poisson zèbre (*Danio rerio*).

Le terme de transient receptor potential vient du fait que la drosophile mutante pour *trp*, présente une réponse (dépolérisation) **transitoire** à la lumière, contrairement aux souches sauvages qui elles ont une activité soutenue des cellules photoréceptrices en réponse à la lumière.

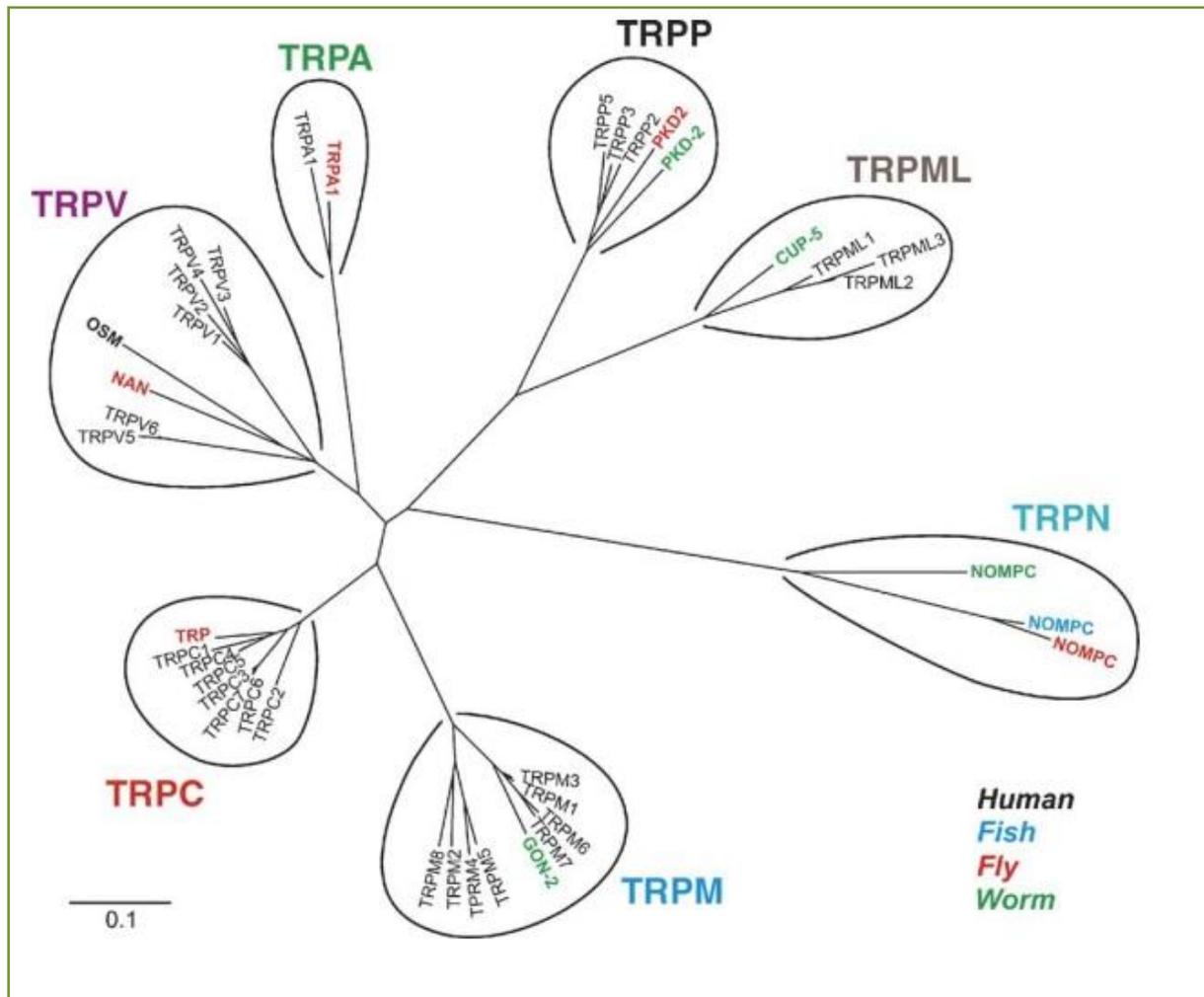


Figure 22 : Arbre phylogénétique de la superfamille des canaux TRP

La super famille des TRP comprend 7 sous-famille : les TRPC (canonique), TRPV (vanilloïde), TRPM (mélastatine), TRPP (polycystine), TRPM (mucopolipine), TRPA (ankyrine) et TRPN (ou NOMPC pour no mechanoreceptor potential C). D'après [200].

15.2. Structure

Bien que la structure tridimensionnelle des TRP n'ait pas été clairement établie, la topologie membranaire a été prédite comme ayant **six domaines transmembranaires**, flanqués par de **longs domaines N- et C-terminaux cytosoliques**. Tous les TRP partagent plusieurs **domaines de répétitions de type ankyrine en N terminal** (noté ANK ou ARD pour Ankyrin Repeat Domain), ainsi qu'**un motif consensus TRP en C terminal**, proche du sixième domaine transmembranaire. On retrouve de nombreux autres motifs de liaisons protéines-protéines dans ces parties N- et C-terminales (Figure 23). Le pore du canal est formé par une boucle hydrophobe entre les domaines transmembranaires cinq et six.

Des études de microscopie électronique et de force atomique ont confirmé la capacité des TRP à former **des tétramères organisés de manière symétrique autour du pore central** perméable aux ions Na^+ , K^+ et Ca^{2+} dans des conditions physiologiques [201, 202]. Des études ont montré la capacité des TRP à former des **homo ou hétéro-tétramères** [203] (Figure 24).

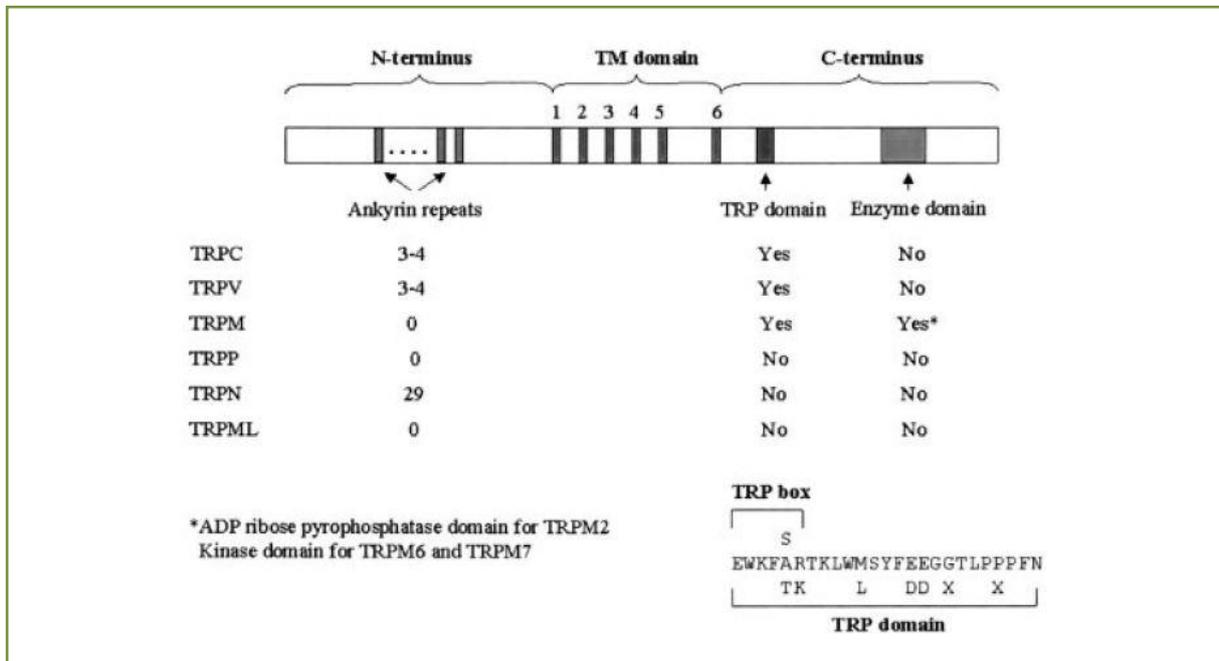


Figure 23 : Motifs structuraux des TRP.
Le domaine TRP est une région de 25 acides aminés hautement conservée. La région définie comme "TRP box" (au sein du domaine TRP) ne varie presque pas. "X" représente n'importe quel acide aminé. D'après [204].

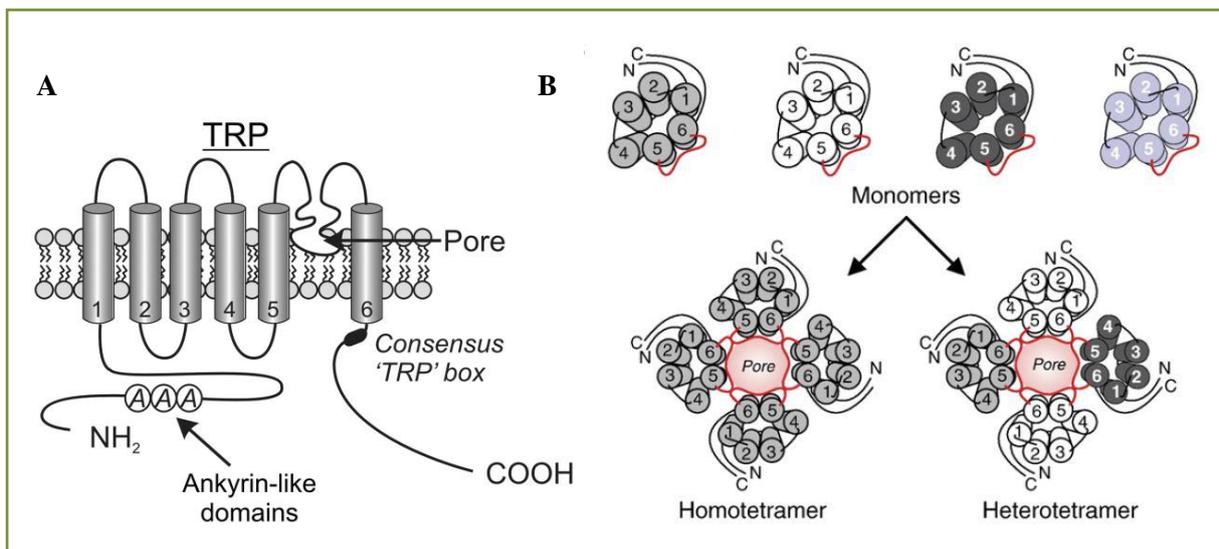


Figure 24 : Les différents modes d'assemblage des TRP.
(A) Structure d'un canal TRP avec les 6 domaines transmembranaires et la région du pore entre les domaines 5 et 6. (B) Assemblage tétramérique d'un canal TRP composé en hétéro ou homo tétramère autour d'un pore central. D'après [205].

15.3. Modes d'activation

Tous les TRP sont des **canaux cationiques**. Cependant, leur sélectivité pour les cations divalents (calcium et magnésium) par rapport au sodium (cation monovalent), peut varier d'un rapport supérieur à 100 pour 1, à un rapport inférieur à 0,05 pour 1 [204].

Ces canaux sont polymodaux, c'est-à-dire qu'ils peuvent être activés par différents modes d'activation. Beaucoup de TRP sont activés par la fixation d'un ligand, en particulier par des substances âcres ou refroidissantes (ex : la capsaïcine contenue dans le piment, le menthol ou l'huile de moutarde). D'autres sont régulés par des stimuli physiques (chaleur, stress mécanique, hyposmolarité) ou par la déplétion des stocks calciques (mécanisme de Store-Operated Calcium Entry–SOCE). On retrouve également des sensibilités à l'acidité (aux protons H⁺), à l'ischémie/stress oxydant ou à certains lipides.

15.4. Activité mécanosensible

L'ouverture de nombreux TRP est déclenchée par **l'application d'une force mécanique** [206], mais leur rôle en tant que canaux activés par l'étirement (SAC) *per se* reste encore controversé en raison des nombreux stimuli qui les activent (étirement, flux, choc osmotique).

À ce jour, **treize membres des TRP ont été décrit comme étant mécanosensibles** [207], notamment par des mutations perte de fonction chez de nombreux organismes aussi bien invertébrés que chez la souris et l'humain [208]. Parmi ceux-ci on retrouve : TRPC1, C3, C5, C6, V1, V2, V4, M3, M4, M7, A1, P1 et P2.

Leur activation directe par l'étirement membranaire reste controversée dans la littérature, car les preuves de cette activité sont manquantes, notamment via des expériences de canal purifié et isolé au sein d'une bicouche lipidique. Ces expériences peinent à être obtenues, parce que beaucoup de ces canaux requièrent l'intégrité du cytosquelette sous-jacent pour fonctionner. Par exemple, il a été montré que l'activité induite par l'étirement des neurones sensoriels était dépendante du cytosquelette d'actine [209].

L'isoforme TRPV2 semble être **directement activée par l'étirement de la membrane plasmique**, comme cela a été montré par l'expression hétérologue de ce canal dans des cellules CHO, à l'origine d'une réponse calcique après étirement des cellules sur des membranes de silicone, ou à travers la pipette de patch-clamp [210]. Tout comme TRPC1, où son expression dans des liposomes reconstitués sans cytosquelette montre **une activation directe par l'étirement** [211].

TRPV4 et TRPM7 sont sensibles à **une hyposmolarité** [212-214]. La pression osmotique affectant le volume cellulaire, les forces de tension pourraient être transférées à travers la bicouche lipidique jusqu'aux domaines transmembranaires du canal régulant son activité [206]. Une étude récente montre que l'expression hétérologue de TRPC5 dans des cellules CHO-K1 induit une sensibilité aux chocs hyposmotiques et à l'étirement membranaire déclenché par une dépression dans la pipette de patch-clamp. La présence du cytosquelette d'actine est toute fois importante dans cette réponse [215].

Les isoformes TRPC3, C6 et TRPM4 sont impliquées dans **le tonus myogénique des artérioles systémiques**. Cette mécanosensibilité serait due à une activation indirecte via un second messager libéré par un récepteur couplé à une protéine G [216].

Des canaux sensibles aux variations mécaniques (sensibles au blocage par le gadolinium) ont été identifiés aussi bien dans les cellules endothéliales que dans les cellules musculaires lisses vasculaires [217, 218]. Les propriétés de ces canaux ressemblent à celles des canaux de type TRP avec une sélectivité ionique et une conductance similaire.

Il a été montré que des canaux TRP étaient impliqués dans **la détection du shear-stress au sein des cellules endothéliales** du système vasculaire systémique. [212]. TRPV4, M7 et TRPP2 sont activés par le flux laminaire [219] et de plus, l'association hétéromérique de plusieurs isoformes, comme TRPV4, TRPC1 et TRPP2, peut aboutir à un canal sensible au flux [220]. Cependant, il reste à déterminer si cette activation par le flux est directe ou indirecte.

16. Interaction entre les canaux TRP et le cytosquelette

Puisque certains canaux TRP sont impliqués dans la transmission du stress mécanique, mais que leur activation directe par la déformation de la membrane n'est pas clairement établie, il convient donc d'étudier les relations entre ces canaux et le cytosquelette, interactions pouvant intervenir dans les mécanismes mécanosenseurs (détaillés dans la section des canaux SAC). Ces associations affectent l'organisation du cytosquelette, l'adhésion cellulaire ou l'activité canalaire des TRP.

16.1. Association des TRP avec le cytosquelette

L'association entre les TRP et le cytosquelette peut se faire **soit de manière directe, soit indirectement par l'intermédiaire d'autres protéines.**

Des travaux ont montré que **TRPV4 colocalisait et co-immunoprécipitait avec l'actine et la tubuline** [221-223]. Des études plus récentes ont démontré que ces interactions nécessitaient des modifications post-traductionnelles. En effet, la sérine 824 du canal TRPV4 est essentielle à l'interaction avec l'actine [224].

Des expériences de cross-linking, de co-immunoprécipitation, de pull-down ont montré **l'interaction directe de TRPV1 avec les microtubules** [225], qui s'effectuerait via une séquence conservée au cours de l'évolution [226]. Sur la base des homologies de séquences, une telle interaction peut être prédite entre la tubuline et les isoformes TRPV2 et TRPV3 [227]. Ces interactions avec le cytosquelette peuvent également se faire par l'intermédiaire **de protéines dites d'échafaudage.**

De nombreux travaux font part d'une interaction entre TRPC4 et TRPC5 avec la phospholipase C via NHERF (Na^+/H^+ exchanger regulatory factor), une protéine liant les protéines membranaires avec le cytosquelette d'actine [228] (Figure 25). TRPP2 et TRPP3 interagissent avec l' α -actinine [229, 230], alors que TRPC1 lie l' $\alpha 1$ -syntrophine du cytosquelette basée sur la dystrophine [231]. TRPC4 localise aux sites d'adhésion cellule-cellule dans les cellules endothéliales pulmonaires, où il est associé avec la protéine 4.1, qui lie TRPC4 au cytosquelette sous-jacent [232] (Figure 25). De plus, ce lien avec le cytosquelette est nécessaire à l'activation de TRPC4 [232].

16.2. Régulation du cytosquelette par les TRP

La réorganisation du cytosquelette, et en particulier le squelette d'actomyosine, est un élément important de certaines fonctions cellulaires comme la migration ou la division cellulaire (cf. partie "migration"), fonctions qui interviennent dans le développement de l'hypertension pulmonaire via le remodelage de la média. Comme la migration requiert des

changements constants d'adhésions et de morphologie de la cellule qui font intervenir le cytosquelette et le calcium [233, 234], il est pertinent d'étudier la régulation du cytosquelette par les canaux de type TRP.

Les premières données suggérant une telle interaction ont montré que l'influx ionique attribué à TRPC1 était nécessaire au remodelage du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales d'artères pulmonaires [235]. L'influx calcique de TRPC1 serait nécessaire au **remodelage du cytosquelette** d'actine qui supporte les changements de morphologies cellulaires [235].

Dans les cellules F11 (dérivées des neurones sensoriels des ganglions spinaux), TRPV1 régule la dynamique des microtubules par deux effets opposés. En effet, l'expression de TRPV1 à la membrane stabilise les microtubules. Cependant, son activation par un agoniste (la résinaférate toxine - RTX) provoque le désassemblage des microtubules polymérisés. Cette action de déstabilisation du cytosquelette affecte la migration et la neuritogenèse qui dépendent grandement du cytosquelette. Le désassemblage rapide des microtubules par l'activation de TRPV1 a un fort impact sur la croissance axonale, la morphologie de la cellule et la migration [236, 237]. Une autre étude montre, à la fois dans les cellules endothéliales humaines et de rat, que l'activation de TRPC1 conduit à la réorganisation du réseau d'actine cortical et à la forme de la cellule [235].

Une étude du laboratoire a montré que l'activation de l'une des isoformes TRPV1 ou TRPV4 par leur agoniste spécifique (capsaïcine et 4 α -PDD respectivement) provoquait une augmentation de la densité du cytosquelette d'actine et de tubuline [87].

16.3. Régulation de l'activité des TRP par le cytosquelette

De par l'implication de certains TRP dans des mécanismes de mécanotransduction, la présence du cytosquelette est nécessaire à l'activation de ces derniers pour la transmission du signal mécanique. Plusieurs travaux montrent que la perturbation de la dynamique du réseau d'actine ou des microtubules (disruption ou stabilisation) influence l'activité de plusieurs TRP. Ainsi, la disruption des filaments d'actine par la cytochalasine D abolit la réponse de TRPC5 à l'hyposmolarité [215] prouvant la nécessité du cytosquelette dans cette réponse.

L'activité canalaire passe également par le bon adressage de ces canaux à la membrane. Cet adressage à la membrane se fait via le cytosquelette et les protéines qui lui sont associées. Des travaux montrent que la perturbation de la dynamique du cytosquelette affecte la localisation subcellulaire de certains TRP. La réorganisation du cytosquelette d'actine provoque l'internalisation de TRPC3 dans des cellules HEK-293 [238]. De même, l'application sur des neutrophiles de calyculine, un agent qui réorganise le cytosquelette d'actine, déclenche l'internalisation de TRPC1, TRPC3 et TRPC4 et atténue l'entrée capacitive de calcium qui y est associée [239]. L'application de cytochalasine D permet de prévenir ces effets et ainsi de maintenir l'expression membranaire de ces TRP. De la même manière, sa stabilisation à l'aide d'agents tels que la colchicine et la phalloïdine, est capable de perturber la localisation des canaux TRPC1 [240, 241].

L'activité des TRP dépend également de leur présence au sein de microdomaines membranaires comme c'est le cas des cavéoles. Les cavéoles sont des petites invaginations de la membrane plasmique maintenues par la présence de protéines appelées cavéolines, comprenant trois isoformes (Cav-1, Cav-2, Cav-3). TRPC1 peut s'associer aux cavéoles, et TRPV4 colocalise avec la Cav-1 dans le muscle lisse des artères pulmonaires [242].

L'implication du cytosquelette d'actine et des protéines d'échafaudage (Homer) dans la régulation de l'activité des TRP a majoritairement été décrite pour les membres de la famille des TRPC, notamment TRPC1 dans de nombreux types cellulaires (Figure 25).

À l'heure actuelle, peu de travaux concernent la circulation pulmonaire, mais les données récentes du laboratoire concordent avec les données obtenues par d'autres équipes dans d'autres systèmes cellulaires. Ceci suggère un rôle primordial de l'interaction entre TRP et cytosquelette dans la physiologie et la physiopathologie de la cellule musculaire vasculaire, et notamment dans la circulation pulmonaire.

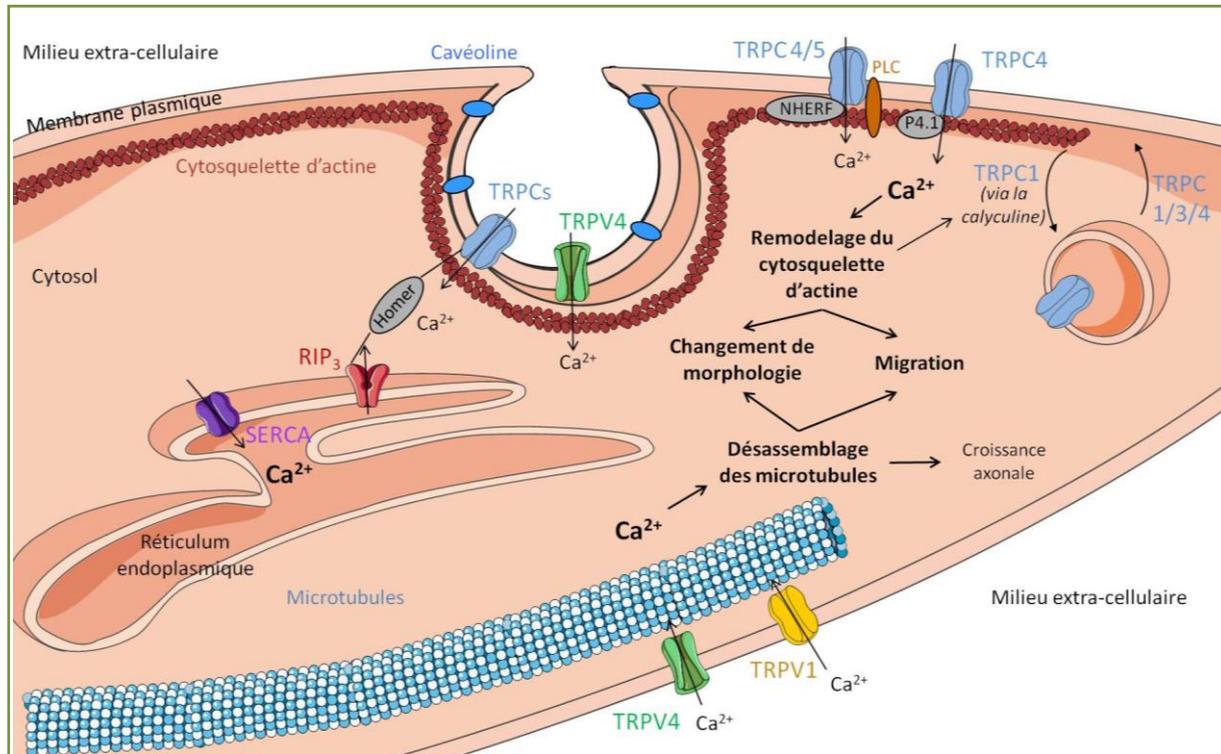


Figure 25 : Interactions entre le cytosquelette et les canaux TRP.

Le cytosquelette d'actine et les microtubules régulent l'expression de surface, la localisation et les interactions des canaux TRP avec d'autres protéines de signalisation. Ces interactions permettent l'activation et la régulation de l'influx calcique activé par la fixation d'un ligand sur son récepteur et/ou par la déplétion des stocks calciques (SOCE). À l'inverse, l'entrée de calcium à travers les canaux TRP induit un remodelage du cytosquelette, phénomène requis pour de nombreux processus cellulaires. ERM : ezrin/radixin/moesin ; Gq : heteromeric G-protein ; RIP3 : récepteur à l'IP3 ; P4.1 : protein 4.1 ; PLC : phospholipase C ; SERCA : sarco/endoplasmique reticulum calcium ATPase ; SOCE : store-operated calcium entry ; STIM1 : stromal interaction molecule-1 ; TRP : transient receptor potential channel.

17. Les canaux TRP dans l'hypertension pulmonaire

La fonction des canaux TRP dans la circulation pulmonaire fait l'objet de nombreuses études. La pertinence de certaines études repose sur le fait que certains TRP exprimés dans les CMLAP présentent une activité fonctionnelle, et notamment dans les processus cellulaires intervenant dans le développement de l'hypertension pulmonaire (migration, prolifération). Du fait de leur caractère polymodal, l'altération de leur fonction pourrait se faire via un stress hypoxique ou mécanique.

17.1. Expression/surexpression dans le muscle lisse vasculaire pulmonaire

Les canaux TRP sont exprimés dans de nombreux tissus, on les retrouve notamment dans le muscle lisse vasculaire pulmonaire.

Plusieurs équipes ont d'abord identifié TRPC1, TRPC4 et TRPC6 dans les cellules musculaires lisses d'artère pulmonaires saines [88, 132, 243, 244]. Cependant, d'autres ne retrouvent pas l'expression de TRPC4 mais ont à la place révélé l'expression de l'isoforme TRPC3 [245]. En conditions pathologiques, ces canaux sont aussi surexprimés. Les travaux menés par le groupe de James S.K. Sham montrent que les isoformes **TRPC1 et TRPC6 sont surexprimées**, aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique, dans les artères pulmonaires de rats et de souris après une hypoxie chronique [245], résultats confirmés par le groupe de L. A. Shimoda. De plus, cette surexpression est dépendante **de la voie HIF-1** [132]. Dans les hypertensions artérielles pulmonaires (groupe 1), on observe **une augmentation de l'expression de TRPC3 et de TRPC6 au sein des cellules musculaires lisses** [88, 246, 247], et l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ via des mécanismes SOC/ROC pourrait être en partie due à leur action dans les cellules de patients humains.

La sous-famille des TRPV est également bien représentée dans le muscle lisse pulmonaire. TRPV1 est exprimé (ARN messenger et protéine) dans les CMLAP de rat [87, 248] et des CMALP issues de patients hypoxiques chroniques [249]. TRPV4 est exprimé aussi bien au niveau de l'ARNm qu'au niveau protéique dans le muscle lisse artériel pulmonaire de rat [87, 103, 248, 250] mais aussi dans des cellules issues de patients avec hypertension pulmonaire des groupes 1 et 3 [6, 249]. Des études montrent également une expression de TRPV2 chez le rat [250] et l'humain [249] dans les CMLAP, mais également dans le muscle lisse des veines pulmonaires [251].

TRPM2 [248], TRPM7 [6] et TRPM8 [248, 250, 252] sont retrouvés au niveau protéique dans les CMLAP.

17.2. Implication dans les mécanismes de l'hypertension pulmonaire

Du fait de leur surexpression en contexte pathologique, TRPC1 et TRPC6 semblent donc jouer un rôle primordial dans la circulation pulmonaire et dans les mécanismes cellulaires intervenant au cours de l'hypertension pulmonaire.

Plusieurs travaux font notamment part du rôle de TRPC1 dans le muscle lisse artériel pulmonaire. N. Kunichika et ses collègues [253] montrent qu'une surexpression de TRPC1 par transfection adénovirale induit **une augmentation de la vasoconstriction pulmonaire** induite par l'entrée capacitive de calcium.

L'implication de TRPC6 lors de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire a été également montrée par Weissman et al. [254]. La délétion spécifique du gène codant pour TRPC6 (souris knock-out pour *trpc6*) abolit la vasoconstriction hypoxique pulmonaire ainsi que **l'influx de cation induit par l'hypoxie dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires isolées**. De plus, il y a une importante accumulation de diacylglycérol dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires de souris *trpc6* knock-out renforçant l'idée que TRPC6 serait un canal de type ROC.

Par ailleurs, la surexpression de TRPC1 précède **l'augmentation de la prolifération des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires** [88]. À l'inverse le traitement par ARN antisens diminue la prolifération de 50 % de CMLAP humaines [255].

Une étude de R. A. Fernandez et ses collègues [256] montre que la transition phénotypique des cellules musculaires lisses de quiescent/contractile à prolifératif/synthétique serait due à la surexpression de STIM2, ORAI2 et TRPC6 conduisant à l'augmentation de l'entrée capacitive de calcium et donc à la hausse de la $[Ca^{2+}]_i$ observée lors de l'hypertension pulmonaire.

TRPC1 et TRPC6 semblent tous deux cruciaux dans le développement de l'hypertension pulmonaire. Les souris mutées pour TRPC1 ou TRPC6 ne montrent pas d'effet délétère en condition physiologique, sous atmosphère normale. Cependant après une exposition à une hypoxie chronique, ces souris présentent un remodelage vasculaire moindre [257], notamment chez les souris TRPC1 knock-out, avec des résultats confirmés par un autre groupe [258].

TRPC6 semble plus impliqué dans la réactivité vasculaire et son rôle dans la vasoconstriction hypoxique pulmonaire semble le prédéterminer dans les phases précoces de la pathologie. À l'inverse TRPC1 interviendrait dans le développement du tonus myogénique après la première semaine d'hypoxie. La double délétion de TRPC1 et TRPC6 atténue le remodelage vasculaire, la hausse de la pression artérielle moyenne ainsi que l'hypertrophie cardiaque droite observée normalement après l'exposition à une hypoxie chronique [257].

TRPM7 pourrait constituer un nouveau candidat intéressant à étudier dans la mesure où les cellules déficientes pour cette isoforme ne prolifèrent pas (pas de synthèse d'ADN, ni de protéine) en réponse à l'angiotensine II [259]. TRPM7 est un canal régulé lui aussi par la déplétion des stocks calciques intracellulaires et il pourrait constituer un acteur important dans la prolifération des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires.

Cependant, malgré toutes ces observations **aucune de ces isoformes des canaux TRP n'est suffisante à elle seule pour expliquer le développement de l'hypertension pulmonaire**. Des études complémentaires portant sur d'autres isoformes de TRP sont donc nécessaires pour décrypter les mécanismes cellulaires et moléculaires aboutissant à l'HTP. Les données de la littérature sont relativement importantes concernant l'implication des canaux TRPC dans la circulation pulmonaire, celles concernant les isoformes TRPV sont plus

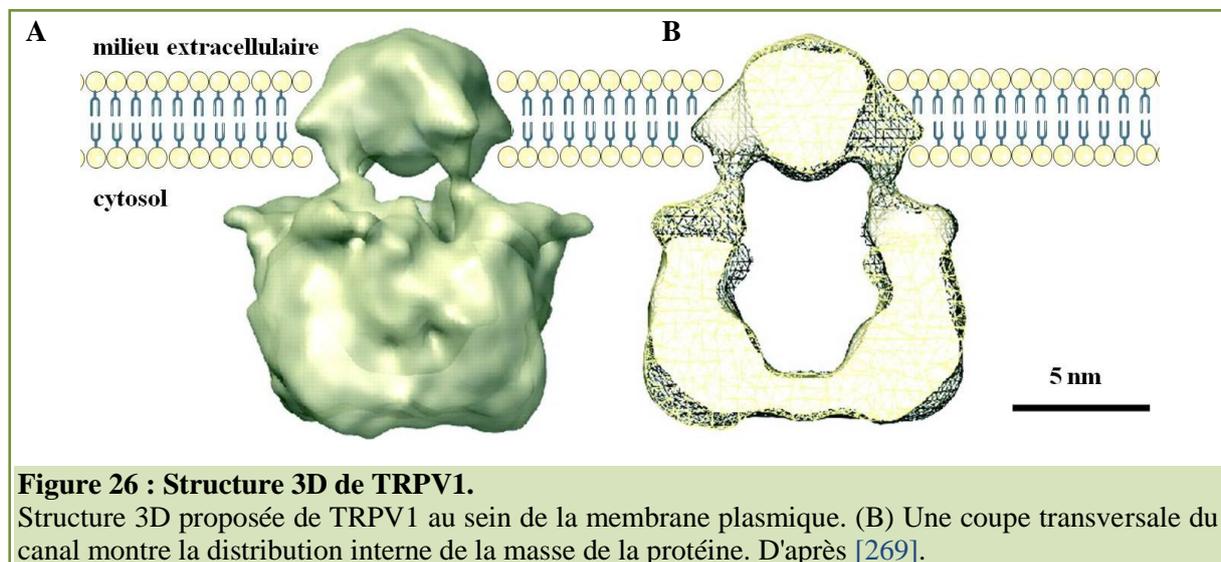
restreintes. De façon intéressante, le groupe du Pr. Sham a récemment montré que les isoformes TRPV1, V2, V3 et V4 sont présentes dans les artères intrapulmonaires de rat et que parmi ces isoformes, TRPV4 est majoritairement exprimée [248], suivi de TRPV2 et TRPV1. Par ailleurs, la sensibilité de ces canaux à un certain nombre de stimuli (parmi lesquels l'étirement membranaire), en font des candidats intéressants dans la compréhension de la mise en place de l'HTP.

18. TRPV1

18.1. Structure

TRPV1 a été le premier TRPV décrit et l'un des plus largement étudié. Il fut tout d'abord décrit dans le système nerveux central et périphérique, notamment dans les neurones sensoriels primaires. Des études ont montré son implication dans la perception et l'intégration de la douleur et de la chaleur. Il serait par ailleurs impliqué dans l'hyperalgésie thermique [260, 261]. Mais il est également exprimé dans de nombreux autres types cellulaires non neuronaux [262].

C'est une protéine de 95 kDa avec 838 acides aminés [263] (Figure 26). TRPV1 existe majoritairement sous la forme d'homotétramère [264], mais il a été également trouvé sous forme hétérotétramère avec TRPV3, une autre isoforme thermosensible [265], mais aussi avec TRPA1 [266]. Il possède trois domaines "ankyrine" en partie N-terminale [267, 268] importants pour la régulation et les interactions protéines-protéines (Figure 27).



18.2. Activation

TRPV1 est fortement perméable au Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 10$) et Mg^{2+} ($P_{\text{Mg}}/P_{\text{Na}} = 5$), et possède un courant rectificant entrant. Ce canal a une conductance unitaire de 50-100 pS [270].

Il est activé par **des composants vanilloïdes** tels que la capsaïcine (composant du piment), la pipérine (composé du poivre), la résinafêrattoxine, le camphre et l'ovanile, mais aussi par de multiples autres stimuli tels que la chaleur modérée ($\geq 43^\circ\text{C}$) [263], le pH acide ($\leq 5,9$), l'anandamide (un ligand aux récepteurs aux cannabinoïdes), certains eicosanoïdes. En effet, il a été montré que TRPV1 pouvait être activé et sensibilisé par le 20-HETE à des concentrations physiologiques (100 nM) [271]. Le site de fixation de la capsaïcine a récemment été localisé au niveau de la portion intracellulaire adjacente au domaine transmembranaire TM3 [272] (Figure 28).

Cependant, malgré toutes ces évidences du caractère polymodal de TRPV1, la nature mécanosensible directe de ce dernier reste à déterminer. De nombreuses études ont reporté des effets mécanotransducteurs de TRPV1 dans des systèmes hétérologues. Dans les artérioles mésentériques notamment, où une élévation de la pression intraluminale active TRPV1 via la génération de 20-HETE [273].

Les vanilloïdes sont des composés possédant un groupe vanillyle, groupe fonctionnel composé d'un **noyau benzylique** substitué par un groupe **hydroxyle (phénol)** en position *para* et un groupe **méthoxy** en position *méta*.
L'activation de TRPV1 par un de ces composants est responsable de la sensation de chaleur ou de brûlure après l'ingestion de piment (genre *capsicum*).

18.3. Régulation

TRPV1 est sensibilisé par l'élévation de la concentration cytosolique de Na^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} [274]. L'activité de TRPV1 peut également être régulée à la hausse par phosphorylation de plusieurs acides aminés clés qui conduisent à augmenter la sensibilité du canal aux stimuli chimiques, thermiques et physiques, notamment avec les protéines kinases A et C, la kinase calmoduline dépendante (CaM) et la Src kinase (prononcé "sarc" du mot sarcome) [275]. TRPV1 serait également impliqué dans différentes voies de signalisation initiées par des protéines G couplées à des récepteurs (GPCR). De plus, une étude montre que dans des cellules HEK293 et des neurones des ganglions spinaux (DRG), TRPV1 est sensibilisé par une exposition aiguë à l'hypoxie et que cette sensibilisation impliquerait le facteur HIF-1 α et la PKC [276].

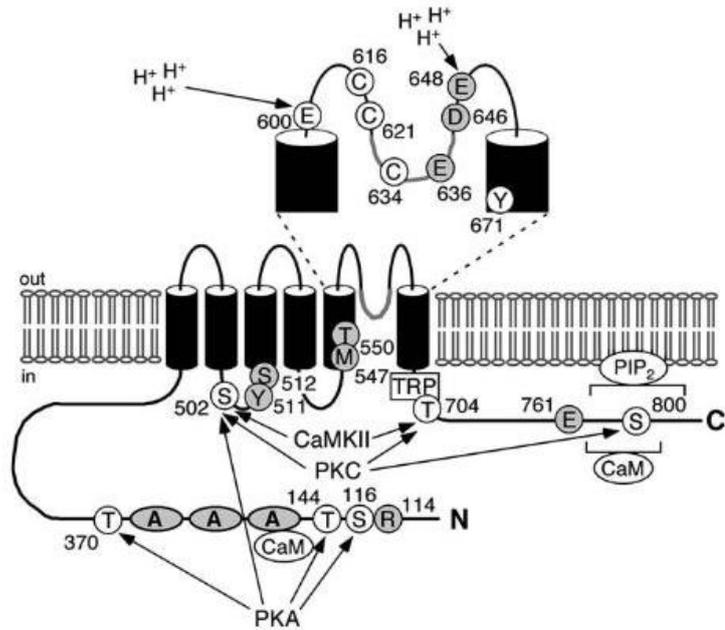


Figure 27 : Sites impliqués dans la régulation de TRPV1.

Les résidus d'acides aminés impliqués dans la fixation de résidus vanilloïdes sont représentés en gris. "TRP" dans l'encadré indique la position du domaine d'homologie TRP. Le phosphatidylinositol (4,5)- bisphosphate (PIP₂) se fixe sur la région indiquée en C-terminal. La calmoduline (CaM) se fixe à la fois en N- et C-terminal. A indique le premier domaine de répétition de type ankyrine. Les protéines kinases A (PKA) ou C (PKC), ou la CaM kinase II (CaM KII) phosphorylent les résidus d'acides aminés indiqués par des flèches. Les protons (H⁺) agissent sur les deux résidus acides glutamiques (Glu ou E) des boucles extracellulaires, indiqués par des flèches. D'après [267].

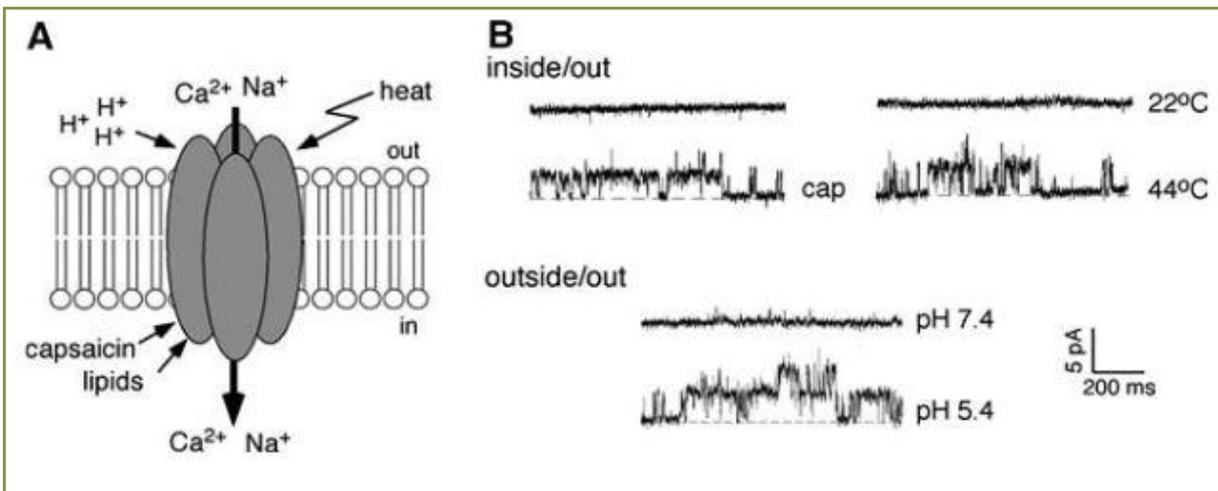


Figure 28 : Différents modes d'activation de TRPV1.

(A) Représentation de la structure tétramérique de TRPV1 avec les différents sites d'activation. (B) Activation de TRPV1 par la capsaïcine (100 nM), la chaleur (44°C) ou les protons (pH 5,4) à + 40 mV en configuration inside/out (capsaïcine et chaleur) ou outside/out (protons). Les pointillés indiquent l'état de fermeture du canal. D'après [267].

19. TRPV1 dans la circulation pulmonaire

Au niveau des cellules du système respiratoire, il a été montré que TRPV1 induirait indirectement la production de certaines interleukines comme IL-6 [249, 277], lors de l'inflammation survenant au cours de la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO).

19.1. Expression/surexpression

Il a été montré que l'isoforme TRPV1 était non seulement exprimée dans les cellules musculaires lisses des artères pulmonaires, mais qu'elle était également fonctionnelle [248] données confirmées au laboratoire [87]. L'étude de Yang et de ses collègues [278], ne semble pas montrer une surexpression de ce canal au sein du muscle lisse artériel pulmonaire de rat après un séjour en hypoxie. Cependant un autre groupe montre que **son expression est augmentée** dans des cellules musculaires lisses issues d'artères pulmonaires humaines exposées à une hypoxie (3 % O₂) pendant 72 heures, alors que l'expression des autres TRPV ne semble pas modifiée [249]. De plus, des expériences menées au laboratoire montrent une surexpression de la protéine dans les artères intrapulmonaires de rats hypoxiques chroniques (travail de thèse de M^{lle} D. Dahan, données non publiées).

19.2. Fonction

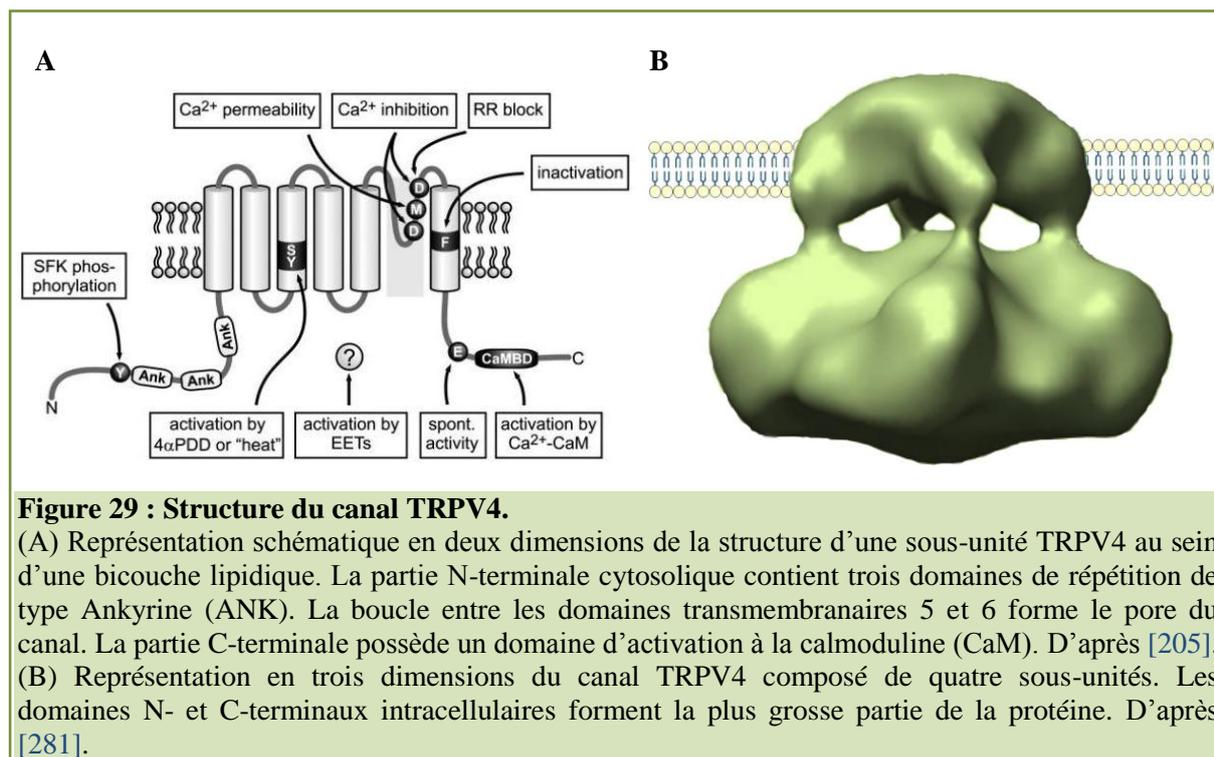
TRPV1 est capable de **potentialiser la migration des CMLAP**, phénomène essentiel lors du développement de l'hypertension pulmonaire [87]. De plus, la prolifération des cellules musculaires lisses induite par l'hypoxie est inhibée par l'ajout de capsazépine, inhibiteur de TRPV1 [249].

L'implication de ce canal dans l'hypertension pulmonaire reste à approfondir. Il est toutefois intéressant de noter que l'hypoxie (4 % O₂ durant 20 heures sur des cellules DRG) sensibiliserait son activation, par un mécanisme HIF-1 α et PKC dépendant [276]. Cependant, une autre étude montre que l'exposition des cellules HEK-293 à l'hypoxie aiguë (3 % O₂) activerait partiellement un courant de type TRPV1, mais inhiberait l'activation de ce dernier par son agoniste la capsaïcine [279]. Les auteurs suggèrent que l'hypoxie engendrerait la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) qui piègeraient la capsaïcine et diminueraient la concentration effective de cette dernière.

20. TRPV4

20.1. Structure

TRPV4 est également connu sous le nom TRP12, VRL-2 (vanilloid receptor-like-2), OTRPC4 ou VR-OAC. TRPV4 est à environ 40 % identique à TRPV1 et TRPV2. TRPV4 est exprimé très largement chez l'Homme. On le retrouve aussi bien dans des cellules excitables et que non excitables, et il a été isolé pour la première fois dans le rein de rat [280]. Il est principalement exprimé dans l'épithélium, le muscle lisse et les cellules endothéliales des différents tissus.



C'est une protéine de 98 kDa (871 acides aminés). Tous les homologues de TRPV4 de mammifères partagent un haut degré d'homologie de séquence (95 % - 98 %) [282].

Le domaine N terminal de TRPV4, placé dans le cytosol, présente trois à cinq domaines "ankyrine" (Ankyrin Repeat Domain-ANK ou ARD) (Figure 29) qui ont été proposés comme étant le lien physique du canal avec le cytosquelette [280]. Ces domaines sont impliqués dans d'autres associations protéines-protéines [283]. De plus, le domaine C terminal semble être impliqué dans l'interaction avec les domaines C-terminaux des autres sous-unités de TRPV4 au sein de la structure tétramérique [284], et participerait à l'assemblage des sous-unités [285].

Le domaine C-terminal contient de nombreux domaines CaM, sites de liaison du calcium intervenant dans l'action potentialisatrice. De plus, les quatre derniers acides aminés du domaine C-terminal présentent un motif de liaison de type PDZ qui contribue à l'interaction de TRPV4 avec un grand nombre de protéines à domaines PDZ [286].

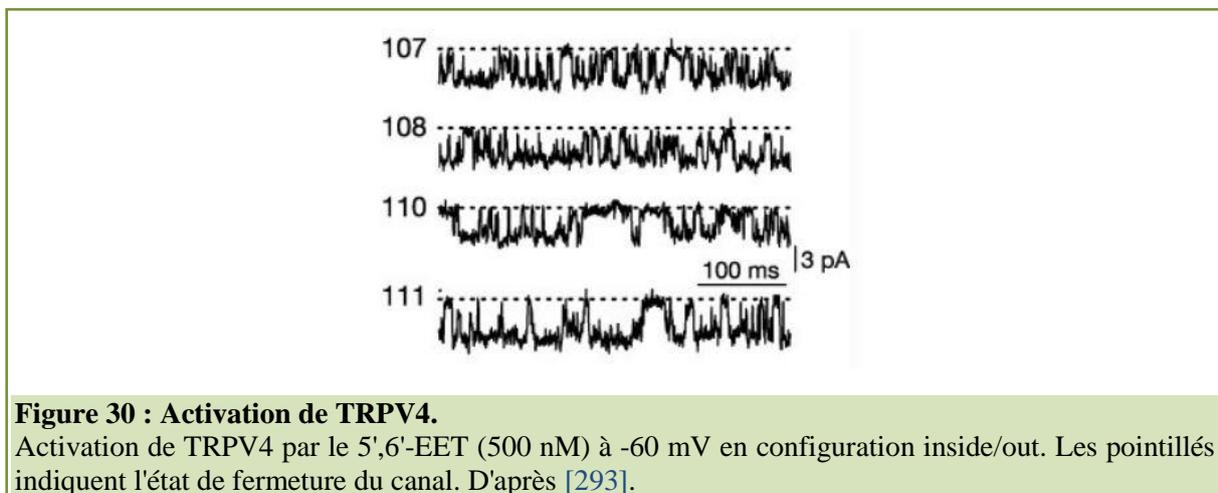
20.2. Activation

C'est un canal cationique non sélectif, avec une plus forte perméabilité pour le Ca^{2+} et le Mg^{2+} que pour le Na^+ ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} = 6$). Son ouverture génère une conductance de 90 pS [287]. Cependant, bien que présentant des homologies avec TRPV1, TRPV4 est **insensible à la capsaïcine**.

Actuellement, il est admis que TRPV4 est un canal considéré comme un mécano- ou osmosenseur, mais également comme un thermo-senseur modéré (entre 24°C et 27°C) [288]. Ce canal a d'abord été identifié comme canal activé par l'hypotonicité. En effet, son activité est augmentée de 50 % après application d'un choc hypo-osmotique qui provoque le gonflement de la cellule. [280, 289].

L'implication de ce canal dans la réponse aux chocs osmotiques, et son expression au sein de tissus comme l'oreille interne, les neurones sensoriels et les cellules endothéliales, connus pour être soumis à un stress mécanique et pour exprimer des canaux mécanosensibles, posent la question de la mécanosensibilité de ce canal. Aucune activation de ce canal n'a été observée après application d'une dépression dans une pipette de patch-clamp sur des cellules HEK293 [290]. Des études ont montré que TRPV4 pouvait être activé aussi par le flux, mais qu'il n'était pas sensible, en tout cas directement, à l'étirement de la membrane [291].

L'ouverture du canal peut aussi être déclenchée par des agents chimiques tels que le 4 α -phorbol-didécanoate (4 α -PDD), la GSK1016790A, ou par les produits du métabolisme de l'acide arachidonique [286], comme les EET (8,9-EET et 11,12 EET), synthétisés dans les poumons [292], ou le 5'-6'-EET [293] (Figure 30).



20.3. Régulation

Comme les autres TRP, TRPV4 est sujet à une double régulation par le Ca^{2+} , avec une potentialisation et une inactivation du canal après la fixation d'un agoniste en présence de calcium [294]. L'interaction avec le PIP2 en N-terminal augmente l'activité canalaire induite par les chocs osmotiques et la chaleur. TRPV4 est sensibilisé par l'ATP intracellulaire et désensibilisé par des stimulations répétées ou prolongées.

21. TRPV4 dans l'hypertension pulmonaire

21.1. Expression/surexpression

Au niveau du tissu pulmonaire, TRPV4 est exprimé dans l'endothélium vasculaire, le muscle lisse vasculaire et bronchique, et les alvéoles, avec les plus forts niveaux d'expression dans les voies respiratoires et l'épithélium alvéolaire [295].

Plusieurs études montrent l'expression aussi bien au niveau de l'ARNm, qu'au niveau protéique, du canal TRPV4 dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires [87, 248].

Il a également été prouvé que TRPV4 intervient dans la réactivité des artères pulmonaires à la sérotonine, et est en partie responsable de la réponse calcique accrue induite par la sérotonine chez les animaux hypoxiques chroniques. [296, 297].

De plus, TRPV4 semble être une des seules isoformes des TRPV à être **significativement surexprimée dans les CMLAP** de rats hypoxiques chroniques. [103, 278] En effet, ces études montrent une nette surexpression aussi bien au niveau de l'ARNm que de la protéine de l'isoforme TRPV4 dans les cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires de rats hypoxiques chroniques. De plus, l'étude de Yang et ses collègues montre que les souris knock-out pour *trpv4* sont moins sujettes aux effets de l'hypoxie chroniques. En effet, après une exposition à une hypoxie chronique, le remodelage de la paroi artérielle pulmonaire est moindre comparé aux animaux contrôles, les pressions artérielles pulmonaires moyennes sont moins élevées et l'hypertrophie ventriculaire droite est restreinte.

21.2. Fonction

Une étude récente montre que **TRPV4 est un élément essentiel lors de la vasoconstriction hypoxique pulmonaire**. La visualisation directe des artères pulmonaires sous-pleurales par microscopie intra-vitale a permis de mettre en évidence que la vasoconstriction induite par l'hypoxie (caractéristique de la circulation pulmonaire) est significativement atténuée chez les souris mutée pour le gène codant pour TRPV4 [242]. De plus, l'influx de Ca^{2+} induit par l'hypoxie aiguë (1 % O_2 pendant 45 minutes) est diminué avec l'inhibition de TRPV4 dans des CMLAP d'artères intrapulmonaires humaines [242]. Il a également été montré que **TRPV4 co-immunoprécipitait avec TRPC6**, renforçant l'idée d'un canal hétéromérique TRPC6/TRPV4 et d'une action conjuguée de ces deux canaux [242].

L'hypoxie pourrait donc agir sur cette isoforme dans la circulation pulmonaire, comme cela a été montré dans des astrocytes de rat où l'hypoxie (par un mécanisme d'ischémie avec 6 % O_2 durant 15 min), augmente significativement la réponse au 4α -PDD [298].

OBJECTIFS DE LA THÈSE

L'hypertension pulmonaire (HTP) se caractérise par un **remodelage vasculaire** induisant une élévation progressive de la pression artérielle pulmonaire. Ceci conduit à une défaillance cardiaque droite et, à terme, à la mort.

Au niveau vasculaire, une exposition prolongée à l'hypoxie est responsable du phénomène de vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP) qui favorise les échanges gazeux en détournant le flux sanguin vers les alvéoles bien ventilées. Lorsque cette VHP se généralise, elle conduit au développement d'une HTP de groupe 3. La VHP est responsable de l'étirement de la membrane des cellules musculaires lisses (CML) au sein de la paroi artérielle et peut ainsi **activer des "stretch-activated channels"**.

D'autre part, des études récentes montrent que les réponses calciques médiées par les SAC sont plus importantes dans les CMLAP issues d'animaux hypoxiques chroniques que dans les cellules provenant d'animaux normoxiques [47, 250, 299]. Cependant, ce modèle animal d'hypoxie chronique combine les effets de l'hypoxie *per se* et de l'augmentation des tensions pariétales induites par l'hypoxie via la VHP. Ce modèle ne permet donc pas de discriminer lequel de ces deux stimuli est responsable de l'amplification des réponses calciques médiées par les SAC. L'objectif principal de mon travail de thèse a donc été de déterminer si l'hypoxie induit ces différences de façon **directe ou indirecte, conséquence d'un étirement plus important induit par la VHP**.

Pour répondre à cette question, nous avons utilisé différentes approches expérimentales, en nous plaçant au niveau cellulaire. Nous nous sommes intéressés aux effets de ces deux types de stimulations (hypoxie ou étirement, indépendamment l'un de l'autre) sur l'activité, l'expression et la relocalisation des canaux de type SAC. Pour cela, nous avons réalisé des conditionnements *in vitro* à l'hypoxie ou à l'étirement de CMLAP issues d'animaux sains normoxiques. Dans un premier temps, les CMLAP ont été cultivées dans un incubateur dont la teneur en O₂ est modulable. Puis dans un second temps, nous avons cultivé les cellules sur un support étirable permettant de les étirer chroniquement. Enfin, nous nous sommes intéressés aux conséquences physiologiques de l'une et l'autre de ces stimulations à travers l'étude de mécanismes cellulaires fortement impliqués dans le développement de l'hypertension pulmonaire, tels que la migration et la prolifération des CML d'artères intrapulmonaires.

Ce travail a donc été scindé en deux parties principales : d'une part, **le rôle direct de l'hypoxie**, et d'autre part **le rôle direct de l'étirement** des CML (induit par la VHP). Les résultats obtenus pour la composante "hypoxie" ont fait l'objet **d'une première publication au journal Pflügers Archiv-European Journal of Physiology (sous presses, e-pub : en mars 2015)**. La deuxième partie concernant la composante "étirement" est en cours d'achèvement et devrait donner lieu très prochainement à la rédaction d'un second article. Étant donné que les canaux TRPV1 et TRPV4, isoformes mécanosensibles, sont impliquées dans la migration et la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires [87], et qu'ils sont surexprimés lors de l'HTP [250], mon travail s'est centré sur ces deux isoformes. De plus, grâce à une collaboration entamée avec le Pr Philippe Gailly de l'Université Catholique de Louvain (Bruxelles, Belgique), nous avons pu avoir accès à une souche de souris knock-out pour le gène *trpv4* et ainsi bénéficier d'un outil supplémentaire pour notre étude.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Animaux

L'utilisation d'animaux de laboratoire dans le cadre de cette étude suit **les règles d'éthique émises par le "Comité d'éthique de Bordeaux en expérimentation animale"** N°50, en accord avec les directives européennes (86/609/CEE, révisées en 2013), ainsi que le **"Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"** publié par le "National Institut of Health" (NIH) des États-Unis.

Les expériences ont été réalisées en accord avec la règle des **trois "R"** (Remplacement, Réduction, Raffinement). En effet, la quantité strictement nécessaire d'animaux a été utilisée. De plus, la mutualisation des animaux entre différents expérimentateurs a participé à **la réduction** du nombre d'animaux utilisés. Tous les animaux ont été élevés dans des conditions constantes de température et d'humidité avec des cycles de 12 heures de jour/12 heures de nuit et ont reçu de l'eau et de la nourriture *ad libitum*. L'enrichissement du milieu a contribué au **raffinement** de l'hébergement, raffinement également réalisé à travers l'utilisation de procédures d'euthanasie appropriées.

1.1. Rats sains

Des rats mâles de souche Wistar d'un poids compris entre 250 et 400 g (élevage de chez Janvier) ont été utilisés comme animaux du groupe contrôle.

1.2. Modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 3 : le rat hypoxique chronique

Comme décrit dans la section "modèles animaux de l'hypertension pulmonaire", et selon un protocole mis en place au laboratoire [300], les rats ont été placés dans un caisson hypobare durant 21 jours, et sont soumis à une pression barométrique de 380 mmHg équivalente à une vie en altitude à 5500 m. La pression barométrique étant diminuée, la pression partielle en dioxygène (PO₂) est elle aussi réduite, passant de 160 à 80 mmHg. Dans ces conditions, la PO₂ dans les alvéoles ainsi que dans les capillaires alvéolaires va également diminuer et induire une hypoxémie. L'exposition à cette hypoxie prolongée induit un remodelage des artères intrapulmonaires et une hypertension pulmonaire.

1.3. Modèle animal d'hypertension pulmonaire de groupe 1 : le rat traité à la monocrotaline

Le modèle du rat injecté à la monocrotaline a également été utilisé dans cette étude (détaillé dans la partie "modèles animaux de l'HTP"). Les rats ont reçu une injection intrapéritonéale unique de monocrotaline à 60 mg/kg. La quantité nécessaire de monocrotaline pour une injection de 100 µL a été diluée en proportion égale dans du HCl 1 M et du NaOH 1 M. Le pH de la solution a été ajusté à 7.

La monocrotaline une fois métabolisée par le foie va produire un composé pyrrolique qui altère l'endothélium vasculaire. Les lésions de l'endothélium conduisent au développement d'une hypertension pulmonaire au bout de quatre semaines.

1.4. Modèle d'hypertension pulmonaire sévère

Le modèle d'hypertension pulmonaire sévère a été utilisé également au début de cette étude. Comme décrit dans la partie "modèles animaux" des rats ont reçu une injection intrapéritonéale unique de monocrotaline à 60 mg/kg puis ont été placés dans le caisson hypobare pendant 21 jours.

1.5. Rapport de Fulton

La mesure de **l'hypertrophie du ventricule cardiaque droit** nous permet d'attester de l'état hypertendu des animaux dans les différents modèles utilisés. Cette hypertrophie est estimée par le rapport de Fulton qui correspond à la **masse du ventricule droit par rapport à la masse du ventricule gauche et du septum** (Figure 31). Les rats contrôles ont un rapport de Fulton proche de 0,2. On considère que les rats ont développé une hypertrophie cardiaque droite lorsque l'indice de Fulton se situe au delà de 0,3. Chez les rats "monocrotaline" et dans le modèle sévère, ce rapport peut avoir des valeurs supérieures à 0,6.

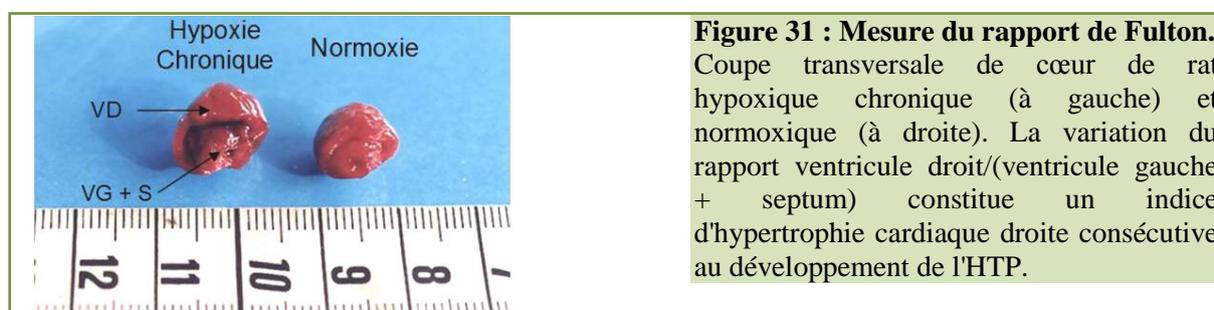


Figure 31 : Mesure du rapport de Fulton. Coupe transversale de cœur de rat hypoxique chronique (à gauche) et normoxique (à droite). La variation du rapport ventricule droit/(ventricule gauche + septum) constitue un indice d'hypertrophie cardiaque droite consécutive au développement de l'HTP.

1.6. Souris sauvages saines et souris mutées pour le gène codant pour le canal TRPV4

Les souris utilisées pour cette étude possèdent un fond génétique C57BL/6. (Les souris sauvages contrôles proviennent de chez Janvier). Les souris *trpv4* knock-out sont un **don de la part du Pr Philippe Gailly** de l'Université Catholique de Louvain en Belgique.

La génération de cette mutation a été initialement réalisée par Wolfgang Liedtke et ses collègues (Rockefeller University) et a fait l'objet d'une publication dans le journal PNAS [301].

Chez la souris, le gène codant pour *trpv4* est situé sur le chromosome 5 et est constitué de 15 exons. La génération d'un allèle mutant a été générée en ciblant l'exon 12 du gène codant pour le domaine du pore et les domaines transmembranaires 5 et 6. La disruption de l'exon a été réalisée par l'insertion d'une cassette néomycine par recombinaison homologue (Figure 32).

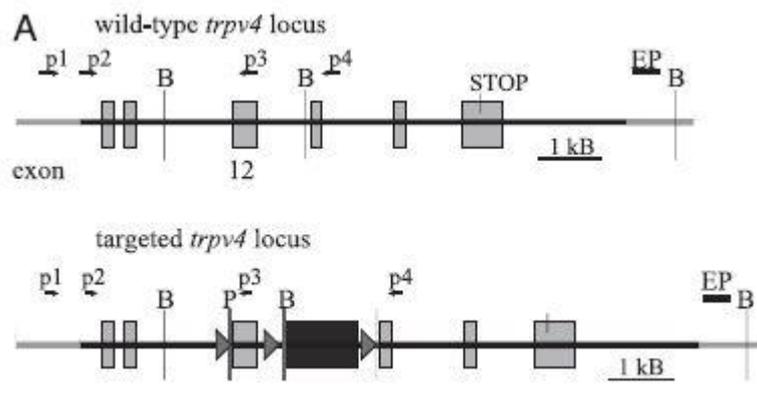


Figure 32 : Construction génétique à l'origine de knock-out de *trpv4*.

Une cassette néomycine a été insérée dans la séquence de l'exon 12 du gène *trpv4* par recombinaison homologue. Cette insertion est à l'origine de l'apparition d'un codon stop dans la séquence du gène, ce dernier ne codant plus que pour une protéine tronquée. "p1/p3" et "p2/p4" symbolise les couples d'amorces utilisés par Liedtke et ses collègues pour discriminer les animaux sauvages de ceux portant la construction génétique. D'après [301].

1.7. Maintien d'une lignée de souris mutées pour le gène *trpv4*

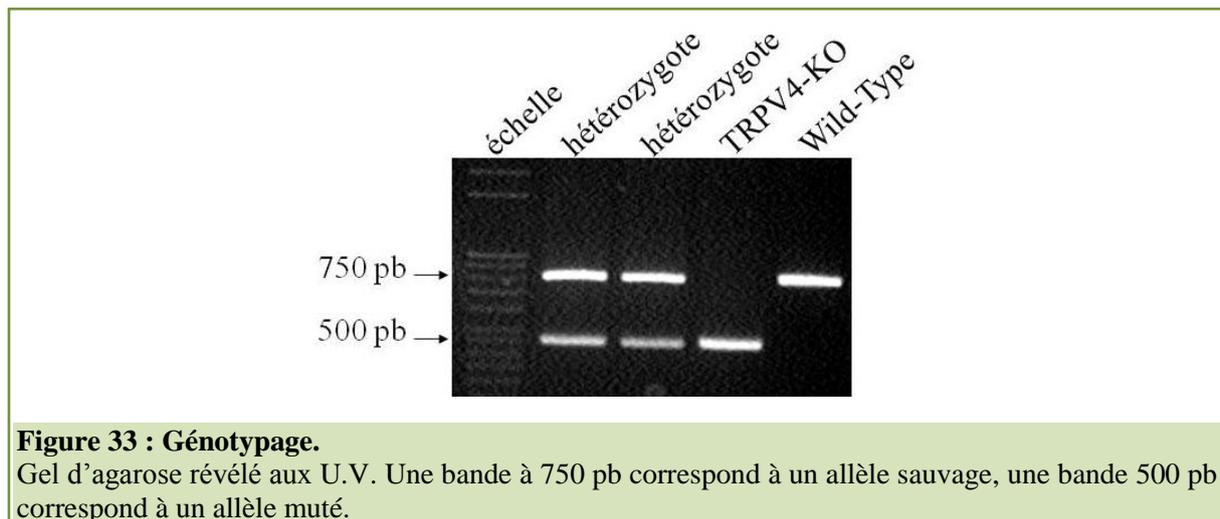
Des souris hétérozygotes pour la mutation *trpv4* (*trpv4*^{+/-}) ont été croisées pour obtenir des souris homozygotes *trpv4* knock-out (*trpv4*^{-/-}). Des croisements successifs ont été réalisés entre individus *trpv4*^{-/-}, afin d'obtenir une lignée *trpv4*^{-/-} stable.

La détection des souris porteuses de l'allèle muté a été réalisée par PCR. Au moment du sevrage, un petit morceau de l'extrémité de la queue des animaux a été prélevé et utilisé pour un génotypage.

L'ADN génomique total a été extrait à l'aide du kit commercial RedExtract Mix N-AMP (Sigma). Brièvement, les queues ont été en partie digérées dans une solution d'extraction ("extraction solution" et "tissue préparation solution" du kit) pendant 10 minutes à température ambiante puis 5 minutes à 95°C. L'action de cette solution a été neutralisée par l'ajout de la solution de neutralisation ("neutralization solution") fournie avec le kit.

L'utilisation d'une PCR a ensuite permis d'amplifier les régions d'ADN génomique d'intérêts à l'aide de deux couples d'amorces : l'un ciblant l'allèle sauvage du gène codant pour *trpv4* (exon 4), l'autre ciblant l'allèle mutée (en ciblant la cassette néomycine insérée dans l'exon 4), (Figure 32 et Tableau 2). 5 µL d'ADN génomique ont été mélangés à 10 µL de mix PCR contenant la polymérase, des dNTP, des oligos dT et les deux couples d'amorces. L'amplification se fait grâce à un thermocycleur de type Uno II, Biometra : l'ADN subit une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes et 30 secondes, puis 32 cycles d'hybridation des amorces (60°C pendant 30 secondes) et d'élongation (72°C pendant 11 minutes) se succèdent. À la fin, la réaction est stoppée à 4°C.

Les amplicons ont ensuite été détectés sous une lampe U.V, avec du SYBR green, (un agent intercalant de l'ADN double brin non spécifique) après migration sur gel d'agarose 1 %. Un amplicon de 750 paires de base correspond à l'allèle sauvage, et un amplicon à 500 paires de bases correspond à l'allèle muté (Figure 33).



2. Microdissection de l'artère intrapulmonaire et obtention de cellules musculaires lisses

2.1. Chez le rat

Les rats sont euthanasiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique (CEVA santé animale) (190 mg/kg).

Les poumons sont prélevés *en bloc* et placés dans du milieu DMEM complété d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine 1 %) et d'acides aminés non essentiels (1 %). Les artères intrapulmonaires du premier aux troisièmes ordres sont microdisséquées sous loupe binoculaire dans le même milieu.

Après avoir été isolées, les artères intrapulmonaires du 1^{er} au 3^{ème} ordre (Figure 34) sont ouvertes longitudinalement et l'endothélium ainsi que l'adventice sont enlevés. La média restante est ensuite digérée enzymatiquement par une première incubation dans de l'HBSS (Hank's Buffered Salt Solution contenant 1 mg/mL de BSA (bovine serum albumin) à faible concentration en calcium (50 μ M), pendant 10 minutes à température ambiante puis avec de la papaïne (0,5 mg/mL) et un agent favorisant l'action de la papaïne, le dithiothréitol (DDT - 0,3 mg/mL) pendant 15 minutes à 37°C. Puis pendant 10 minutes avec de la papaïne (0,25 mg/mL), du DDT (0,3 mg/mL) et de la collagénase (0,3 mg/mL). Après deux rinçages dans de "l'HBSS faible en calcium", les cellules sont ensuite dissociées mécaniquement par des allers-retours à l'aide d'une pipette de verre siliconée et rodée, pendant 10 minutes. Le surnageant est ensuite centrifugé pendant 5 minutes à 250 g à 4°C. Le culot est repris dans du milieu de culture DMEM additionné d'acides aminés non essentiels (1 %), d'antibiotiques (1 %) et de SVF (sérum de veau fœtal – 10 %).

Les cellules sont ensuite cultivées sur les supports adéquats à 37°C sous atmosphère humide avec 5 % de CO₂ jusqu'à leur utilisation.

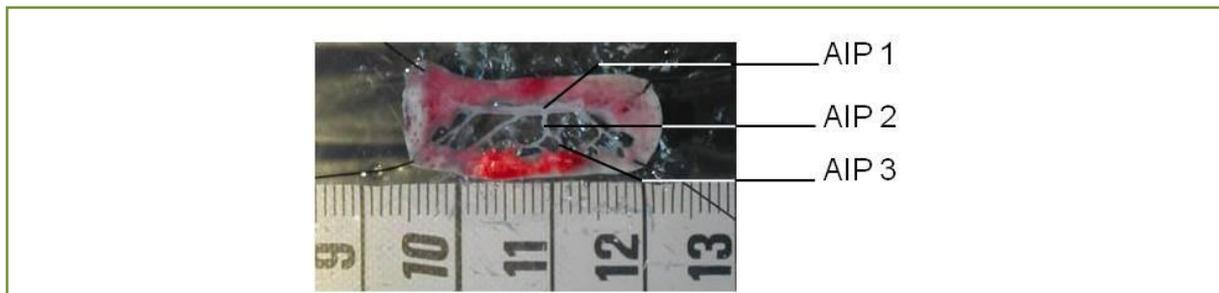


Figure 34 : Microdissection d'une AIP de rat.

AIP1 : artères intrapulmonaires de 1^{er} ordre ; AIP2 : artères intrapulmonaires de 2^{ème} ordre ; AIP3 : artères intrapulmonaires de 3^{ème} ordre.

2.2. Chez la souris

Les souris sont euthanasiées par dislocation cervicale. Les poumons sont ensuite prélevés *en bloc* de la même manière que pour les rats, et placés dans du DMEM avec antibiotiques (1 %).

Les artères intrapulmonaires sont ensuite microdisséquées sous une loupe binoculaire dans du Krebs-HEPES (Tableau 3) froid (4-10°C). Une fois prélevées et débarrassées du parenchyme résiduel, ainsi que de l'adventice et de l'endothélium, les artères sont découpées en petites sections d'environ 1 mm et placées dans une solution de collagénase type I (1,36 mg/mL) diluée dans du DMEM supplémenté d'acides aminés non essentiels (1 %). Après quatre à six heures d'incubation à 37°C sous atmosphère humide, la solution est reprise dans 3 mL de milieu complet (DMEM avec antibiotiques - 1 % ; acides aminés non essentiels - 1 % et SVF - 10 %), et centrifugée une première fois 5 minutes à 300 g. Le culot est ensuite repris dans 5 mL de milieu complet et centrifugé une seconde fois à 300 g pendant 5 minutes.

Finalement, le culot est repris dans 1 mL de milieu complet etensemencé dans 4 puits d'une plaque 96 puits. 50 % du milieu sont changés une première fois au bout de 72 heures. Après 5 à 7 jours après la dissection, les CMLAP obtenues forment un tapis cellulaire confluent et peuvent être utilisées pour les différentes expériences.

gène	séquence (S - sens ; AS - antisens)	numéro d'accèsion Genbank	taille du produit de PCR (pb)	température de fusion du produit (Tm) (°C)	concentration (nM)
<i>trpv1</i>	S: AGCGAGTTCAAAGACCCAGA AS: TTCTCCACCAAGAGGGTCAC	NM_031982.1	268	88.2	200
<i>trpv4</i>	S: GCCACCCTACCCTTACCGTA AS: GGAAGGAGCCATCGACGAAGA	NM_023970.1	158	88.8	200
<i>trpv4</i> (wild type)	S : TGTTCCGGGTGGTTTGGCCAGGATAT AS : GGTGAACCAAAGGACACTTGCATAG	HA04764137	750	76,9	100
<i>trpv4</i> (knock-out)	S : TCCTGCCGAGAAAGTATCCA AS : GTCAAGAAGGCGATAGAAGG	HA04764139	500	64,6	100
<i>hprt</i>	S:5'-TGTTGGATATGCCCTTGACTA-3' AS:5'-AGATGGCCACAGGACTAGAAC-3'	NM_012583	178	85.6	100

Tableau 2 : Séquences des différentes amorces utilisées.

solutions	concentrations (en mM)										
	NaCl	KCl	CaCl ₂	MgCl ₂	EGTA	MgSO ₄	NaHCO ₃	KH ₂ PO ₄	HEPES	Glucose	Mannitol
Krebs-HEPES 2 mM Ca ²⁺ isotonique	118,4	4,7	2	0	0	1,2	4	1,2	10	6	qsp 300 mOsm
Krebs-HEPES 0 mM Ca ²⁺ isotonique	118,4	4,7	0	0	0,4	1,2	4	1,2	10	6	qsp 300 mOsm
Chocs hyposmotiques (225 mOsm) 2 mM Ca ²⁺	91,3	5,9	2,2	1,2	0	0	0	0	10	14	qsp 225 mOsm
Chocs hyposmotiques (225 mOsm) 0 mM Ca ²⁺	91,3	5,9	0	1,2	0,4	0	0	0	10	14	qsp 225 mOsm
Chocs osmotiques (310 mOsm) 2 mM Ca ²⁺	91,3	5,9	2,2	1,2	0	0	0	0	10	14	91
Chocs osmotiques (310 mOsm) 0 mM Ca ²⁺	91,3	5,9	0	1,2	0,4	0	0	0	10	14	91
Patch-clamp bath solution	0	140	2,2	1,2	0	0	0	0	10	14	qsp 310 mOsm
Patch-clamp intrapipette 10 mM tétraéthylammonium (TEA)	140	0	2,2	1,2	0	0	0	0	10	14	qsp 310 mOsm

Tableau 3 : Composition des différentes solutions utilisées (en mM).

Composition en mM des solutions utilisées pour les mesures de la [Ca²⁺]_i, pour les chocs osmotiques et pour les expériences de patch-clamp. Qsp : quantité suffisante pour.

3. Approche cellulaire : conditionnement des cellules

3.1. Exposition des cellules à l'hypoxie

Les cellules musculaires lisses de rat du groupe "contrôle" sont placées dans un incubateur avec une atmosphère contenant 21 % O₂, 74 % N₂ et 5 % CO₂.

Les cellules du groupe "hypoxique" sont exposées à une atmosphère qui contient 10 % d'O₂, 85 % de N₂ et 5 % CO₂, (constituant le groupe "hypoxique 10 % O₂") ou 1 % d'O₂, 94 % de N₂ et 5 % de CO₂ (constituant le groupe "hypoxique 1 % O₂") pendant 24 ou 48 heures dans un incubateur tris-gaz (Heracell 150i, ThermoScientific).

3.2. Étirement chronique des cellules

Les cellules musculaires lisses de souris sontensemencées sur des chambres en silicone (B-bridge international) recouvertes de collagène I (rat-tail – 3 mg/mL, Gibco) Les chambres sont ensuite étirées longitudinalement de manière cyclique grâce au système d'étirement STREX[®] ST-140-10, à la fréquence de 1 cycle par seconde (1 Hz) à 10 ou 20 % de leur longueur initiale. L'appareil étant placé dans l'incubateur, la durée de l'étirement dépend de l'expérience réalisée. Ce système automatisé permet ainsi d'imposer des contraintes uniaxiales et donc de reproduire *in vitro* les contraintes physiques que peuvent subir *in vivo* les CMLAP présentes dans la paroi vasculaire.

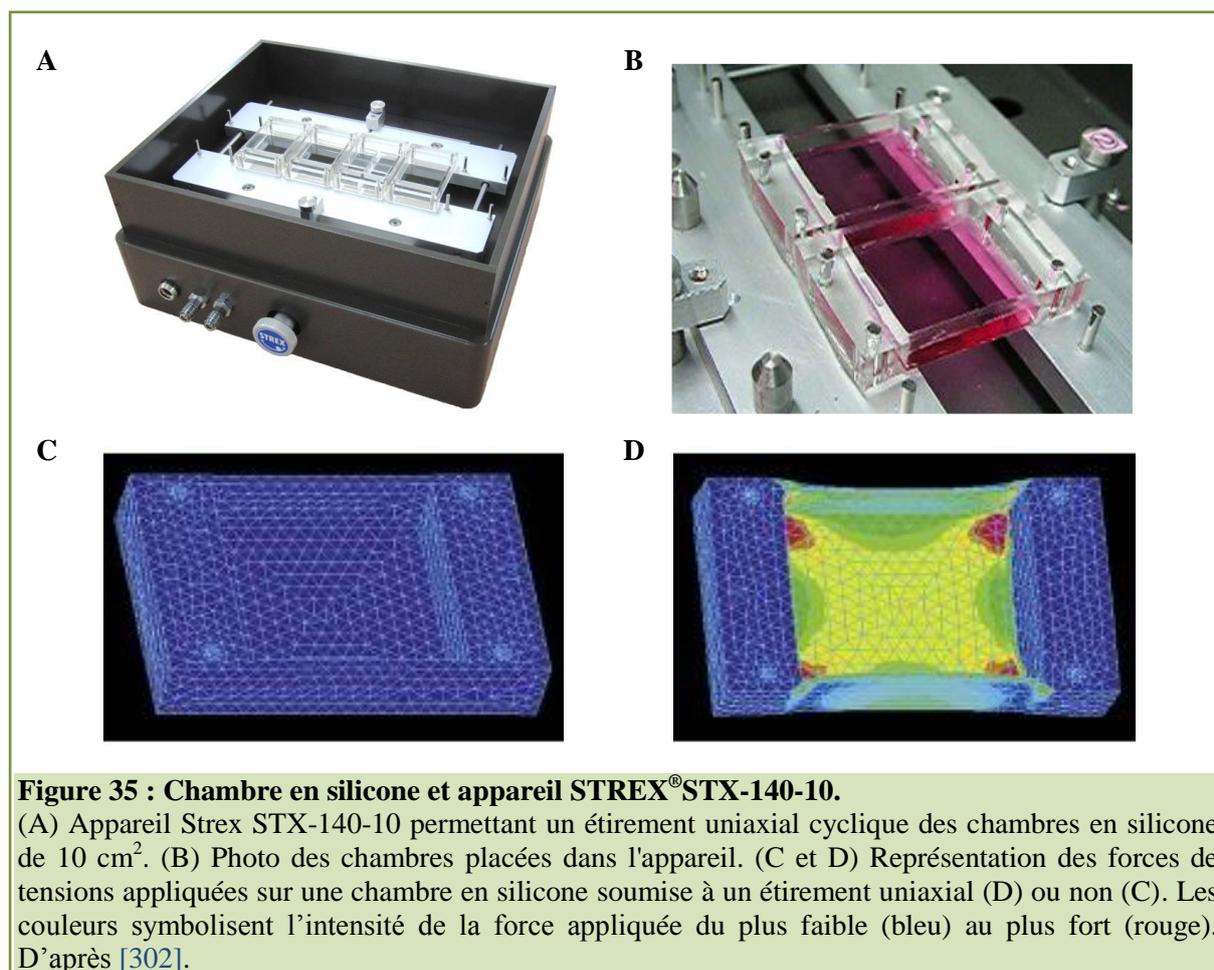


Figure 35 : Chambre en silicone et appareil STREX[®]STX-140-10.

(A) Appareil Strex STX-140-10 permettant un étirement uniaxial cyclique des chambres en silicone de 10 cm². (B) Photo des chambres placées dans l'appareil. (C et D) Représentation des forces de tensions appliquées sur une chambre en silicone soumise à un étirement uniaxial (D) ou non (C). Les couleurs symbolisent l'intensité de la force appliquée du plus faible (bleu) au plus fort (rouge). D'après [302].

4. Étude de l'expression des canaux TRPV

4.1. Étude de l'expression transcriptionnelle : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) quantitative

4.1.1. Obtention des ADN complémentaires

Les cellules sont rincées deux fois dans du PBS (Phosphate Buffer Saline). Les ARN_{messagers} sont extraits grâce au kit commercial NucleoSpin RNA II. Les cellules sont lysées grâce à la solution de lyse dans le but d'inactiver les RNases et de préparer les ARN à leur passage dans les colonnes de silice. Puis le lysat passé dans des colonnes de silice dans le but d'être purifié.

Après la lyse, l'homogénéisation et la réduction de la viscosité sont réalisées par une filtration dans les colonnes nucléospin. L'ADN génomique résiduel est éliminé par une digestion avec une rDNase. L'ARN est élué avec de l'eau sans RNase. La concentration en ARN est mesurée par microspectrométrie avec un lecteur Spectrostar (BMG Labtech).

Après extraction des ARN totaux, une synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée par transcriptase inverse (Reverse transcriptase). 1 µg d'ARN est mis en présence d'une reverse transcriptase provenant du virus de la myéloblastose aviaire (AMW Reverse Transcriptase ; 15 unités ; Promega), de dNTP (10 mM, Promega), d'oligo dT (0,5 µg ; Promega), et d'un inhibiteur de ribonucléase (rRNasin ; 40 unités ; Promega). La synthèse d'ADNc s'effectue pendant une heure à 42°C, puis l'enzyme est inactivée à 60°C pendant 10 minutes.

4.1.2. PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative permet de mesurer en temps réel le niveau d'expression des transcrits amplifiés.

Pour chaque PCR, le milieu réactionnel contient de l'ADNc provenant de 10 ng d'ARN totaux, l'enzyme Titanium Taq DNA Polymerase (1/50ème), le tampon PCR Titanium Taq (Clontech Laboratories), des dNTP (0,25 mM chacun, Clontech), des amorces (Tableau 2) et l'agent intercalant fluorescent SYBR Green (1/2000ème, Molecular Probes, Interchim). L'amplification est réalisée grâce à un thermocycleur de type Rotorgene 2000 (Corbett Research) et se déroule comme suit : une étape de dénaturation de l'ADN de 15 secondes à 95°C, suivie d'une étape de 15 secondes d'hybridation des amorces à température variable (selon le gène amplifié, gène domestique ou gène d'intérêt) (Tableau 2), puis d'une étape de 15 secondes d'élongation et d'une étape de 15 secondes d'acquisition de la fluorescence du SYBR Green à une température au moins inférieure de 3,5°C à la température de fusion du produit d'amplification (Tableau 2). Ces étapes sont répétées 35 à 45 fois.

Au final, la taille des fragments d'ADN amplifiés d'un gène domestique (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase : *hprt*) et des gènes d'intérêt (*trpv1* et *trpv4*) obtenus est analysée par une électrophorèse sur un gel à 2 % d'agarose en comparaison à un marqueur de taille (50 pb, Sigma).

4.1.3. Quantification

La quantification des ADNc par PCR en temps réel est réalisée grâce au SYBR Green, un agent intercalant de l'ADN double brin non spécifique émettant une fluorescence à 585 nm. En exprimant la variation de la fluorescence en fonction du temps, on peut déterminer un paramètre important dans la quantification : le Ct (cycle threshold). Ce paramètre est défini comme étant le cycle d'amplification pour lequel la fluorescence atteint une valeur significativement différente de la fluorescence de base. Cette valeur est déterminée à un moment où l'amplification est dans une phase linéaire avec une efficacité maximale, d'une valeur de 2, ce qui signifie qu'un brin d'ADNc est amplifié entièrement à chaque cycle. Au préalable, l'efficacité d'amplification a été vérifiée en déterminant les Ct pour différentes concentrations en ADNc. On considère alors que l'efficacité maximale (E) est de 2 lorsqu'en doublant la concentration en ADNc, le Ct diminue d'un cycle.

4.2. Étude de l'expression protéique : la technique du Western blot

L'utilisation du Western blot nous permet d'évaluer la quantité de protéines exprimées dans les différentes conditions utilisées. Les protéines sont séparées par électrophorèse et détectées à l'aide d'anticorps primaires spécifiques. L'utilisation d'anticorps secondaires couplés à un chromophore permet de révéler les protéines d'intérêt. L'intensité de du marquage permet d'évaluer la quantité des protéines d'intérêt présente dans l'échantillon donné.

4.2.1. Extraction des protéines

Après le conditionnement à l'hypoxie ou à l'étirement, les cellules sont rincées deux fois au PBS. Après grattage, elles sont isolées par centrifugation (500 g pendant 5 minutes). Le PBS 1X est enlevé et remplacé par 100 µL de RIPA buffer (R0278, Sigma) avec des antiprotéases (P8340, 1/100, SIGMA) et de la DNase (1/100). Le mélange est incubé pendant 30 minutes dans la glace. Après sonication, le matériel insoluble est enlevé par centrifugation à 15 000 g pendant 10 minutes à 4°C, et la quantité de protéines est mesurée par la méthode de Lowry.

Après une dénaturation par la chaleur pendant 6 minutes à 90°C, 20 µg de protéines sont séparées par électrophorèse sur un gel d'acrylamide 5–2 %. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de polyfluorure de vinylidène ou PDVF (Immobilion-P, Millipore) en utilisant un transfert semi-sec electroblotter (Biorad) à 300 mA pendant 45 minutes.

4.2.2. Marquage et révélation

Les sites non spécifiques sont saturés pendant 1 heure en utilisant du PBS 1X-TWEEN 0,1 %, 5 % de BSA et 1 % de sérum de chèvre. Les membranes sont incubées toute la nuit à 4°C dans une solution d'anticorps primaires. Les membranes sont ensuite lavées avec du PBS-TWEEN 0,1 % et traitées avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à la peroxydase pendant 2 heures à température ambiante. Après plusieurs lavages au PBS-TWEEN 0,1 % les membranes sont révélées par chimioluminescence en détectant le substrat HRP (WBKLS0500, Millipore). Les immunoblots sont révélés en utilisant le système d'acquisition Fuji LAS-3000. Finalement, les membranes sont "stripées" pour être révélées par un anticorps dirigé contre la β -actine. Les images sont analysées à l'aide du logiciel

d'analyse ImageJ (NIH). L'intensité de chaque bande d'expression protéique est normalisée par rapport à l'intensité de la bande de β -actine du même puits.

5. Immunofluorescence et microscopie confocale

5.1. Marquage immunologique

Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X, puis fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4 % pendant 10 minutes à température ambiante. Après fixation, les cellules sont perméabilisées avec du PBS 1X contenant 0,5 % de triton X-100 (Dutscher) pendant 5 minutes. Puis les sites non spécifiques sont saturés avec une solution de PBS 1X contenant 5 % de BSA pendant 30 minutes. Les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS 1X avec 1 % de BSA sont incubés une heure à température ambiante. Puis les cellules sont lavées avec du PBS, et l'anticorps secondaire est incubé pendant une heure dans du PBS 1X - BSA 1 %. Après lavage au PBS, les noyaux cellulaires sont marqués grâce au DAPI (1/1000) pendant 5 minutes.

Les lamelles sont ensuite montées grâce à du milieu de montage contenant un agent anti affadissement (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako).

5.2. Acquisition des images

Les différents marquages sont ensuite visualisés à l'aide d'un microscope confocal (Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope) muni de deux objectifs, NA 1,40, Aplanachromat à immersion à huile, l'un X20 et l'autre X60.

Le fluorophore AlexaFluor 568[®] est excité à 543 nm à l'aide d'un laser hélium-néon et la fluorescence émise est filtrée à 605 ± 75 nm. D'autre part, la fluorescence de l'AlexaFluor 488[®] est excitée à 488 nm à l'aide d'un laser argon, et la fluorescence émise est filtrée à 515 ± 30 nm. Enfin, les noyaux sont révélés grâce à l'excitation du DAPI à 405 nm à l'aide d'un laser à diode et la fluorescence émise est filtrée à 450 ± 35 nm.

Toutes les images ont été obtenues à la résolution de 16 bits à l'aide du logiciel NIS-Elements et ont été analysées à l'aide du logiciel ImageJ (NIH).

5.3. Phénotypage et marquages du cytosquelette

Afin de vérifier l'homogénéité de nos cultures primaires de cellules musculaires lisses, un échantillonnage de cellules a été marqué pour des marqueurs spécifiques du muscle vasculaire. La co-expression de l' α -actine du muscle lisse (α -SMA) et de la calponine (protéine associée à l'actine intervenant dans la régulation de la contraction) au sein de la même cellule nous prouve son phénotype de cellule musculaire lisse vasculaire. L'analyse des marquages montre plus de 90 % des cellules sont positives pour l' α -SMA et la calponine (Figure 36).

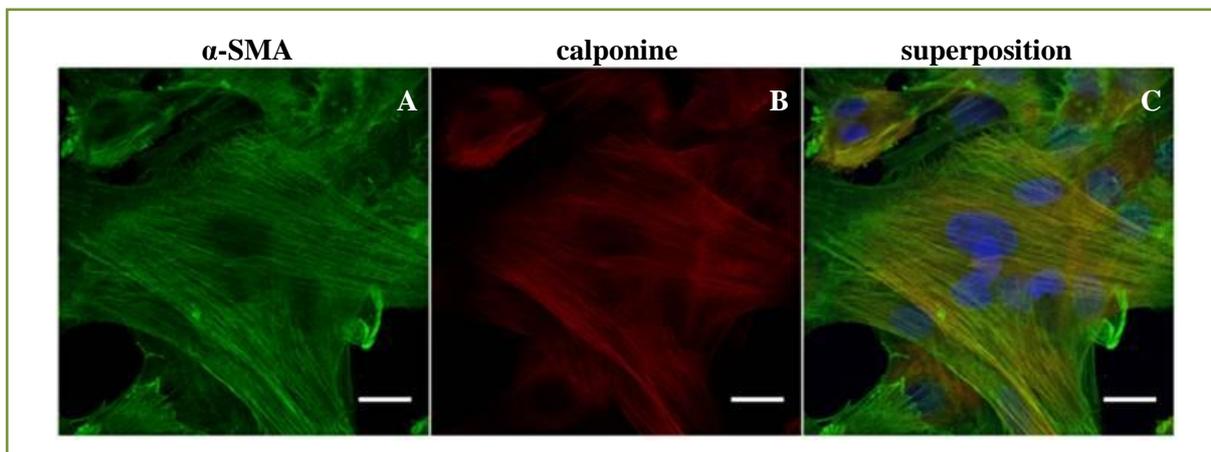


Figure 36 : Phénotypage des CMLAP.

(A) L' α -actine du muscle lisse (α -SMA) est marquée en vert, (B) la calponine est marquée en rouge. Les noyaux, en bleu, sont révélés au DAPI. (C) La co-expression des deux protéines atteste d'un phénotype musculaire lisse. La barre d'échelle représente 10 μ m.

5.4. Densité du cytosquelette

Comme le remodelage du cytosquelette va de paire avec les phénomènes intervenant lors de la migration cellulaire, nous avons évalué les modifications de la densité des "cytosquelettes d'actine, de tubuline et d'une classe de filaments intermédiaires : la vimentine".

Après le conditionnement sous atmosphère hypoxique ou normoxique, Les cellules sont marquées pour l' α -actine du muscle lisse (α -SMA), la β -tubuline ou la vimentine comme décrit précédemment (5.1 marquages immunologiques).

Les images sont analysées à l'aide du logiciel ImageJ. La densité du cytosquelette est évaluée par la mesure de la densité intégrée de la fluorescence émise par l'Alexafluor[®] 488 (c.à.d. par la fluorescence pour le marquage d'une des protéines du cytosquelette).

5.5. Mesure de la translocation nucléaire du NFAT

L'étude de la voie du NFAT a été réalisée via le suivi de la translocation nucléaire de ce dernier. Comme décrit précédemment, le NFAT est un facteur de transcription cytosolique, qui après déphosphorylation par la calcineurine (activation) est transloqué dans le noyau pour activer des gènes cibles. La détection de cette protéine au niveau nucléaire nécessite donc une méthodologie différente. Pour les expériences concernant le NFAT, les cellules sont fixées au PFA 4 % pendant 10 minutes à 37°C. Après fixation, les cellules sont perméabilisées et les sites non spécifiques sont saturés avec du PBS contenant 0,5 % de Triton X-100 (Dutscher) et 5 % de BSA pendant 45 minutes. Les anticorps primaires dilués dans une solution de PBS avec 5 % de BSA et 0,5 % de Triton X-100 sont incubés une nuit à 4°C. Puis les cellules sont lavées avec du PBS 1X, et les anticorps secondaires sont incubés pendant une heure dans du PBS BSA 5 %, 0,5 % de Triton X-100. Après lavage au PBS, les noyaux cellulaires sont marqués grâce au DAPI (1/1000) pendant 5 minutes.

Les lamelles sont ensuite montées grâce à du milieu de montage contenant un agent anti affadissement (Dako Fluorescent Mounting Medium, Dako),

Afin de déterminer le taux de translocation nucléaire du NFAT, chaque cellule observée a été analysée séparément. La cellule a été divisée en trois zones distinctes à l'aide du logiciel ImageJ. À l'aide du marquage de l' α -actine du muscle lisse, le contour de la cellule a été obtenu et a permis d'isoler la première zone : surface cellulaire totale (Figure 37). Grâce au marquage nucléaire du DAPI, la zone nucléaire a été isolée, il s'agit de la deuxième zone (Figure 37). Enfin, la troisième zone a été obtenue par soustraction de la zone nucléaire dans la zone totale, il s'agit de la zone cytoplasmique (Figure 37). Pour chaque zone, la fluorescence moyenne du canal vert, qui correspond au marquage du NFAT a été mesurée. Le taux de translocation correspond à la fluorescence du NFAT contenu dans le noyau par rapport à la fluorescence du NFAT dans le cytosol. Une augmentation significative de ce rapport reflète la translocation du NFAT dans le noyau.

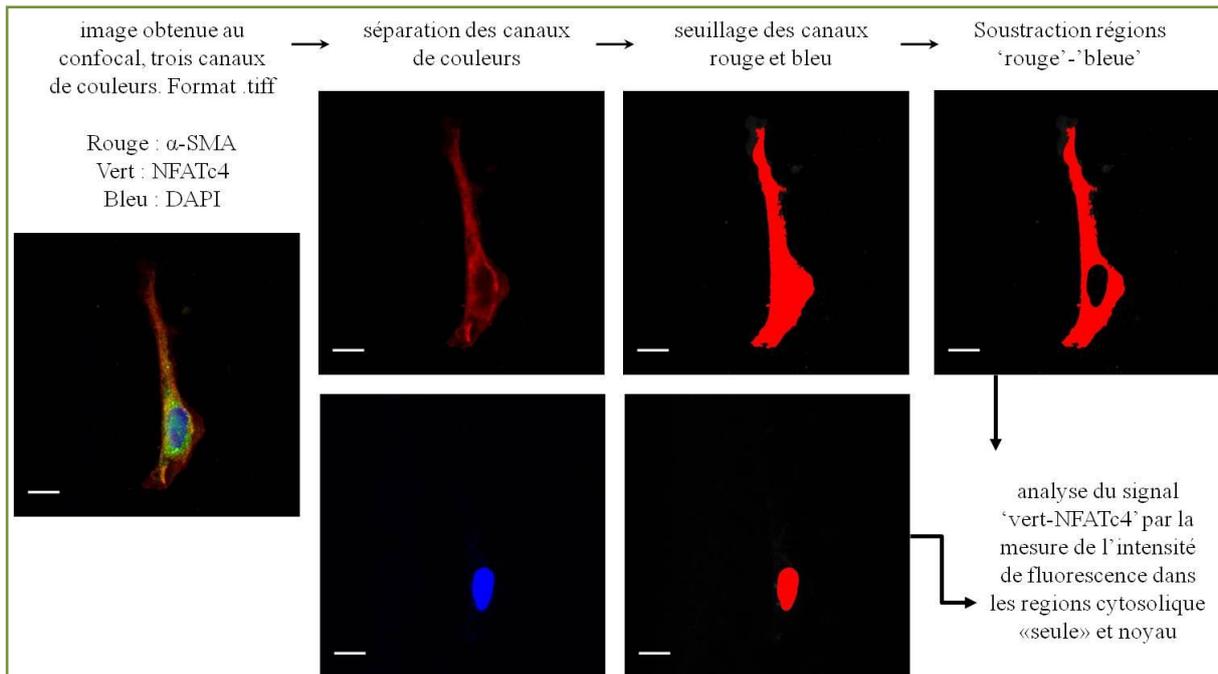


Figure 37 : Méthode d'analyse de la translocation du NFAT dans le noyau.

Pour chaque CMLAP, le marquage de l' α -SMA a servi à obtenir la région d'intérêt (ROI) : "surface cellulaire totale", le marquage du DAPI a servi à obtenir la ROI "nucléaire". La translocation nucléaire du NFATc4 a été quantifiée en calculant le rapport des intensités de fluorescence du marquage NFATc4 (Alexa-488) dans la ROI nucléaire sur la ROI surface totale - nucléaire. La barre d'échelle représente 10 μ m.

5.6. Marquages des canaux TRPV1 et TRPV4

Dans le but d'évaluer l'expression en corrélation avec la localisation de TRPV1 et TRPV4 au sein de la cellule musculaire lisse, des marquages immunofluorescents pour ces deux isoformes ont été réalisés. Le profil d'expression de TRPV1 et TRPV4 a été établi par analyse des images avec le logiciel ImageJ. Une section rectiligne traversant la cellule a été réalisée sur plusieurs cellules par condition. Le profil d'intensité de fluorescence le long de cet axe a ensuite été réalisé.

Pour les marquages de TRPV4 sur les cellules de souris, un protocole différent a été mis au point afin de préserver au mieux la structure de la membrane et la présence des protéines membranaires au sein de la membrane, et d'éviter leur internalisation. Pour cela, les cellules sont fixées pendant 90 min avec une solution de glutaraldéhyde à 0,1 % à température ambiante. Les cellules sont ensuite rincées avec une solution de NH_4 , puis au PBS. Les cellules ont ensuite été perméabilisées et les sites non spécifiques bloqués avec une solution de PBS-BSA-saponine.

5.7. Liste des anticorps utilisés

(cf. page suivante)

Anticorps primaire	Référence et fournisseur	Espèce	Dilution	Utilisation
α -actine du muscle lisse	clone 1A4 Sigma	anticorps monoclonal de souris	1/100 ^{ème}	immunofluorescence
β -actine	clone AC-74 Sigma	anticorps monoclonal de souris	1/10000 ^{ème}	western blot
β -tubuline	clone DM1A Sigma	anticorps monoclonal de lapin	1/1000 ^{ème}	immunofluorescence
vimentine	clone V9 Sigma	anticorps monoclonal de lapin	1/1000 ^{ème}	immunofluorescence
calponine 1/2/3	clone FL-297 Santa Cruz/Cliniscience	anticorps polyclonal de lapin	1/50 ^{ème}	immunofluorescence
TRPV1	AB63083 Abcam	anticorps polyclonal de lapin	1/200 ^{ème}	Immunofluorescence
TRPV1	ACC-029 Alomone	anticorps polyclonal de lapin	1/200 ^{ème}	western blot
TRPV4	AB39260 Abcam	anticorps polyclonal de lapin	1/200 ^{ème}	western blot
TRPV4 Cter	ACC-034 Alomone	anticorps polyclonal de lapin	1/50 ^{ème}	immunofluorescence
TRPV4 boucle extracellulaire	ACC-124 Alomone	anticorps polyclonal de lapin	1/25 ^{ème}	immunofluorescence
NFATc4	clone H-74 Santa Cruz/Cliniscience	anticorps polyclonal de lapin	1/100 ^{ème}	immunofluorescence
KI-67	AB 9260 Merk Millipore	anticorps polyclonal de lapin	1/200 ^{ème}	immunofluorescence

Tableau 4 : Liste des anticorps primaires utilisés.

Anticorps secondaire	Référence et fournisseur	Espèce	Dilution	Utilisation
Alexa-Fluor 568	Molecular Probe/Invitrogen	chèvre anti-souris ou anti-lapin	1/200 ^{ème}	immunofluorescence
Alexa-Fluor 488	Molecular Probe/Invitrogen	chèvre anti-souris ou anti-lapin	1/200 ^{ème}	immunofluorescence
DAPI	Sigma	-	1/1000 ^{ème}	immunofluorescence
Phalloïdine - FITC	Sigma	-	1/500 ^{ème}	immunofluorescence

Tableau 5 : Liste des anticorps secondaires et fluorochromes utilisés.

6. Mesure de la $[Ca^{2+}]_i$

6.1. Principe

L'utilisation de sondes calciques permet de réaliser des mesures dynamiques de la concentration en calcium libre intracellulaire. Une telle sonde est composée **d'une partie capable de lier un ou plusieurs ions calcium et d'une partie liée à un chromophore**. Au cours de cette étude, nous avons utilisé les sondes calciques Indo-1/AM, et Fura-PE3/AM. Ces deux sondes sont **dérivés de chélateurs de calcium EGTA et BAPTA** (Figures 38 et 40).

La fixation d'ions calcium sur ces sondes provoque un changement de conformation qui engendre des modifications des propriétés fluorescentes de la sonde. Cela se traduit par une variation de l'intensité de la fluorescence émise, mais aussi par un déplacement du spectre d'excitation ou d'émission de la sonde en question.

Un paramètre important à prendre en compte lors de l'utilisation d'une sonde calcique est sa constante d'affinité pour le calcium. La constante d'affinité est le rapport entre la constante de dissociation (K_d) (sonde non liée au calcium) et la constante d'association (K_a) (sonde liée au calcium). Cette constante est utilisée pour exprimer l'affinité d'un ligand pour son récepteur. Un faible K_d se traduit par une forte affinité pour le récepteur, c'est-à-dire qu'une faible concentration du ligand, ici le calcium, sera efficace.

Pour permettre le passage de ces sondes à l'intérieur de la cellule, une fonction acétométhyle ester (AM) a été ajoutée à la molécule. Cette fonction permet à la sonde de traverser la membrane plasmique. Une fois dans le cytosol, le groupe acétométhyle ester est clivé par des enzymes endogènes : les estérases, piégeant ainsi la sonde dans le cytosol.

Le Fura-PE3 et l'Indo-1 possèdent un fort rendement quantique, c'est-à-dire qu'ils possèdent un rapport élevé entre le nombre de photons émis et le nombre de photons absorbés ce qui en fait des sondes de choix pour réaliser de l'imagerie calcique sur des cellules uniques. Ces deux sondes constituent ce que l'on appelle des sondes ratiométriques. L'utilisation d'un ratio entre deux longueurs d'ondes d'émission (ou d'excitation) permet d'avoir le reflet de la concentration calcique intracellulaire tout en s'affranchissant des variations de fluorescence dues à des artefacts tels que des variations de concentration de la sonde calcique (dégradation, répartition hétérogène dans la cellule), des variations d'intensité de la source lumineuse ou de l'épaisseur de la cellule. L'emploi de ces deux sondes nécessite donc des systèmes de mesures adaptés détaillés dans les paragraphes suivants, du fait de l'utilisation de deux longueurs d'onde différentes (en excitation comme c'est le cas pour le Fura-PE3 ou d'émission dans le cas de l'Indo-1).

6.2. Microspectrofluorimétrie et sonde calcique Indo-1

6.2.1. Principe

L'Indo-1/AM possède une K_d par rapport au calcium de 250 nM. C'est une sonde dite à simple excitation et à double émission. L'excitation se fait à une longueur d'onde unique à 355 nm et la fluorescence émise est séparée en deux faisceaux dont l'un est filtré à 405 nm et l'autre à 480 nm. La liaison de quatre ions Ca^{2+} à cette sonde s'accompagne à la fois d'une variation de l'intensité de sa fluorescence, mais également d'un déplacement de son spectre d'émission. Il y a une diminution du spectre à 480 nm (forme libre de la sonde) et une augmentation du spectre à 405 nm qui correspond à la forme liée au calcium, sans modification du spectre d'excitation (355 nm). Le ratio des longueurs d'ondes émises permet d'avoir un reflet de la concentration calcique intracellulaire.

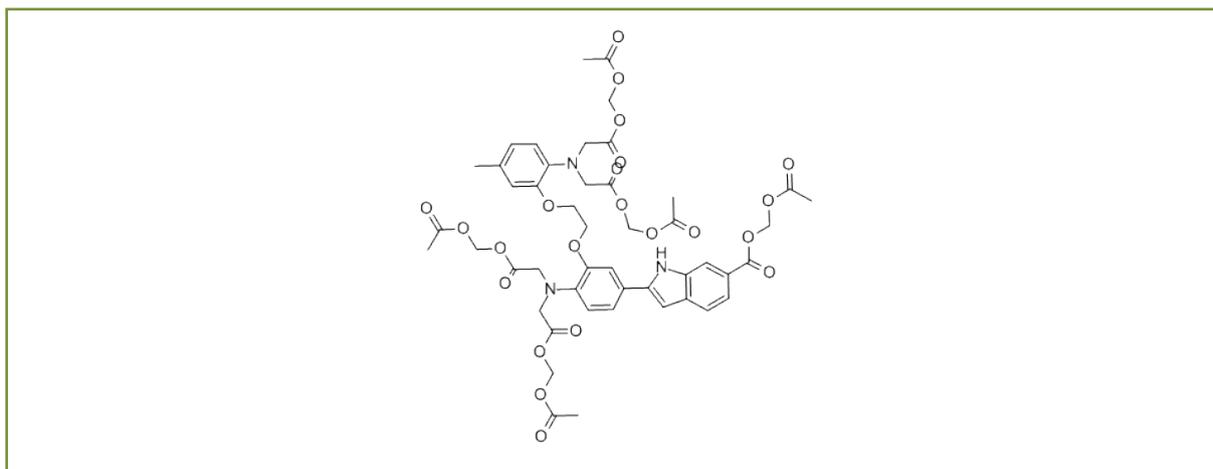


Figure 38 : Structure de la sonde Indo-1/AM.

6.2.2. Procédure expérimentale

Les cellules cultivées sur lames de verre sont incubées avec 5 μ M d'Indo-1/AM dans une solution de Krebs-HEPES 2 mM Ca^{2+} pendant 30 minutes à 37°C à l'abri de la lumière afin de permettre à la sonde de traverser la membrane plasmique et aux estérases de libérer la sonde active. Puis les cellules sont rincées avec une solution de Krebs-HEPES 2 mM Ca^{2+} afin d'éliminer l'excédant d'Indo-1 et placées dans du Krebs durant toute la durée de l'expérimentation.

Les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé à épifluorescence (Nikon Diophot). La lumière d'excitation est fournie par une lampe à mercure de 100 W et est atténuée grâce à un filtre neutre pour éviter une photolyse trop rapide de la sonde. La longueur d'onde d'excitation est filtrée à 355 nm puis reflétée vers la préparation par un miroir dichroïque de 380 nm. Une partie de la fluorescence émise est captée par l'objectif (à immersion à huile X40), puis retransverse le miroir dichroïque à 380 nm avant d'arriver sur un second miroir dichroïque à 455 nm. La lumière reflétée à 455 nm est filtrée à 405 nm, tandis que la lumière traversant le miroir est filtrée à 480 nm. L'intensité de fluorescence aux deux longueurs d'onde d'émission ainsi séparée est mesurée et convertie en variation de potentiel par deux photomultiplicateurs. Les signaux sont recueillis par un diviseur analogique qui donne en continu le rapport de la fluorescence à 405 nm et à 480 nm permettant ainsi une estimation de la concentration calcique intracellulaire selon l'équation de Grynkiewicz [303].

$$\text{Équation de Grynkiewicz : } [Ca^{2+}]_i = (Kd.\beta) \times \frac{R-Rmin}{Rmax-R}$$

Kd : constante de dissociation de l'Indo-1/AM (250 nM d'après Grynkiewicz),
 β : rapport du signal de fluorescence en l'absence de Ca^{2+} et à saturation de Ca^{2+} pour $\lambda_{480\text{ nm}}$,
 Rmin : rapport F_{405}/F_{480} mesuré en absence de Ca^{2+} ,
 Rmax : rapport F_{405}/F_{480} mesuré en présence d'une concentration de Ca^{2+} saturante.

Les cellules sont stimulées par l'éjection de l'agent pharmacologique choisi grâce à une micropipette obtenue par étirement d'un capillaire en verre à l'aide d'une étireuse verticale (PC-10 Narishige) et grâce à un système d'éjection pneumatique (Picospitzer). Pour l'activation des SAC, les cellules ont été stimulées par l'éjection d'une solution de Krebs hypotonique (Tableau 3). Cette solution provoque un flux d'eau entrant dans la cellule, la faisant gonfler et activant ainsi les canaux sensibles à l'étirement.

6.2.3. Analyse des résultats

Chaque tracé obtenu est analysé à l'aide du logiciel Origin 6.0 (Microcal). La $[Ca^{2+}]_i$ basale est mesurée, l'amplitude de la réponse calcique enregistré, ainsi que la pente de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ (Figure 39).

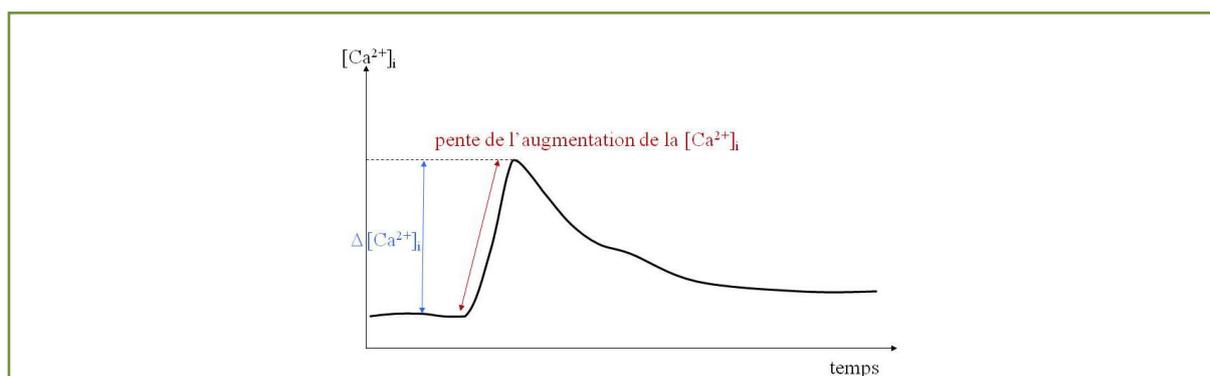


Figure 39 : Analyse des réponses calciques.

Représentation d'une réponse calcique d'une CMLAP suite à une stimulation. Pour chaque réponse, la valeur basale (A), l'amplitude (B) de la réponse, ainsi que la pente de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ ont été mesurés.

6.3. Imagerie calcique et sonde calcique Fura-PE3

6.3.1. Principe

La mesure de la $[Ca^{2+}]_i$ sur les chambres étirables en silicone via l'utilisation de la sonde Indo-1 n'était pas réalisable car la fluorescence émise cette dernière ne traversait pas la membrane. Nous avons donc utilisé une autre sonde calcique qui possède des longueurs d'onde d'excitation et d'émission différentes. Le Fura-PE3/AM possède un K_d par rapport au calcium de 140 nM. C'est une sonde dite à double excitation et à simple émission. Le Fura-PE3/AM est excité à deux longueurs d'onde (à 340 nm et à 380 nm) et émet une fluorescence à une longueur d'onde unique (à 510 nm) indépendamment de la présence de calcium ou non. En présence de calcium, la fluorescence émise suite à l'excitation à 340 nm (F_{340}) est augmentée, alors que la fluorescence émise suite à l'excitation à 380 nm (F_{380}) est diminuée. La mesure du rapport de fluorescence F_{340}/F_{380} permet donc d'avoir le reflet de la concentration en calcium intracellulaire. Les mesures en Fura-PE3 nécessitent un appareillage

de changement continu de filtres excitateurs ou de monochromateurs pour effectuer les deux excitations à 340 nm et 380 nm. Les expériences réalisées en Fura-PE3 sont donc limitées en terme de résolution temporelle en raison du changement continu des filtres d'excitations.



6.3.2. Procédure expérimentale

Les cellulesensemencées sur les chambres étirables en silicone (B-bridge international) sont incubées pendant 30 minutes à 37°C dans une solution de Krebs-HEPES 2 mM de Ca²⁺ contenant 5 µM de FURA-PE3/AM. Puis les cellules sont rincées à l'aide d'une solution de Krebs pendant 30 minutes supplémentaires. Les cellules sont excitées alternativement à 340 nm et à 380 nm pendant 800 et 400 millisecondes respectivement, grâce à une roue à filtres (Sutter Instruments) pilotée par ordinateur via le logiciel d'acquisition Metafluor (Ropper Scientific). La source lumineuse est une lampe au Xénon de 100 W, la lumière incidente traverse les filtres de la roue à filtres, puis est réfléchiée sur la préparation grâce à un miroir dichroïque, et seules les longueurs d'onde de 510 ± 23 nm vont être sélectionnées grâce à un filtre. Ce signal va alors être capté et enregistré par une caméra CCD (Coolsnap fx Monochrome, Photometrics) et l'acquisition des images est réalisée toutes les 5 secondes à une résolution de 16 bits et 1030 x 1030 pixels. Les informations sont alors transmises à un ordinateur et l'acquisition se fait avec le logiciel Metafluor (Ropper Scientific). Les cellules sont stimulées par adjonction du composé pharmacologique directement dans la chambre en silicone à l'aide d'une pipette.

6.3.3. Analyse des résultats

Les intensités de fluorescence émises suite aux excitations à 340 nm et 380 nm sont mesurées au niveau d'un champ de cellules choisies aléatoirement. Ces intensités sont corrigées en soustrayant le bruit de fond, puis le rapport des deux intensités de fluorescence corrigées est réalisé.

Chaque tracé obtenu est analysé à l'aide du logiciel Origin 6.0 (Microcal). De la même manière que pour l'Indo-1 (Figure 39), on mesure les ratios 340/380 nm en conditions basales (ratio basal), ainsi que le pic de la réponse (lors de l'ajout de l'agoniste de TRPV4, ou lors de la vidange des stocks calciques). La différence entre ces deux ratios donne l'amplitude de la réponse exprimée en delta ratio 340/380 nm mettant ainsi en évidence les variations de calcium induit par la stimulation choisie.

7. Le patch-clamp

7.1. Principe

Décrite par Hamill [304], la technique du patch-clamp (pour patch : fragment de membrane et clamp : maintien) permet de mesurer l'intensité des courants ioniques qui traversent les membranes cellulaires. Cette technique consiste à mettre en contact une pipette en verre remplie d'une solution ionique (conductrice) avec une membrane cellulaire contenant des canaux ioniques. La pipette est connectée à un amplificateur, permettant d'enregistrer des amplitudes de courants de l'ordre du picoampère (pA).

Le principe repose sur la loi d'Ohm $U = R.I$, où U est la tension (potentiel), R la résistance et I le courant. Cette relation est plus souvent notée $I = U \cdot G$, où G est la conductance ($G = 1/R$).

Dans cette étude, cette technique est utilisée en mode voltage clamp ou potentiel imposé, c'est-à-dire que grâce à l'amplificateur connecté à la pipette, on peut imposer le potentiel (tension) de notre système et mesurer le courant I . Dans ce mode, la tension U est donc maintenue constante. Les variations de I dépendent donc directement de G , la grandeur d'intérêt puisqu'elle dépend directement des propriétés intrinsèques du canal : elle représente la facilité avec laquelle les ions traversent le pore du canal membranaire.

Lorsqu'un canal s'ouvre suite à un stimulus, la résistance diminue (donc la conductance augmente), et un courant d'ions I se crée à travers ce canal. Plus le flux d'ions traversant la membrane est important, plus le courant généré est important. Le flux des ions dépend du gradient électrochimique ($V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}}$). Ce gradient électrochimique est en réalité la différence de potentiel entre le potentiel imposé par l'expérimentateur via l'amplificateur (voltage imposé) et le potentiel d'équilibre de l'ion (E_{ion}) donné par l'équation de Nernst. Ce courant est obtenu grâce à la loi d'Ohm modifiée : $(V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}}) = R \cdot I$, donc $I = G \cdot (V_{\text{imposé}} - E_{\text{ion}})$. Ce courant est alors amplifié, mesuré et visualisé par ordinateur à l'aide du logiciel Clampex.

Il existe quatre configurations de patch-clamp (Figure 41).

$$\text{Équation de Nernst : } E_{\text{ion}} = -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{[\text{ion}]_{\text{intracellulaire}}}{[\text{ion}]_{\text{extracellulaire}}}$$

R est la constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J.mol.K}^{-1}$),
 T est la température en Kelvin,
 F la constante de Faraday ($96\,485 \text{ C.mol}^{-1}$),
 Z la valence de l'ion (nombre de charges portées par l'ion).

7.2. Configuration "cellule attachée"

En configuration "cellule attachée" ou "cell attached" en anglais, la micropipette en verre est appliquée directement sur la membrane de la cellule. On peut mesurer ainsi les courants qui traversent la membrane grâce à l'ouverture des canaux situés au niveau de cette portion de membrane. Dans cette méthode non invasive, le milieu interne de la cellule est conservé ainsi que toutes les interactions du canal d'intérêt avec les protéines intracellulaires. Cette méthode permet d'enregistrer des courants unitaires, due à l'ouverture d'un seul canal.

L'activation des canaux SAC a été obtenue en appliquant une dépression rapide et de façon reproductible à l'intérieur de la pipette de patch avec un saut de 0 à -60 mmHg en utilisant un **système de d'étirement High Speed Pressure Clamp** (Clampex HSPC-1 ; ALA-scientific).

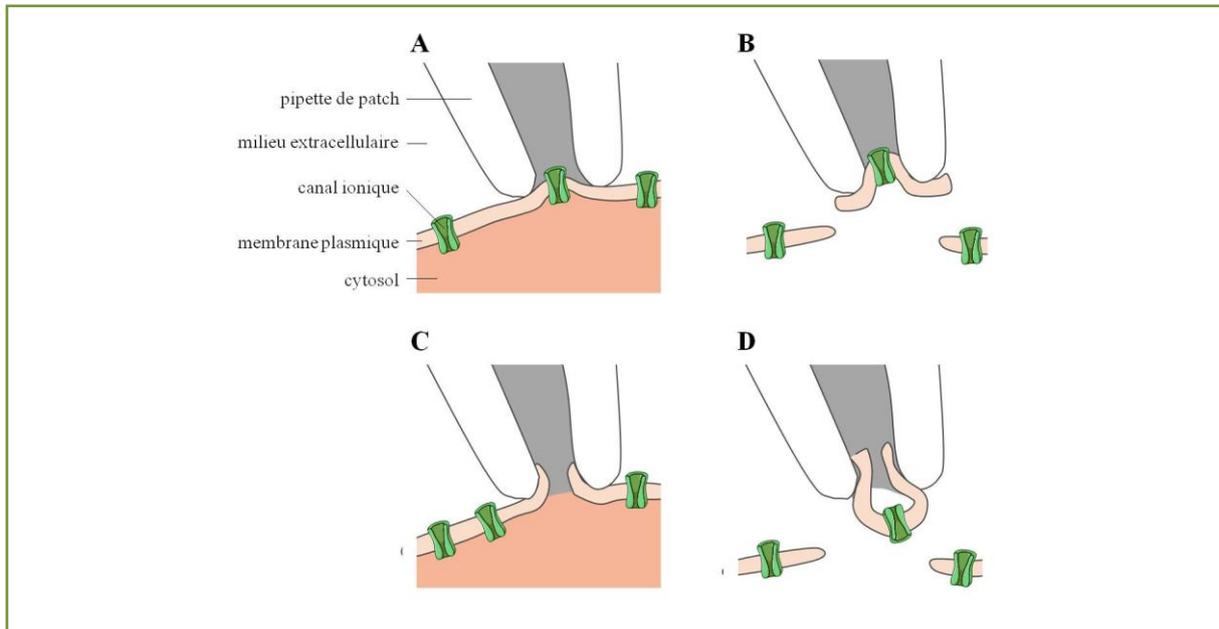


Figure 41 : Les différentes configurations en patch-clamp.

(A) Configuration cellule attachée (cell attached en anglais),

(B) Configuration "inside-out",

(C) configuration cellule entière (whole cell en anglais),

(D) Configuration "outside-out".

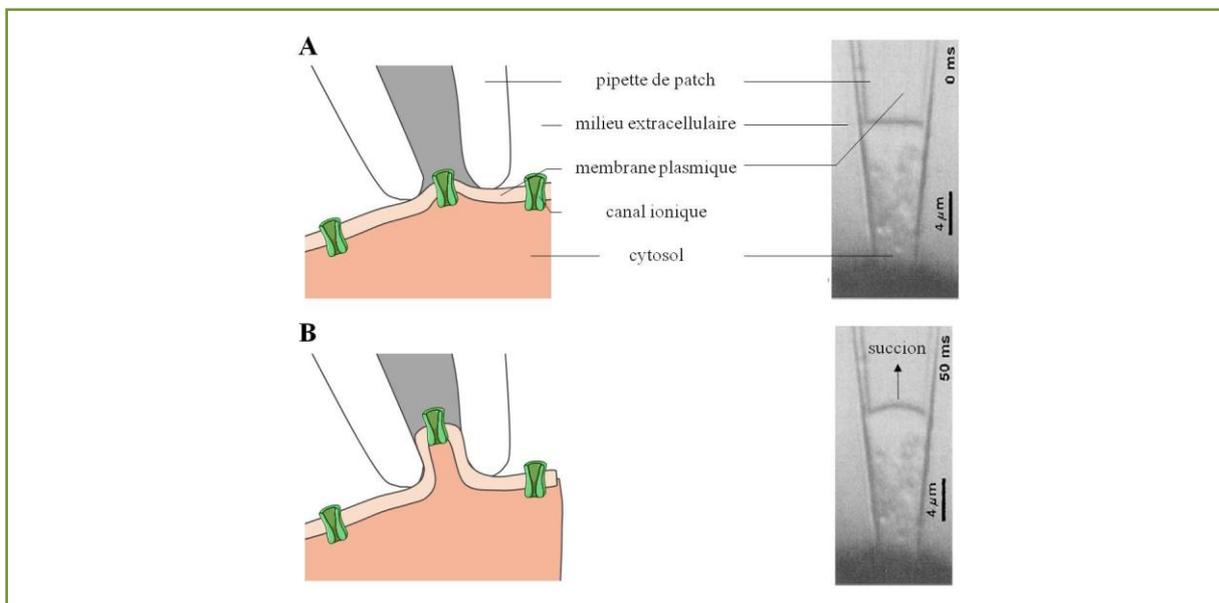


Figure 42 : Schémas de la configuration cellule attachée et de l'étirement membranaire.

(A) Représentation schématique et photographie de la configuration cellule attachée. (B) Un étirement de la membrane est appliqué à travers la pipette de patch, induisant une déformation de la membrane plasmique. Photographies d'après [305].

7.3. Configuration "cellule entière"

En configuration "cellule entière" ou "whole cell" en anglais, la pipette de verre est au contact de la cellule de la même manière qu'en configuration cellule attachée, cependant le fragment de membrane sous la pipette est rompu (à l'aide d'une aspiration) afin de mettre en continuité l'intérieur de la cellule avec l'intérieur de la pipette. Ainsi, on mesure l'activité macroscopique de l'ensemble des canaux cellulaires.

8. Étude de l'alignement cellulaire

Après trois jours d'ensemencement des CMLAP de souris, les chambres étirables sont soumises à un étirement dans les conditions précédemment décrites. L'implication des canaux TRP est étudiée avec des chambres étirables incubées 30 minutes à 37°C avec des inhibiteurs pharmacologiques, préalablement à l'étirement. Les chambres étirables sont lavées au PBX 1X et les cellules sont fixées au PFA 4 % pendant 10 minutes à température ambiante. Les cellules sont ensuite perméabilisées et les sites de liaisons aspécifiques saturés avec une solution de blocage contenant du PBS 1X, du Triton X-100 (0,25 %) et de la BSA (5 %) pendant 30 minutes à température ambiante. L'actine fibrillaire est marquée par la phalloïdine pendant une heure (10 ng/mL, Sigma) diluée au 1/200^{ème} couplée au fluorochrome FITC (fluorescéine isothoncyanate). La visualisation est réalisée par microscopie confocale décrite précédemment. Chaque chambre est orientée de la même façon sur la platine du microscope, afin de mesurer l'alignement cellulaire par rapport à l'axe d'étirement.

Pour chaque condition, quatre à cinq champs par chambre sont évalués, avec approximativement 20 à 30 cellules par champ. À partir des images enregistrées avec le logiciel EZ-C1 3.91, l'angle entre l'axe longitudinal des cellules et l'axe d'étirement est mesuré grâce au logiciel ImageJ. Les CMLAP formant un angle par rapport à l'axe d'étirement de $90 \pm 30^\circ$, sont considérées comme étant alignées. Cette méthode est inspirée de l'étude de Charles K. Thodeti [306].

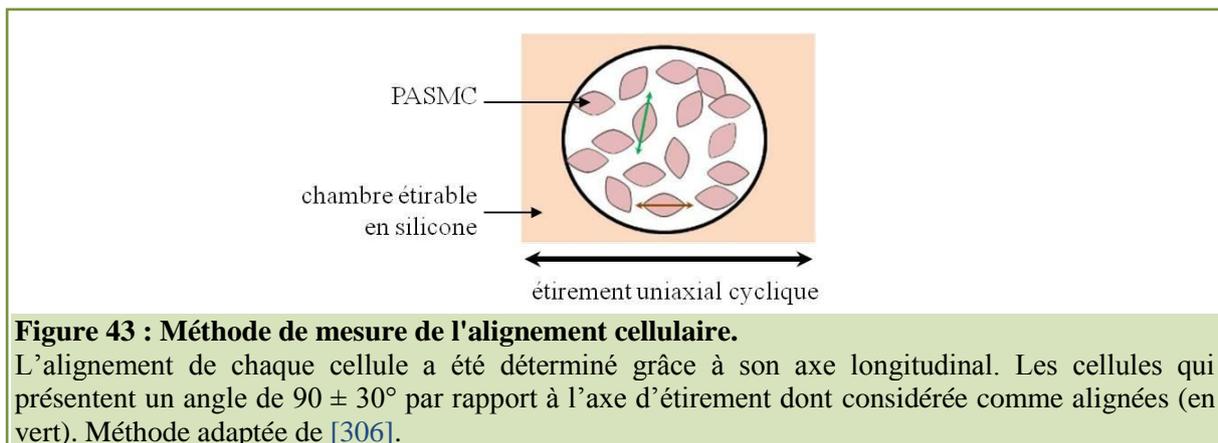


Figure 43 : Méthode de mesure de l'alignement cellulaire.

L'alignement de chaque cellule a été déterminé grâce à son axe longitudinal. Les cellules qui présentent un angle de $90 \pm 30^\circ$ par rapport à l'axe d'étirement sont considérées comme alignées (en vert). Méthode adaptée de [306].

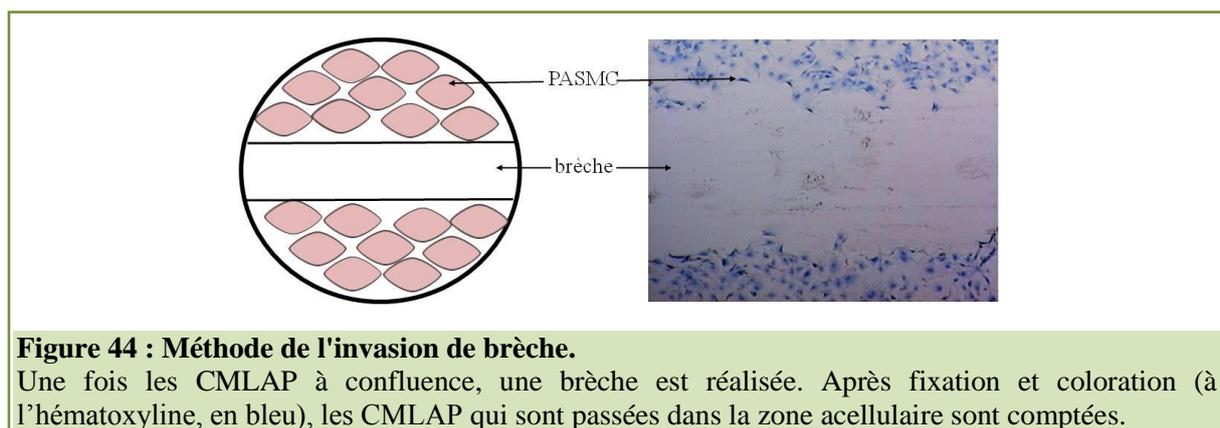
9. Étude de la migration cellulaire

Deux techniques différentes ont été utilisées pour mesurer la migration des CMLAP. Tout d'abord, la technique de l'invasion de brèche nous a permis d'évaluer la migration suite au conditionnement à l'hypoxie. Comme les brèches n'étaient pas réalisables sur les membranes en silicone, nous avons effectué un suivi en "time-lapse" des CMLAP afin d'évaluer la migration suite au conditionnement à l'étirement.

9.1. Technique de l'invasion de brèche

La technique de l'invasion de brèche est une technique simple à mettre en œuvre *in vitro* et qui permet de quantifier la migration cellulaire en 2D. Le principe repose sur la capacité des cellules à "réparer" une lésion *in vitro*. Une "brèche" ou lésion est réalisée sur une monocouche de cellules, puis différentes images sont prises à partir du moment où la brèche a été réalisée, à intervalles réguliers durant la migration cellulaire qui intervient pour réparer la brèche. Les images sont ensuite comparées afin de déterminer le taux de migration cellulaire.

Pour cela, les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 35 mm jusqu'à confluence. Après une incubation de 24 heures dans un milieu sans sérum, une brèche est réalisée à l'aide d'un cône de pipette afin d'obtenir une aire dépourvue de cellules. Les cellules sont ensuite conditionnées en atmosphère normoxique ou hypoxique. Après 24 heures supplémentaires, les agonistes et/ou antagonistes spécifiques sont ajoutés. Après 24 heures supplémentaires, les cellules sont fixées au méthanol et marquées en bleu à l'hémotoxyline pendant 20 minutes. Les puits sont rincés à l'eau. Des images sont prises aux deux bords de la brèche. Quatre images sont prises à des positions distinctes de la brèche à l'aide d'un microscope droit avec un objectif X40. Les images sont acquises avec le logiciel Quancoul et analysées en comptant les cellules qui ont migré dans la zone acellulaire.



9.2. Vidéo-microscopie

La vidéo-microscopie en "time-lapse" a été utilisée pour évaluer la migration des CMLAP. Les cellules ont été ensemencées sur des membranes étirables en silicone et conditionnées ou non à l'étirement (10 ou 20 % de la longueur initiale, 1 Hz, pendant 24 heures). Puis les cellules ont été filmées (avec une acquisition d'une image toutes les 10 minutes) à l'aide d'un microscope Nikon TE2000 inversé et d'un objectif X 10 sur une période de 24 heures sous une atmosphère humide à 37°C. Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra Nikon DXM 1200F et du logiciel d'acquisition LUCIA 5.0. Puis les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ (NIH) et le plugin "Cell tracker" (plugin réalisé à l'Institut Curie par Fabrice Cordelière). La distance euclidienne (c.à.d. la distance absolue entre le point de départ de la cellule et son point d'arrivée), la distance accumulée (c.à.d. la distance réellement parcourue par la cellule) (Figure 45), la vitesse et la direction sont mesurées sur une série d'images consécutives correspondantes à 10 heures d'enregistrement. Toutes les trajectoires de chaque cellule ont été mesurées en établissant le point d'origine (0,0) au point de départ de la cellule.

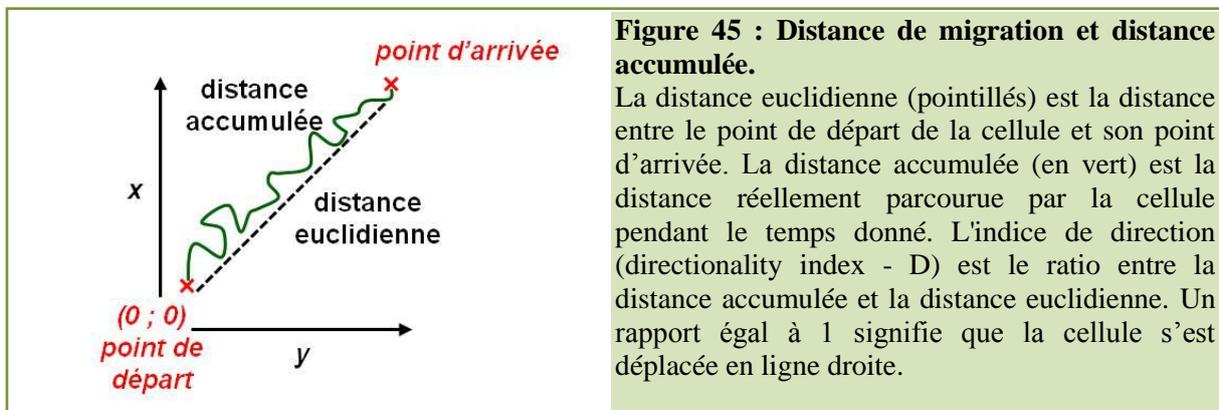


Figure 45 : Distance de migration et distance accumulée.

La distance euclidienne (pointillés) est la distance entre le point de départ de la cellule et son point d'arrivée. La distance accumulée (en vert) est la distance réellement parcourue par la cellule pendant le temps donné. L'indice de direction (directionality index - D) est le ratio entre la distance accumulée et la distance euclidienne. Un rapport égal à 1 signifie que la cellule s'est déplacée en ligne droite.

10. Étude de la prolifération cellulaire

De la même manière que pour l'évaluation de la migration, deux techniques ont été utilisées au cours de cette thèse pour mesurer l'impact des conditionnements hypoxique et mécanique sur la prolifération cellulaire. L'incorporation de BrdU a été utilisée sur les CMLAP de rat après conditionnement à l'hypoxie. La lecture de ce test colorimétrique n'était pas adaptable sur les chambres étirables en silicone, nous avons donc évalué la prolifération cellulaire à l'aide du marqueur KI-67 par immunofluorescence.

10.1. Technique d'incorporation du BrdU

L'impact sur la prolifération cellulaire est évalué de manière indirecte. La méthode d'incorporation du BrdU (bromodésoxyuridine) évalue en réalité la quantité de cellules en état de synthèse d'ADN (phase S du cycle cellulaire). On admet alors qu'en mesurant le taux d'incorporation du BrdU, c'est-à-dire la proportion de cellules en phase S, on mesure la proportion de cellules qui sont rentrées dans le cycle cellulaire (et ne sont plus en phase de quiescence) et sont donc en phase de prolifération/division cellulaire. Cette technique utilise un analogue de la thymidine, le BrdU qui va s'intégrer dans l'ADN génomique au cours de la phase S du cycle cellulaire.

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits à une concentration de 5000 cellules par puits. Après 24 heures, les cellules sont placées dans du DMEM sans sérum afin de les synchroniser (toutes les cellules sont dans la même phase du cycle cellulaire). Après ce temps d'incubation, les cellules sont conditionnées et ou stimulées dans du milieu DMEM avec 0,2 % de SVF (concentration de sérum minimale permettant d'avoir des cellules viables sans induire de prolifération).

Après 24 heures de stimulation, la synthèse d'ADN est mesurée à l'aide d'incorporation de BrdU (Roche Diagnostic). Les CMLAP sont marquées avec le BrdU (10 μ M) pendant 2 heures à 37°C à l'abri de la lumière, puis fixées et dénaturées par une solution alcoolisée (Solution Fix-dénat, Roche Diagnostic) pendant 30 minutes à température ambiante. Le BrdU incorporé est révélé par un anticorps couplé à la peroxydase pendant 90 minutes, à température ambiante. Après trois rinçages au PBS, une solution substrat de la peroxydase (tétraméthylbenzidine, TMB, Roche Diagnostic) permet une révélation colorimétrique de l'anti-BrdU grâce à un lecteur de microplaques à 380 nm avec une longueur de référence à 490 nm (EL808, Bio-Tek Instrument). Trois réplicas pour chaque condition ont été réalisés.

10.2. Suivi du marqueur KI-67

La protéine KI-67 est un marqueur de cellule en prolifération décrit par Gerdes en 1983 [307]. Il s'agit d'un antigène présent sur une protéine nucléaire de 360 kDa présente dans les cellules prolifératives.

Après marquage immunofluorescent, les cellules sont observées au microscope confocal à l'aide d'un objectif X20 à immersion à huile. Un minimum de trois acquisitions par condition est effectué. Les images sont ensuite analysées à l'aide du logiciel ImageJ. Une cellule en condition non proliférante présente une absence de marquage pour le KI-67, alors qu'une cellule en prolifération présente un marquage KI-67 nucléaire.

Le nombre de cellules présentant un marquage KI-67 nucléaire est compté. Le pourcentage de prolifération est évalué en comptant le nombre de cellules en prolifération par rapport au nombre total de cellules.

11. Étude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est évaluée avec le test colorimétrique de cytotoxicité Wst-1. Ce test est basé sur le clivage des sels de tétrazolium Wst-1(4-(3-(4-Iodophenyl)-2H-5-tetrazolio)-1,3-benzènesulfonate) incolores par des déshydrogénases de la chaîne respiratoire des mitochondries des cellules vivantes (Figure 46). Sous l'action de ces enzymes, un dérivé formazan soluble de coloration jaune est obtenu, quantifiable par spectrophotométrie à 450 nm.

Les cellules sontensemencées dans une plaque 96 puits (5000 cellules par puits) dans un milieu DMEM supplémenté avec 10 % de SVF pendant 24 heures sont déposées dans des plaques 96 puits. Elles sont ensuite placées pendant 24 heures dans du milieu DMEM 0 % de sérum afin de les synchroniser. Après ce temps d'incubation, les cellules sont stimulées avec l'agoniste spécifique dilué dans du milieu DMEM 0,2 % SVF. Après 24 heures de stimulation, 10 µL de Wst-1 sont ajoutés et l'absorbance de chaque puits est mesurée 2 heures plus tard par un lecteur Elisa réglé sur une longueur d'onde de 450 nm. Trois réplicas ont été réalisés pour chaque condition.

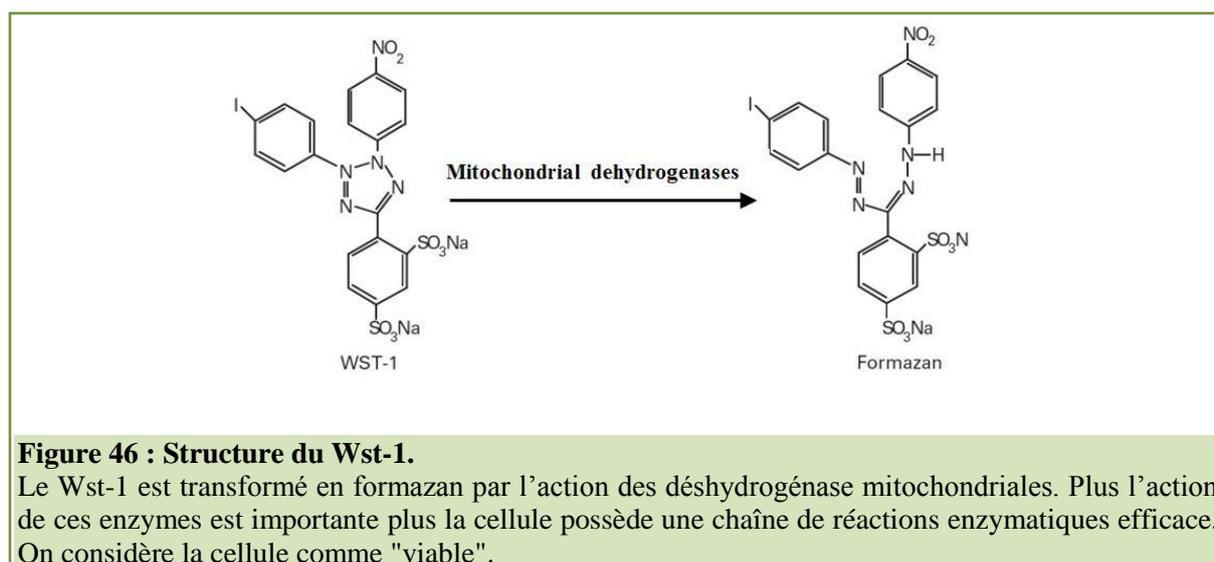


Figure 46 : Structure du Wst-1.

Le Wst-1 est transformé en formazan par l'action des déshydrogénase mitochondriales. Plus l'action de ces enzymes est importante plus la cellule possède une chaîne de réactions enzymatiques efficace. On considère la cellule comme "viable".

12. Liste des agonistes, antagonistes et inhibiteurs utilisés

Nom	Fournisseur	Cible	Concentration finale utilisée
capsaïcine	Sigma	agoniste de TRPV1	10 μ M
résinafératoxine (RTX)	Tocris	agoniste de TRPV1	100 nM
capsazépine	Sigma	antagoniste de TRPV1	10 μ M
probenécide	Sigma	agoniste TRPV2	1 μ M
tranilast	Sigma	antagoniste TRPV2	10 μ M
4 α -PDD	Sigma	agoniste de TRPV4	5 μ M
GSK 1016790A	Sigma	agoniste de TRPV4	1 μ M
HC067047	Tocris	antagoniste de TRPV4	5 μ M
GsMTx-4	PeptaNova	inhibiteurs des SAC	5 μ M
streptomycine	Gibco	inhibiteurs des SAC	200 μ M
rouge de ruthénium	Sigma	inhibiteur des TRPV	10 μ M
sérotonine (5-HT)	Sigma	agoniste des récepteurs 5-HT	10 μ M
acide cyclopiazonique (CPA)	Sigma	inhibiteur des pompes SERCA	10 μ M
thapsigargine		inhibiteur des pompes SERCA	1 μ M
cyclosporine A (CsA)	Cell signaling	inhibiteur de la calcineurine	1 μ M
BAPTA-AM	Sigma	chélateur de calcium	5 μ M

Tableau 6: Liste des agonistes, antagonistes et inhibiteurs utilisés.

13. Analyse statistique des résultats

Les résultats sont exprimés en moyenne \pm erreur standard de la moyenne (SEM). "n" indique le nombre de cellules utilisées pour les différentes études. "N" indique le nombre de rats ou de souris utilisés.

Pour comparer les moyennes, des tests non paramétriques (Mann-Whitney en cas de comparaison de 2 groupes, Kruskal-Wallis en cas de comparaison de plus de 2 groupes) et paramétriques ANOVA (suivi d'un test post-hoc de Dunnet) ont été utilisés à l'aide du logiciel GraphPad – Prism 5.01[®]. Un test du χ^2 a été utilisé pour comparer les proportions de cellules répondant à une stimulation, ou les proportions de cellules en prolifération entre les différentes conditions. Les différences sont considérées comme significatives quand $p < 0,05$. * indique une différence significative pour $p < 0,05$; ** pour $p < 0,01$ et *** pour $p < 0,001$.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

1. Avant-propos

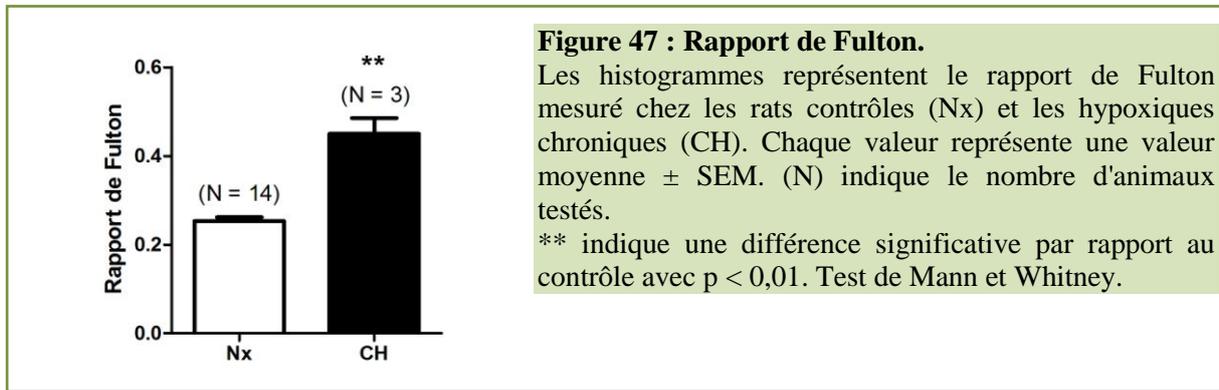
Dans le contexte de l'HTP, il est désormais établi que **l'activité des SAC est augmentée dans les CMLAP**. En effet, plusieurs études menées au laboratoire et par d'autres groupes montrent une augmentation de la réponse calcique médiée par les canaux SAC [47, 250, 299]. De nombreux canaux TRP possèdent une activité mécanosensible et de nombreuses études ont montré leur implication dans la circulation pulmonaire, et plus particulièrement dans les CMLAP. Un grand nombre d'études concerne les canaux TRPC1 et TRPC6, deux isoformes mécanosensibles. Leur expression, ainsi que leur activité sont augmentées dans les CMLAP issues des modèles animaux d'HTP (rats hypoxiques chroniques et "monocrotaline") et de patients HTAP. Cependant, comme décrit dans la section "Introduction - canaux TRP et hypertension pulmonaire", ces deux isoformes ne suffisent pas à elles seules à expliquer la survenue d'une HTP. En effet, les modèles animaux qui possèdent un défaut d'expression de TRPC1 ou de TRPC6 présentent quand même un remodelage artériel [257, 258].

Le grand nombre de canaux TRP exprimés dans la circulation pulmonaire, ainsi que leur caractère polymodal, leur capacité à s'associer et à former des hétérotétramères nous permettent de penser que d'autres isoformes pourraient être impliquées dans le développement de l'HTP. Nous avons décidé de centrer cette étude sur les isoformes TRPV1, V2 et V4. En effet, ces isoformes sont non seulement mécanosensibles, mais elles font également partie des isoformes les plus exprimées dans les CMLAP [248]. L'isoforme TRPV4 participe à la contraction induite par la 5-HT [296, 297]. De plus, les travaux du groupe du Pr Sham et du notre ont montré que cette isoforme était surexprimée dans les CMLAP de rats hypoxiques chroniques [103, 296]. L'étude des isoformes TRPV1 et TRPV2 apporte un caractère plus novateur. À ce jour, peu de travaux concernent ces isoformes dans le contexte de l'HTP. Cependant, des résultats préliminaires montrent une surexpression de l'isoforme TRPV1 chez les animaux hypoxiques chroniques, mais pas de l'isoforme TRPV2 (Figure 49).

En utilisant le modèle du rat hypoxique chronique, nous avons ciblé les isoformes TRPV1, TRPV2 et TRPV4. L'évaluation des réponses calciques induites par l'activation de chacun de ces canaux en conditions normales et pathologiques nous a permis de déterminer quelles isoformes étaient affectées par l'HTP induite par une hypoxie chronique.

1.1. Utilisation du modèle du rat hypoxique chronique

Les cœurs des animaux soumis à trois semaines d'hypoxie ont un rapport de Fulton significativement augmenté par rapport aux rats contrôles : $0,45 \pm 0,04$ (N = 3) et $0,25 \pm 0,009$ (N = 3) respectivement (Figure 47). Cette hypertrophie cardiaque droite valide l'état hypertendu des animaux hypoxiques chroniques.



1.2. Effet de l'hypoxie chronique sur la réponse calcique induite par l'activation des canaux TRPV1, V2 et V4

Les réponses calciques induites par l'activation de ces trois isoformes (TRPV1, V2 et V4) ont été étudiées par microspectrofluorimétrie à l'aide de la sonde Indo-1/AM. L'ajout de capsaïcine (10 μ M), agoniste de TRPV1, sur des cellules musculaires lisses fraîchement dissociées déclenche une réponse qui est significativement augmentée dans les cellules issues de rats hypoxiques chroniques. L'amplitude de la réponse passe de $120,5 \pm 8$ nM ($n = 35$) à $152,9 \pm 7,7$ nM ($n = 48$) (Figure 48). A l'inverse l'ajout de probénécide (1 μ M), agoniste des TRPV2, permet d'obtenir une réponse calcique, mais celle-ci n'est pas amplifiée dans les cellules issues de rats hypoxiques chroniques. On observe une amplitude de $136,3 \pm 9,8$ nM ($n = 29$) dans les cellules contrôles et une amplitude de $132,2 \pm 9,5$ nM ($n = 45$) dans les cellules issues de rats hypoxiques chroniques (Figure 48). Enfin, comme cela est montré dans l'étude de D. Dahan réalisée au laboratoire, les réponses induites par la stimulation au 4 α -PDD (5 μ M), agoniste de TRPV4, sont significativement augmentées dans les CMLAP issues de rats hypoxiques chroniques [103].

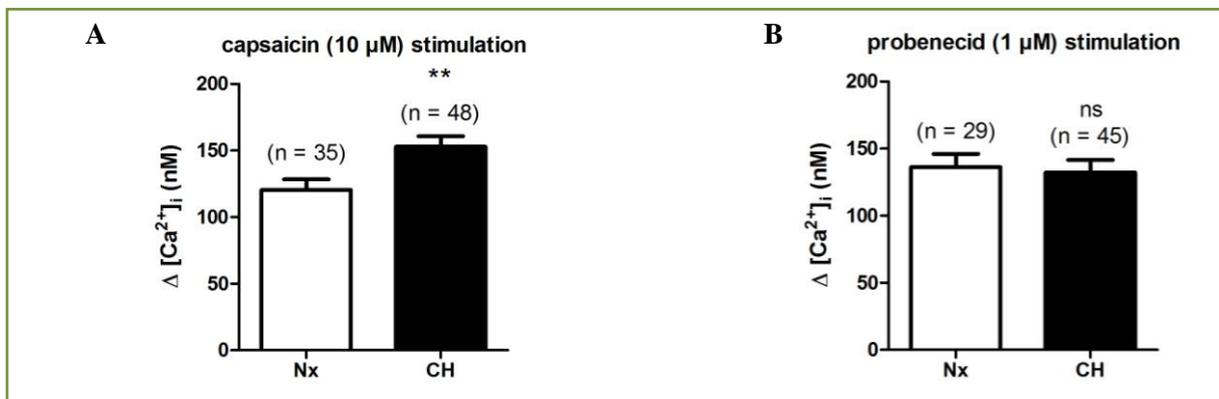
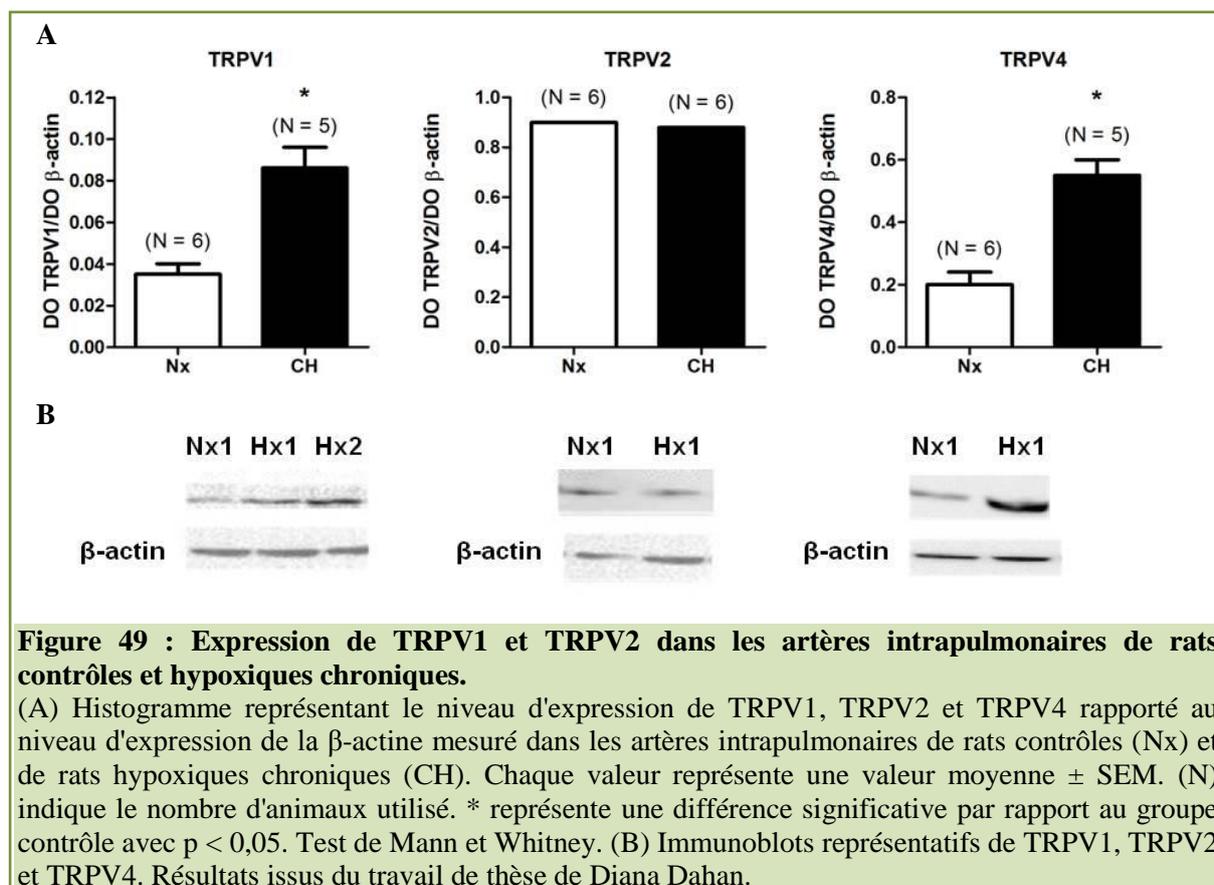


Figure 48 : Amplitude des réponses calciques induites par une stimulation à la capsaïcine (10 μ M) ou au probénécide (1 μ M).

Les histogrammes représentent la valeur de l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en nM induite par l'application de (A) capsaïcine (10 μ M) ou (B) de probénécide (1 μ M) sur des CMLAP issues de rats contrôles (Nx) ou hypoxiques chroniques (CH). (n) indique le nombre de cellule étudiées. ** indique une différence significative pour $p < 0,01$. ns : non significatif. Test de Mann et Whitney.

Ces résultats montrant une suractivation des isoformes TRPV1 et TRPV4 concordent avec les expériences de Western blot montrant une surexpression de l'isoforme TRPV1 (Figure 49), et de TRPV4 [103].



Dans la mesure où seules les isoformes TRPV1 et TRPV4 sont surexprimées et suractivées suite à une hypoxie chronique, et comme l'activation de ces deux isoformes potentialise la migration des CMLAP [87], nous avons restreint la suite de l'étude à ces deux isoformes. Dans ce modèle animal d'HTP, deux facteurs majeurs interviennent : la baisse de la PO_2 due à l'exposition à l'hypoxie chronique, et l'augmentation des tensions pariétales au sein de la media, due d'une part au phénomène de la vasoconstriction hypoxique, et d'autre part à l'augmentation de la pression sanguine intraluminaire (cf. loi de Laplace).

Afin de connaître la part réelle de chacun de ces stimuli et les mécanismes cellulaires pouvant être à l'origine des perturbations physiologiques observées dans le modèle animal, nous avons mené une étude à l'échelle cellulaire en discriminant l'effet de l'hypoxie de l'effet de l'étirement (tension) intervenant dans le développement de l'HTP. Pour cela, nous avons développé des modèles de conditionnement cellulaires *in vitro*.

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer l'influence de l'hypoxie seule sur ces deux isoformes, à la fois sur leur expression et sur leur activation, mais nous avons également cherché à décrire l'influence de l'hypoxie sur les mécanismes cellulaires intervenant dans la mise en place de la pathologie.

2. L'hypoxie exerce-t-elle un effet direct sur les canaux TRPV1 et TRPV4 dans les CMLAP ?

Le modèle du rat hypoxique chronique ne nous permet pas de discriminer entre un effet direct de l'hypoxie et un effet de l'étirement induit par la vasoconstriction hypoxique pulmonaire et l'augmentation des tensions engendrées par l'hypertension. Nous avons donc cherché à savoir si la suractivation des SAC, et plus particulièrement la suractivation des isoformes TRPV1 et TRPV4 observées précédemment, était due à l'effet direct de l'hypoxie indépendamment d'un effet de l'étirement.

2.1. Principaux résultats

Ce travail a été réalisé sur des CMLAP provenant de **rats sains**. Les CMLAP ont été exposées *in vitro* à l'hypoxie dans un incubateur tri-gaz (Heracell 150i, Thermo Scientific) dont le niveau d'O₂ peut être modulé. Ce conditionnement nous permettra de caractériser le rôle de l'hypoxie indépendamment de tout autre facteur. **Deux populations de cellules ont été établies : des CMLAP cultivées dans des conditions d'hypoxie (1 % ou 10 % d'O₂) ou de normoxie (21 % O₂) pendant 24 ou 48 heures**, protocole couramment utilisé dans la littérature [132, 308].

Nous avons mis en évidence une augmentation de la réponse calcique médiée par les canaux TRPV1 et TRPV4 suite à un conditionnement à l'hypoxie (1 % O₂, 48 heures). Cette augmentation des réponses calciques pourrait impliquer **une surexpression des canaux TRPV1 et TRPV4**, comme cela a été montré pour TRPC1 [308]. Cette hypothèse a été vérifiée par des approches de RT-PCR quantitative et de Western-blot. L'hypoxie pourrait également **réguler la proportion de canaux à la membrane**, puisque son implication dans la relocalisation de TRPC6 a été publiée [309] de la même façon que l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) régule la translocation de TRPV2 [310]. Cette hypothèse a été vérifiée par immunofluorescence couplée à de la microscopie confocale.

L'activation de TRPV1 et TRPV4 potentialise la migration des CMLAP [87]. On peut donc imaginer que **l'augmentation des réponses calciques augmenterait la migration des CMLAP**. Des expériences de migration par invasion de brèche nous ont permis d'évaluer le rôle de l'hypoxie sur la migration des CMLAP. Ces expériences ont été couplées à des expériences d'immunofluorescence ciblant les protéines du cytosquelette (cytosquelette d'actine, de tubuline et de vimentine), afin de mesurer le remodelage du cytosquelette, ainsi que par des techniques colorimétriques d'incorporation du BrdU, afin d'évaluer la prolifération des CMLAP.

Enfin, l'augmentation en conditions d'hypoxie de la réponse calcique induite par l'activation des SAC, dont TRPV1 et TRPV4, **pourrait activer des voies de signalisation impliquées dans le développement de l'HTP**. En effet, l'hypoxie agit sur la voie de HIF-1 surexprimant TRPC1 et TRPC6 [132]. Nous avons donc étudié le rôle de l'activation des SAC et de l'hypoxie sur un facteur de transcription sensible aux variations de Ca²⁺ intracellulaire, et impliqué dans le développement de l'HTP : le NFAT. Pour cela, nous avons quantifié la translocation nucléaire du NFAT par immunofluorescence confocale.

2.2. Publication

Les résultats concernant cette partie ont fait l'objet d'une publication dans **Pflügers Archiv., European Journal of Physiology** parue le 10 mars 2015 [311]. Dans un premier temps, ils seront directement rapportés sous la forme d'un article, puis des expériences complémentaires non publiées seront présentées.

Pflugers Arch - Eur J Physiol
DOI 10.1007/s00424-015-1704-6

ION CHANNELS, RECEPTORS AND TRANSPORTERS

Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells

Thibaud Parpaite^{1,2} • Guillaume Cardouat^{1,2} • Marthe Mauroux^{1,2} •
Jennifer Gillibert-Duplantier^{1,2} • Paul Robillard^{1,2} • Jean-François Quignard^{1,2} •
Roger Marthan^{1,2} • Jean-Pierre Savineau^{1,2} • Thomas Ducret^{1,2,3}

Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells

Thibaud Parpaite^{1,2} · Guillaume Cardouat^{1,2} · Marthe Mauroux^{1,2} · Jennifer Gillibert-Duplantier^{1,2} · Paul Robillard^{1,2} · Jean-François Quignard^{1,2} · Roger Marthan^{1,2} · Jean-Pierre Savineau^{1,2} · Thomas Ducret^{1,2,3}

Received: 19 December 2014 / Revised: 9 March 2015 / Accepted: 10 March 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Transient receptor potential (TRP) channels of the vanilloid subfamily, mainly TRPV1 and TRPV4, are expressed in pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and implicated in the remodeling of pulmonary artery, a landmark of pulmonary hypertension (PH). Among a variety of PH subtypes, PH of group 3 are mostly related to a prolonged hypoxia exposure occurring in a variety of chronic lung diseases. In the present study, we thus investigated the role of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels independently of the increased pulmonary arterial pressure that occurs during PH. We isolated PASMC from normoxic rat and cultured these cells under *in vitro* hypoxia. Using microspectrofluorimetry and the patch-clamp technique, we showed that hypoxia (1 % O₂ for 48 h) significantly increased stretch- and TRPV4-induced calcium responses. qRT-PCR, Western blotting, and immunostaining experiments revealed that the expression of TRPV1 and TRPV4 was not enhanced under hypoxic conditions, but we observed a membrane translocation of TRPV1. Furthermore, hypoxia induced a reorganization of the F-actin cytoskeleton, the tubulin, and intermediate filament networks (immunostaining experiments),

associated with an enhanced TRPV1- and TRPV4-induced migratory response (wound-healing assay). Finally, as assessed by immunostaining, exposure to *in vitro* hypoxia elicited a significant increase in NFATc4 nuclear localization. Cyclosporin A and BAPTA-AM inhibited NFATc4 translocation, indicating the activation of the Ca²⁺/calcineurin/NFAT pathway. In conclusion, these data point out the effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat PASMC, suggesting that these channels can act as direct signal transducers in the pathophysiology of PH.

Keywords Calcium · Hypoxia · Migration · Stretch-activated channels · TRP channels · Vascular smooth muscle

Introduction

Acute hypoxia induces hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV) which is a specific adaptive physiological response of pulmonary circulation to ensure an efficient blood oxygenation [42]. However, prolonged hypoxia exposure occurring in a variety of chronic lung diseases (chronic obstructive pulmonary disease, asthma...) eventually leads to pulmonary hypertension (PH) of group 3 [37]. PH is characterized by a progressive elevation of pulmonary arterial pressure leading to right heart failure and ultimately to death [17]. Subsequently to chronic hypoxia, pulmonary arteries (PA) undergo structural and functional changes [19,33], both of which implicate pulmonary arterial smooth muscle cells (PASMC). Indeed, morphological (such as hypertrophy and hyperplasia) and functional changes (such as modulation of ion channel expression and activity) of PASMC are involved in hyperreactivity of PA to contractile agonists, thickening of large pulmonary vessel medial wall, as well as in muscularization of small pulmonary vessels [12,30].

Guillaume Cardouat and Marthe Mauroux contributed equally to this work.

✉ Thomas Ducret
thomas.ducret@u-bordeaux.fr

¹ Univ. Bordeaux, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France

² INSERM, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, U1045, F-33000 Bordeaux, France

³ Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, INSERM U1045, Université de Bordeaux, 146 rue Léo-Saignat (case 13), F-33076 Bordeaux cedex, France

In examining the role of ion channels in PH, we and others recently demonstrated that the activity of stretch-activated channels (SAC) and TRPV4 in particular, was increased in PASMC from chronically hypoxic rat [2,4,7,49], an animal model of PH of group 3 [41]. Transient receptor potential (TRP) channels are non-selective cationic channels (NSCC) and are implicated in diverse cellular functions in smooth muscle cells [13]. Based on structural homology, TRP superfamily are subdivided into seven main subfamilies. In PASMC, TRPC (“Canonical”), TRPV (“Vanilloid”), and TRPM (“Melastatin”) are all expressed [45,50], and among the TRPV subfamily, TRPV1, TRPV2, and TRPV4 constitute the molecular basis of SAC [18,27,28,40], are the most abundantly expressed [50]. TRPV channels are Ca^{2+} -permeable NSCC, activated by a wide variety of stimuli, including physical, thermal, and chemical stimuli such as 4α -phorbol-12,13-didecanoate (4α -PDD), capsaicin, GSK1016790A, and resiniferatoxin, selective agonists of TRPV1 and TRPV4. At the cellular level, an increase in intracellular calcium concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) is a key step in the initiation of a variety of cellular functions such as contraction, proliferation, and migration [16,24]. Moreover, we previously showed that capsaicin and 4α -PDD increase $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and induce rat PASMC migration [5,25]. The involvement of TRPV1 and TRPV4 in hypoxia-induced proliferation of human PASMC and in serotonin-induced proliferation of rat PASMC, respectively, was also described [5,46]. Thus, SAC, TRPV1, and TRPV4 in particular, appear as good candidates for linking hypoxia-induced effect and vessel remodeling.

However, if in vivo exposure to chronic hypoxia directly modulates SAC/TRPV4 in PASMC [2,4,49], the mechanism by which hypoxia affects these channels remains unknown. Indeed, hypoxia could directly act via, for example, hypoxia-sensitive transcription factors or indirectly via the increase in pulmonary arterial pressure that occurs during HPV and PH establishment. Indeed, because of the location of PASMC in the arterial wall, an elevation in intraluminal pressure is directly transduced by SAC, which can act as signal transducers thus providing a feedback mechanism. In the present study, we investigated the role of hypoxia, independently to this potential stretch effect: we isolated PASMC from normoxic rat and cultured these cells under in vitro hypoxia. We focused our attention on TRPV1 and TRPV4 channels. We sought to compare single stretch-activated channel activity (patch-clamp technique in cell-attached configuration) and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ responses (microspectrofluorimetric assay) elicited by hypotonic stimulation-induced cell swelling, capsaicin and resiniferatoxin (selective agonists of TRPV1), 4α -PDD and GSK1016790A (selective agonists of TRPV4), as well as the expression of TRPV1 and TRPV4 (qRT-PCR, Western blot and immunostaining) in PASMC cultured under normoxic or hypoxic conditions (1 % O_2 for 48 hours). Furthermore, we explored the putative effect of hypoxia on

TRPV1- and TRPV4-induced PASMC migration (wound-healing assay), proliferation (BrdU incorporation), cell viability (Wst-1 assay), and cytoskeleton reorganization (immunostaining). Finally, we also tested the implication of the Ca^{2+} /calcineurin/NFATc4 pathway in these hypoxia-induced effects.

Materials and methods

PASMC isolation and culture

Intrapulmonary arteries (IPA) were dissected from lungs of male Wistar rats (250–350 g body weight), according to the animal care and use of our local ethics committee (“Comité d’éthique de Bordeaux en expérimentation animale” N° 50) in agreement with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the United States Institute of Health and European Directives. Briefly, rats were euthanized with i.p. injection of pentobarbital sodium (190 mg/kg). Then, the entire heart-lung preparation was rapidly removed en bloc. IPA of the first and second orders from the left lung was dissected free from surrounding connective tissues and endothelium (de-endothelialized IPA) under binocular control and sterile conditions. As already described [4], freshly dissociated PASMC were obtained using an enzymatic dissociation method. Briefly, small pieces (1 × 1 mm) of IPA were placed successively in different dissociation solutions containing collagenase, papain, and dithioerythritol at 37 °C. Tissues were then gently agitated using a polished wide-bore Pasteur pipette to release the cells. Cells were then seeded on adequate support and cultured in culture medium (DMEM-HEPES supplemented with 1 % penicillin-streptomycin, 1 % Na-pyruvate, 1 % nonessential amino acids, and 10 % foetal calf serum (FCS)). Before the experiments, PASMC were growth-arrested by using serum-free culture medium supplemented with 1 % insulin-transferrin-selenium (ITS). For calcium and electrophysiological measurements, cells were directly stored in serum-free culture medium enriched with 1 % ITS. They were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere gassed with 5 % CO_2 .

In vitro hypoxia exposure

PASMC of control group (“normoxia”) were exposed to a gas mixture containing 21 % O_2 , 74 % N_2 , and 5 % CO_2 . Cells of hypoxia group were exposed to a gas mixture containing 10 % O_2 , 85 % N_2 , and 5 % CO_2 (“hypoxia 10 % O_2 ”) or 1 % O_2 , 94 % N_2 , and 5 % CO_2 (“hypoxia 1 % O_2 ”) for 24 or 48 h in a tri-gas incubator (Heracell 150i, ThermoScientific, Saint Herblain, France).

Microspectrofluorimetric assay of cytosolic calcium

The Ca^{2+} -sensitive fluorescent probe indo-1 was used to record changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The cells plated on glass coverslips were incubated with 5 μM indo-1 penta-acetoxymethyl ester (indo-1/AM) in Krebs-HEPES solution (see composition below) at room temperature for 40 min, then washed and maintained in the same saline solution before the fluorescence measurements.

For single cell measurements, the dual emission microspectrofluorimeter was constructed from a Nikon Diaphot inverted microscope fitted with epifluorescence ($\times 40$ oil immersion fluorescence objective; numerical aperture, 1.3) (Nikon, Champigny sur Marne, France). For excitation of indo-1, a collimated light beam from a 100-watt mercury arc lamp (Nikon) was filtered at 355 nm and reflected from a dichroic mirror (380 nm). The emitted fluorescence signal was passed through a pinhole diaphragm slightly larger than the selected cell and directed onto another dichroic mirror (455 nm). Transmitted light was filtered at 480 nm, reflected light was filtered at 405 nm, and the intensities were recorded by separate photo-multiplier-tubes (P100, Nikon). Under these experimental conditions, the fluorescence ratio (F405/F480) was calculated and recorded on-line as a voltage signal. $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was estimated from the F405/F480 using the formula $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d \beta (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R)$ derived by Grynkiewicz et al. [10]. R is the experimental ratio value; R_{min} and R_{max} are the minimum and maximum fluorescence ratios, respectively; K_d is the dissociation constant for indo 1; and β is the fluorescence ratio at 480 nm in the absence and in the presence of a saturating concentration of Ca^{2+} . In control experiments, R_{min} and R_{max} were determined in permeabilized PASMIC in the presence of 5 mM EGTA and 5 mM Ca^{2+} added to physiological saline solution, respectively. PASMIC were permeabilized with 25 μM β -escin. R_{min} and R_{max} were 0.07 and 0.85, respectively. Intermediary fluorescence ratio values were obtained from cells bathed in solutions of variable Ca^{2+} concentrations. The calibrating curve was then constructed, allowing the graphical determination of $K_d \beta = 1000$. The amplitude of the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ rise was determined as the difference between the basal $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recorded before the stimulation and the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ recorded at the peak response in responding cells.

Electrophysiological recording

Single-channel activity was recorded from cell-attached patches using the technique described by Hamill et al. [14]. The electrodes were pulled on a PC-10 (Narishige, Japan) puller in two stages from borosilicate glass capillaries (1.5 mm OD, 1.16 mm ID, Harvard Apparatus, Phymep, Paris, France). The pipettes had a mean resistance of 5–7 M Ω when measured in standard recording conditions. Cells

were viewed under phase contrast with a Nikon Diaphot inverted microscope. A RK 400 patch amplifier (Biologic, Claix, France) was used for cell-attached recordings. Stimulus control, data acquisition, and processing were carried out on a PC computer using Clampex v10.2 software (Molecular Devices, Foster City, CA). Current records were filtered with a Bessel filter at 1 kHz. Data were analyzed using Clampfit v10.2 software (Molecular Devices).

RNA and cDNA synthesis

After enzymatic dissociation, cells were seeded on flasks and grown in full medium containing 10 % FCS until confluence, prior to 48 h serum deprivation in hypoxia (1 % O_2) or normoxia (21 % O_2). Cells were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) and then RNA was extracted using NucleoSpin[®]RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel, Hoerdt, France). Briefly, cells were lysed by incubation in "lysis buffer" solution, in order to inactivate RNases and create appropriate binding conditions which favor adsorption of RNA to the silica membrane. After lysis, homogenization and reduction of viscosity were achieved by filtration with NucleoSpin[®] filter units. Residual genomic DNA was removed efficiently by time-saving on-column digestion with rDNase provided. Total RNA was eluted in RNase free water. The concentration of RNA was measured spectrophotometrically by Spectrostar nano microplate reader (BMG Labtech, Champigny sur Marne, France). The total RNA (1 μg) was reverse transcribed into complementary DNA (cDNA) by using AMV reverse transcriptase (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) in presence of RNase inhibitor and oligo d(T) as a primer at 42 $^\circ\text{C}$ for 60 min followed by heating at 94 $^\circ\text{C}$ for 3 min.

Polymerase Chain Reaction

Polymerase chain reaction (PCR) was performed with a Rotor-Gene 2000 (Corbett Research/Qiagen, Venlo, Netherlands) as previously described [25]. cDNA from 10 ng of total RNA were added to 0.2 μl of 50X Titanium Taq DNA Polymerase combined to its buffer (Clontech Laboratories, Saint Germain en Laye, France), 1 mM dNTP, each of the appropriate primer (Sigma Genosys, Saint Quentin Fallavier, France; see Table 1 for concentrations and sequences), and 0.5X SYBR Green (Molecular Probes/Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The reaction was initiated at 50 $^\circ\text{C}$ for 2 min, 95 $^\circ\text{C}$ for 10 min, and followed by 40 cycles of denaturation at 95 $^\circ\text{C}$ for 15 s and annealing/extension at 70 $^\circ\text{C}$ for 30 s. PCR negative controls were systematically made by using water instead of cDNA. All specific primers were designed by using the primer analysis software (Oligo 6.6, Molecular Biology Insights, Cascade, CO, USA). The efficiency of the PCR reactions was always more than

Table 1 Sequences of the primer pairs (*S* sense, *AS* antisense) are shown as well as GenBank accession number, product length, product T_m, and concentration for TRPV1 and TRPV4 genes

Gene	Sequence	GenBank accession number	Product length (bp)	Product T _m (°C)	Concentration (nM)
TRPV1	S: AGCGAGTTCAAAGACCCAGA AS: TTCTCCACCAAGAGGGTCAC	NM_031982.1	268	88.2	200
TRPV4	S: GCCACCCTACCCTTACCGTA AS: GGAAGGAGCCATCGACGAAGA	NM_023970.1	158	88.8	200

90 %. Specificity of the amplified PCR products was checked with melting curve analysis and by electrophoresis analysis on a 2 % agarose gel containing SYBR Green.

Western blot

After enzymatic dissociation, cells were seeded on flasks and grown in full medium containing 10 % FCS until confluence, prior to 48 h serum deprivation in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). Cells were then washed twice in phosphate-buffered saline (PBS). After scrapping, they were isolated by centrifugation, 500g for 5 min. PBS was removed and replaced by 100 µL RIPA buffer (R0278, Sigma) with anti-protease cocktail (P8340, 1/100, Sigma) and DNase (1/100), and incubated for 30 min on ice. After sonication, insoluble material was removed by centrifugation at 15,000g for 10 min at 4 °C, and the amount of proteins was assessed by the Lowry method [23]. After heat denaturation for 6 min at 90 °C, 20 µg of proteins were separated by 5–2 % acrylamide gel electrophoresis. The proteins were then transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (Immobilion-P, Millipore, Molsheim, France) using a semi-dry electroblotter (Biorad, Marnes la Coquette, France) at 300 mA for 45 min. Unspecific sites were saturated for 1 h using PBS-TWEEN 0.1 %, 5 % bovine serum albumin (BSA), and 1 % goat serum. The membranes were then incubated overnight at 4 °C with diluted primary antibodies: rabbit anti-TRPV1 (ACC-029, 1/200, Alomone, Jerusalem, Israel) or rabbit anti-TRPV4 (AB39260, 1/200, Abcam, Paris, France). The membranes were then washed with PBS-TWEEN 0.1 % and treated with the corresponding horse-radish peroxidase-linked secondary goat anti-rabbit antibodies (170-5046, 1/10,000, Biorad) for 2 h at room temperature. After several washes in PBS-TWEEN 0.1 %, the membranes were processed for chemiluminescent detection using HRP substrate (WBKLS0500, Millipore), according to the manufacturer's instructions. Immunoblots were then revealed and acquired using Fuji LAS-3000 imaging system. Finally, membrane were stripped and revealed with secondary goat anti-mouse antibodies (172-1011, 1/10,000, Biorad) to reveal primary mouse anti β-actin antibodies (A5316, 1/10,000, Sigma). Images were quantified using ImageJ software.

Immunofluorescence experiments

After enzymatic dissociation, cells were seeded on 8-well chamber slides (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) and grown in full medium containing 10 % FCS until confluence, prior to 48 h serum deprivation in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). Cells were washed twice in PBS and then fixed for 10 min in 4 % paraformaldehyde solution (Sigma). After fixation, cells were permeabilized with PBS containing 0.5 % Triton-X100 (Dutscher, Brumath, France) for 5 min. Unspecific binding sites were blocked with PBS containing 4 % BSA for 30 min. Primary antibodies in PBS 1 % BSA were applied 1 h at room temperature. Cells were then washed with PBS and labeled with secondary antibodies for 1 h in PBS-1 % BSA. Alexa-Fluor 488 goat anti-mouse or anti-rabbit, and Alexa-Fluor 568 goat anti-mouse or anti-rabbit were used as secondary antibodies (1/200, Molecular Probes/Invitrogen). After PBS wash, cell nuclei were stained with DAPI for 5 min (1/1000, Sigma). Slides were then mounted with coverslips with an anti-fade Dako Fluorescent Mounting Medium (Dako, Courtaboeuf, France) and then observed under a Nikon D-Eclipse C1 confocal scanning microscope using the Nikon Apo Plan 60X/1.4NA oil immersion objective. Fluorescent images were acquired at 16-bit resolution using the Nikon EZC1 software using the Helium-Blue Laser Diode (405 nm, for DAPI staining), the Helium-Neon Laser Diode (543 nm, for Alexa-Fluor 568), and the Argon laser line (488 nm, for Alexa-Fluor 488), prior to analysis with ImageJ software.

CML phenotype and TRPV immunostainings In order to validate smooth muscle cell phenotype, cells were labeled with a monoclonal anti-α smooth muscle actin (α-SMA) antibody (clone 1A4, 1/100, Sigma) and polyclonal calponin 1/2/3 (FL-297, 1/50, Santa Cruz/Cliniscience, Nanterre, France). TRPV1 and TRPV4 expressions were evaluated with a polyclonal anti-TRPV1 antibody (AB63083, 1/200, Abcam) or a polyclonal anti-TRPV4 antibody (ACC-034, 1/50, Alomone).

Cytoskeleton immunostaining Briefly, cells were seeded and grown as described above, but after 24 h serum deprivation in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂), 4α-PDD or capsaicin were eventually added in the wells for 24 more

hours. At the end of this treatment, cells were fixed and stained. α -SMA, microtubule, and intermediate filament networks were studied with a monoclonal anti- α -SMA antibody (clone 1A4, 1/100, Sigma), a monoclonal anti-tubulin antibody (clone DM1A, 1/1000, Sigma), or a monoclonal anti-vimentin antibody (clone V9, 1/1000, Sigma). Integrated density of fluorescent signal was determined using ImageJ software. Results were expressed as the percentage of integrated density of the sum of three different random images as compared to control untreated cells.

NFAT immunostaining PASMC were grown in full medium containing 10 % FCS for 24 h, followed by 48 h serum deprivation in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). Then, cells were incubated with inhibitors or vehicle for 30 min before the stimulation with agonist for 30 min in presence or absence of inhibitors. In a second set of experiments, to apply cell swelling, cells were superfused with hypotonic extracellular solution (225 mOsm/kg) for 15 min, followed by an additional 15 min superfusion with isotonic solution (310 mOsm/kg). At the end of these stimulations, cells were immediately fixed with 4 % formaldehyde in warmed PBS (37 °C) for 10 min, and stained. A polyclonal anti-NFATc4 antibody (H-74, 1/100, Santa Cruz) was used for the NFAT staining protocol. Images were analyzed with ImageJ software. NFATc4 nuclear localization was quantified by measuring fluorescence intensity in the nucleus compared with fluorescence intensity in the cytoplasm.

In vitro migration assay

Cells ($2 \cdot 10^5$) were seeded in a Petri dish and cultured in culture medium with 10 % FCS until confluence. Next, after incubation for 24 h in serum-free culture medium in normoxia, a straight scratch was performed in the monolayer of cells using a pipette tip to obtain a wide acellular area and cells were incubated in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). After 24 h, the medium was then replaced with the same medium containing or not the agonists and the inhibitors in the same condition (hypoxia or normoxia). Following 24 h under these conditions, cells were fixed with methanol and stained with hematoxylin for 20 min. Imaging of the two wound edges were performed (at four different positions along the scratch) and cells that migrated into the acellular area were counted.

In vitro proliferation assay

Briefly, cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well in a 96-well tissue culture plate and cultured in complete culture medium containing 10 % FCS. After 24 h, the medium was removed and replaced by a serum-free medium. After an additional period of 24 h at 37 °C, the medium was changed to

complete culture medium containing 0.2 % serum in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). Following 24 h incubation under these conditions, agonists were eventually added. Next, 24 h later, the media were removed and replaced with medium containing BrdU (10 μ M), and cells were incubated for an additional 2 h at 37 °C. DNA synthesis was then assayed using Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric method (Roche Applied Science, Meylan, France), according to the manufacturer's instructions. Newly synthesized BrdU-DNA was determined using an EL808 ultra microplate reader (Bio-Tek Instruments, Colmar, France) at a wavelength of 380 nm with a reference wavelength of 490 nm.

In vitro cell viability

Cells were seeded at a density of 5×10^3 cells per well in a standard 96-well tissue culture plate and cultured in complete culture medium containing 10 % FCS. After 24 h, the medium was removed and replaced by a serum-free medium. After an additional period of 24 h at 37 °C, the medium was changed to complete culture medium containing 0.2 % serum in hypoxia (1 % O₂) or normoxia (21 % O₂). Following 24 h incubation under these conditions, agonists were eventually added. Next, 24 h later, the water soluble tetrazolium-1 (Wst-1, Roche Applied Science) was added to the media and cells were incubated for an additional 2 h at 37 °C. Cleavage of tetrazolium salt into formazan was determined, according to the manufacturer's instructions, using an EL808 ultra microplate reader (Bio-Tek Instruments) at a wavelength of 450 nm with a reference wavelength of 490 nm.

Recording solutions and application of stimulations

The standard Krebs-HEPES extracellular solution contained (in mM) the following: 118.4 NaCl, 4.7 KCl, 2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 4 NaHCO₃, 1.2 KH₂PO₄, 6 D-glucose, and 10 *N*-2-hydroxyethylpiperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES). The osmolality (measured with a cryosmometer type 15 Löser/Fisher Scientific, Illkirch, France) of the external salt solution was adjusted to 310 mOsm/kg with mannitol, and pH adjusted to 7.4 with NaOH. The TRPV agonists, capsaicin and 4 α -PDD, were applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell for the period indicated on the records. All the inhibitors were added to the extracellular solution 30 min before the application of agonists.

For the hypotonic-induced calcium response, the extracellular solution contained (in mM) the following: 91.3 NaCl, 5.9 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 D-glucose, 91 mannitol, and 10 HEPES. The osmolality of the external salt solution was adjusted to 310 mosm/kg with mannitol, and pH adjusted to 7.4 with NaOH. To apply cell swelling using hypotonic solution, cells were superfused with the former solution without

mannitol (osmolality: 225 mosm/kg; pH=7.4). This solution was applied to the recorded cell by pressure ejection from a glass pipette located close to the cell for the period indicated on the records. It was verified, in control experiments, that no change in $[Ca^{2+}]_i$ was observed during test ejection of isotonic Krebs-HEPES.

For the cell-attached patch clamp recording, the bathing solution had the following composition (in mM): 140 KCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 14 D-glucose, and 10 HEPES (osmolality: 310 mosm/kg; pH=7.4, adjusted with KOH). The recording pipette was filled with a solution containing (in mM): 140 NaCl, 2.2 CaCl₂, 1.2 MgCl, 14 D-glucose, 10 HEPES, and 10 tetraethylammonium chloride (TEA), (osmolality: 310 mOsm/kg; pH=7.4). Mechanical stimulation was performed by applying to the back end of the patch pipette a negative pressure (suction with a pressure step from 0 to -60 mmHg) using a Clampex controlled pressure clamp HSPC-1 device (ALA-scientific, Npi, Tamm, Germany).

Reagents

General salts were from VWR (Fontenay sous Bois, France). All other chemicals were purchased from Sigma, except DMEM-HEPES, FCS, and penicillin-streptomycin which were obtained from Gibco (Invitrogen), cyclosporin A from Cell Signaling, GsMTx-4 toxin from PeptaNova (Sandhausen, Germany), HC067047 and resiniferatoxin were from Tocris (Lille, France). 4 α -PDD, BAPTA-AM, capsaicin, capsazepine, cyclosporin A, GSK1016790A, HC067047, and resiniferatoxin were dissolved in DMSO and diluted 1:2000 into the bath to the final mentioned concentrations. At this dilution, the solvent (DMSO) alone had no effect on channel activity.

Data and statistical analysis

Results are expressed as mean \pm S.E.M. Each experiment was repeated several times (*n* indicates the number of cells obtained from at least three different rats). Mann-Whitney test or χ^2 test were used to determine statistical significance, differences with $P < 0.05$ were considered significant.

Results

Effect of hypoxia on stretch-activated channels

First, to investigate whether in vitro exposure to hypoxia increased the hypotonic solution-induced $[Ca^{2+}]_i$ response in PASMNC [4,49], a commonly used protocol to investigate SAC activity [11], cells were subjected to different levels of hypoxia (1 or 10 % O₂) for 24 or 48 h.

After 48 h of culture under normoxia (21 % O₂), all of the analyzed cells exhibited a stable resting $[Ca^{2+}]_i$ (69 \pm 6 nM, *n*=

51, Fig. 1a, c). In 43 % of tested cells (51 of 119 cells), application of the hypotonic solution (reduction in osmolality from 310 to 225 mOsm by omission of mannitol) for 2 min elicited a fast increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 1a) which amplitude was 159 \pm 17 nM (*n*=51, Fig. 1e). After 48 h of culture under hypoxia (1 or 10 % O₂), both the percentage of responding cells and the amplitude of $[Ca^{2+}]_i$ response were increased. Indeed, the percentages of responding cells were 58 and 55 % (hypoxia 10 and 1 % O₂ respectively) vs. 43 % (normoxia 21 % O₂) (Fig. 1d), and the amplitude of the calcium response was 215 \pm 26 nM and 227 \pm 14 nM (hypoxia 10 % (*n*=25) and 1 % O₂ (*n*=83), respectively) vs. 159 \pm 17 nM (*n*=51) under normoxia (Fig. 1e). Hypoxia also induced a significant increase of the resting $[Ca^{2+}]_i$ value of PASMNC from 69 \pm 6 nM (*n*=51) to 93 \pm 5 nM (*n*=83) in normoxia and hypoxia (1 % O₂) PASMNC, respectively (Fig. 1c).

In contrast, when cells were exposed to hypoxia for a shorter duration of 24 h, whatever the severity of this latter (1 or 10 % O₂), neither the percentage of responding cells, nor the amplitude of the hypotonic-induced calcium response, was affected by these hypoxic culture conditions (data not shown). According to these results, further experiments investigating the effect of hypoxia were performed under the condition "hypoxia 1 % O₂ for 48 h".

We then investigated the effect of in vitro exposure to hypoxia (1 % O₂ for 48 h) on single stretch-activated channel activity using cell-attached patch-clamp recording. To this end, we applied a negative pressure to the back end of the patch pipette to stretch the cell membrane. Holding potential (-80 mV) was applied from null resting membrane potential obtained using high potassium (140 mM) containing bath solution. When a suction (-60 mmHg) was applied to the patch pipette, channel opening was induced showing activation of inward currents (Fig. 1f). Hypoxia induced a significant increase of the channel activity from 0.17 \pm 0.03 (*n*=5) to 0.43 \pm 0.09 (*n*=8) in normoxia and hypoxia PASMNC, respectively (Fig. 1g), but had no effect on the amplitude of the single channel current (Fig. 1h).

Implication of SAC in the hypotonic solution-induced calcium response

Furthermore, as already shown in freshly dissociated and long lasting cultured normoxic PASMNC [4], we confirmed that stretch-activated channels are implicated in the hypotonic-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise in cells cultured under normoxia for 48 h. To determine the role of extracellular calcium in hypotonic solution-induced calcium response, experiments were performed in absence of extracellular Ca²⁺. Under such conditions, $[Ca^{2+}]_i$ responses were completely abolished or strongly reduced by 81 % to an amplitude of 31 nM in the only one responding cell out of 36 (Fig. 2b), confirming that

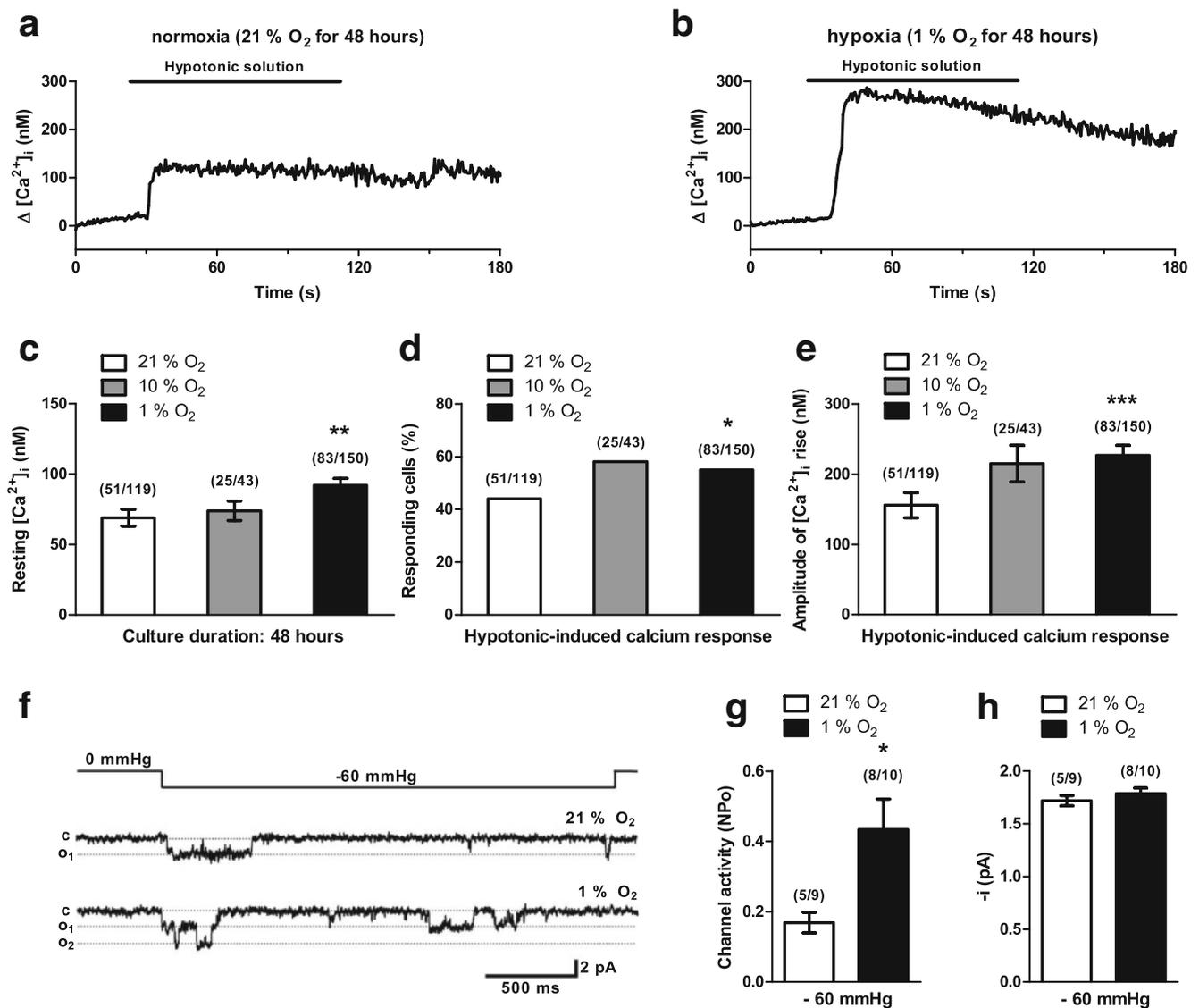
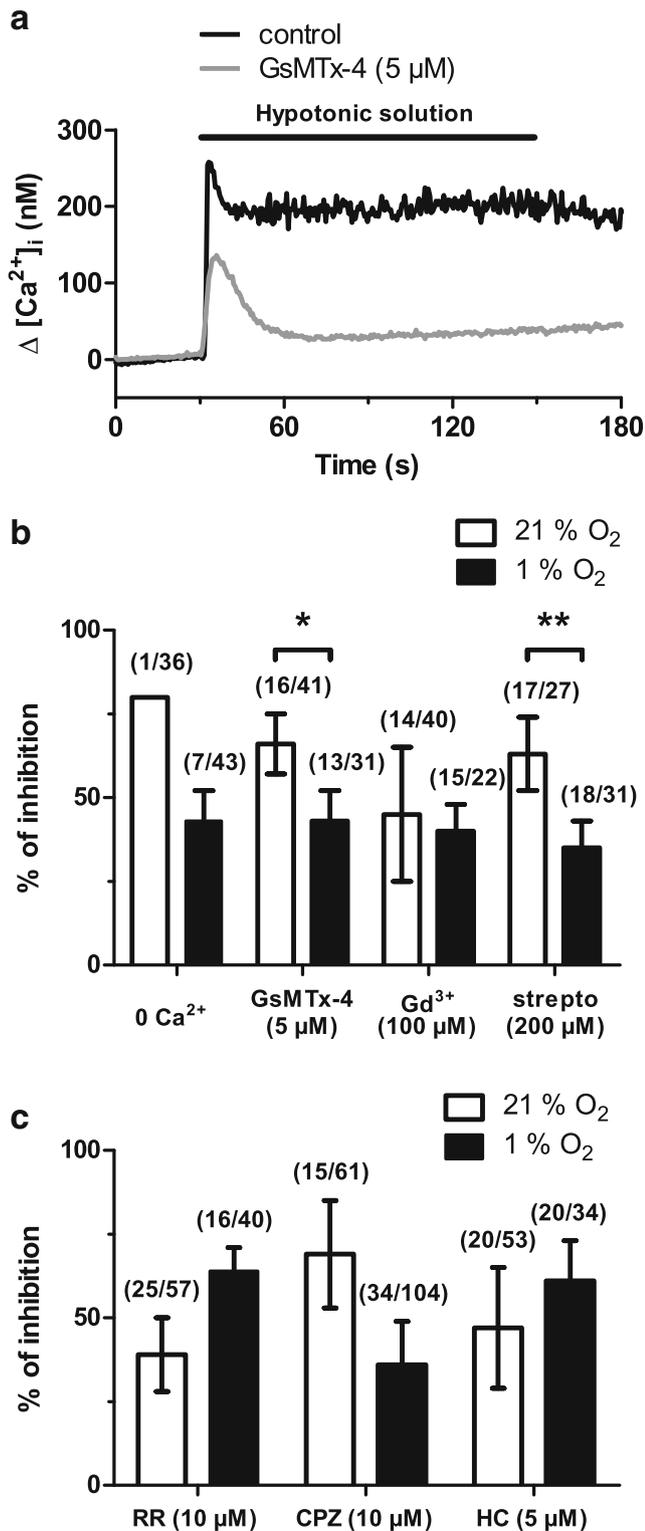


Fig. 1 Effect of hypoxia on stretch-activated channels. Freshly dissociated rat PASM was cultured for 48 h under normoxia (21 % O₂) or different levels of hypoxia (1 and 10 % O₂). **a–e** Using indo-1 as Ca²⁺ probe, [Ca²⁺]_i determination was carried out on single cell bathed in recording medium containing 2 mM Ca²⁺. Typical recordings of PASM cultivated under normoxia (**a**) or hypoxia (**b**) are shown when hypotonic solution (225 mOsm) was applied for the period indicated by the horizontal bar. Resting [Ca²⁺]_i values (**c**), percentage of cells responding to hypotonic solution (**d**), and amplitude of these calcium rises (**e**). **f–h** Representative records of current traces (patch clamp; cell-attached

configuration at –80 mV holding potential) recorded in cells cultured under normoxia or hypoxia (1 % O₂ for 48 h) during a pressure step from 0 to –60 mmHg applied to the patch electrode (**f**). The letters *c* and *o* indicate the closed and open channel states, respectively. Channel activity (**g**) and amplitude of the unitary currents (**h**) recorded during stretches applied to the patch electrode. Data are mean value±S.E.M. The proportion of responding cells is indicated in brackets. Significant difference from normoxic conditions is indicated by one asterisk when $P < 0.05$, two asterisks when $P < 0.01$, and three asterisks when $P < 0.001$, χ^2 or Mann-Whitney tests

the plasma membrane stretching induced by hypotonic stimulation activates Ca²⁺ influx. We thus examined the effect of the following pharmacological SAC inhibitors: GsMTx-4 (a peptide toxin from the tarantula *Grammostola spatulata*), gadolinium (a member of the trivalent ions lanthanides), and streptomycin (an aminoglycoside antibiotic). In the presence of GsMTx-4 (5 μ M), Gd³⁺ (100 μ M), or streptomycin (200 μ M), hypotonic solution-induced Ca²⁺ response was significantly decreased by 66, 46, and 64 %, respectively ($n = 16$,

$n = 14$, and $n = 17$, Fig. 2b). As a recent study shows that TRPV1 and TRPV4 operate as mechanosensitive channels activated by extracellular hypotonic solution-induced stretching of plasma membrane [39], we examined the effect of hypotonic solution in presence of ruthenium red (10 μ M), a TRPV channel blocker. In this condition, the calcium response was reduced by 40 % ($n = 25$, Fig. 2c). Moreover, in presence of capsazepine (10 μ M) or HC067047 (5 μ M), specific inhibitors of TRPV1 and TRPV4, respectively, hypotonic-induced



[Ca²⁺]_i rises were greatly reduced by 69 and 48 %, respectively ($n=15$ and $n=20$, Fig. 2c).

We then repeated the same experiments on cells cultured under in vitro hypoxia (1 % O₂ for 48 h, Fig. 2). In the absence of extracellular calcium, the percentage of responding cells to

Fig. 2 Involvement of SAC in the hypotonic solution-induced calcium response. **a** [Ca²⁺]_i determination was carried out on single cell. Typical recordings of rat PASMC cultured 48 h under hypoxia (1 % O₂ for 48 h) are shown when hypotonic solution (225 mOsm) was applied for the period indicated by the horizontal bar in the absence (control conditions) or presence of SAC inhibitor (GsMTx-4, 5 μ M). **b** Inhibitory effect of Ca²⁺-free solution (0 Ca²⁺), SAC inhibitors (GsMTx-4 (5 μ M), Gd³⁺ (100 μ M), or streptomycin (strepto, 200 μ M)) on the hypotonic-induced calcium response. **c** Inhibitory effect of TRPV inhibitors (ruthenium red (RR, 10 μ M), capsazepine (CPZ, 10 μ M), or HC067047 (HC, 5 μ M)) on the hypotonic-induced calcium response. Data are mean value \pm S.E.M. The proportion of responding cells is indicated in brackets. Significant difference from normoxic conditions is indicated by *one asterisk* when $P < 0.05$ and *two asterisks* when $P < 0.01$, Mann-Whitney test

hypotonic solution was increased in comparison with that observed in cells cultured in normoxia (7 of 43 cells vs. 1 of 36, respectively). In the presence of GsMTx-4 (5 μ M, Fig. 2a), Gd³⁺ (100 μ M), or streptomycin (200 μ M), hypotonic-induced Ca²⁺ response was significantly decreased by 43, 40, and 35 %, respectively ($n=13$, $n=15$, and $n=18$, Fig. 2b). Moreover, in presence of ruthenium red (10 μ M), capsazepine (10 μ M) or HC067047 (5 μ M), hypotonic-induced Ca²⁺ responses were reduced by 64, 36, and 61 %, respectively ($n=16$, $n=34$, and $n=20$, Fig. 2c). These results indicate that among the different SAC expressed in rat PASM C, TRPV1 and TRPV4 operate as mechanosensitive channels and participate in the hypotonic-induced calcium response.

Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced calcium response

Since rat PASMC express functional TRPV1 and TRPV4 channels allowing [Ca²⁺]_i increase [25], we therefore investigated whether in vitro exposure to hypoxia increased these TRPV1- and TRPV4-induced calcium responses.

In cells cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h), application of selective agonists of TRPV1 (capsaicin (10 μ M) or resiniferatoxin (100 nM)) for 1 min elicited a fast increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 3a), the amplitude of which was 145 ± 14 nM ($n=23$ of 61 tested cells, Fig. 3b) and 94 ± 9 nM ($n=22$ of 57 tested cells, Fig. 3b), respectively. In the presence of capsazepine (10 μ M), specific inhibitor of TRPV1, capsaicin-induced calcium response was reduced by 36 % ($n=14$, Fig. 3d), whereas in the absence of extracellular calcium, no response was registered in the 24 tested cells (Fig. 3d). In PASMC cultured under hypoxic conditions (1 % O₂ for 48 h), neither the percentage of responding cells to capsaicin, nor the amplitude of the calcium response was modified (Fig. 3c).

In cells cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h), application of selective agonists of TRPV4 (4 α -PDD (5 μ M) or GSK1016790A (1 μ M)) for 1 min elicited a fast increase in [Ca²⁺]_i (Fig. 4a). Activation of TRPV4 channels with 4 α -PDD or GSK1016790A elicited a higher calcium response:

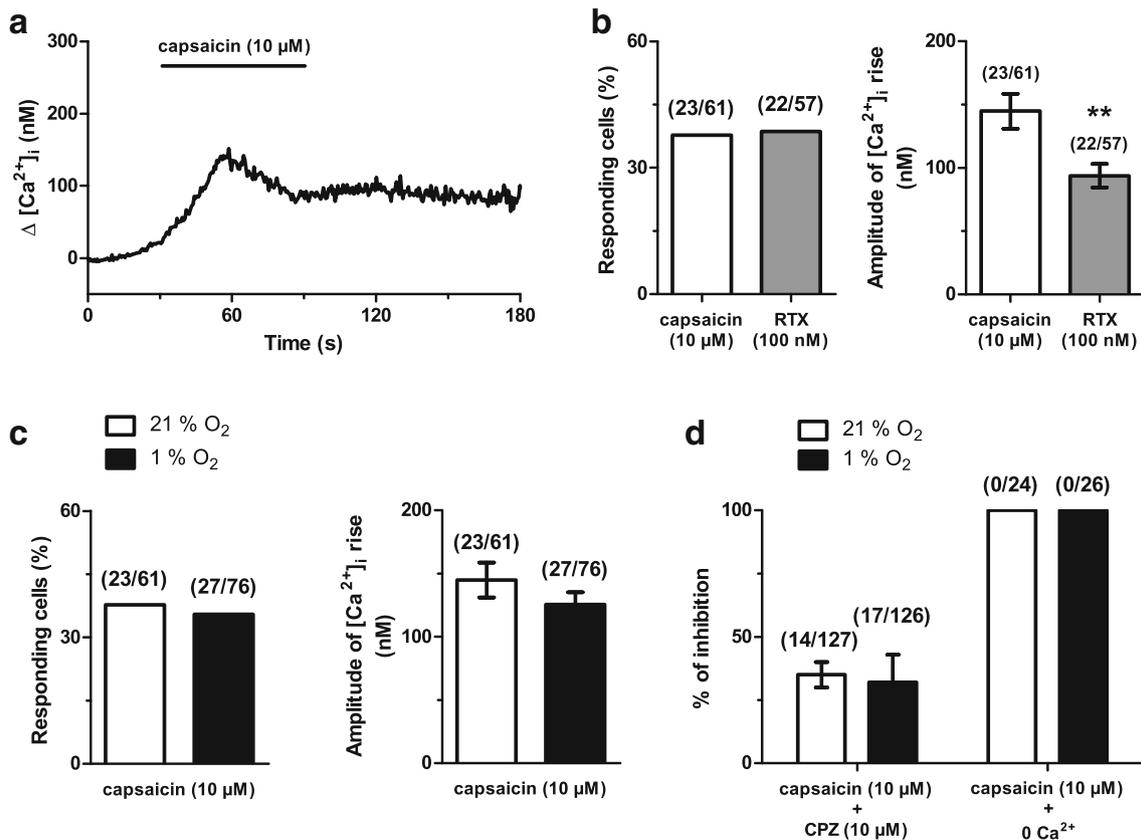


Fig. 3 Effect of hypoxia on TRPV1-induced calcium response. **a** $[Ca^{2+}]_i$ determination was carried out on single cell. Typical recordings of rat PASM cell cultured 48 h under normoxia (21 % O_2) are shown when capsaicin (10 μM) was applied for the period indicated by the horizontal bar. **b** Percentage of responding cells and amplitude of the calcium rises in response to capsaicin (10 μM) or resiniferatoxin (100 nM). Cells were cultured 48 h under normoxia (21 % O_2). **c** Percentage of

responding cells and amplitude of the calcium rises in response to capsaicin (10 μM). Cells were cultured 48 h under normoxia (21 % O_2) or hypoxia (1 % O_2). **d** Inhibitory effect of capsazepine (CPZ, 10 μM) or Ca^{2+} -free solution (0 Ca^{2+}) on the capsaicin-induced calcium response. Data are mean value \pm S.E.M. The proportion of responding cells is indicated in brackets. Significant difference is indicated by two asterisks when $P < 0.01$, Mann-Whitney test

220 ± 20 nM ($n = 21$ of 35 tested cells, Fig. 4b) and 185 ± 13 nM ($n = 18$ of 36 tested cells, Fig. 4b), respectively. In the presence of HC067047 (5 μM), specific inhibitor of TRPV4, 4 α -PDD-induced calcium response was reduced by 46 % ($n = 13$, Fig. 4d). In the absence of extracellular calcium, $[Ca^{2+}]_i$ responses were completely abolished or strongly reduced by 91 % in the only one responding cell out of 61 tested cells (Fig. 4d). In PASM cell cultured under hypoxic conditions (1 % O_2 for 48 h), the percentage of responding cells to 4 α -PDD was not modified: 57 % (21 of 37 cells), but the amplitude of the calcium response was potentiated: 311 ± 30 nM ($n = 21$) vs. 220 ± 20 nM ($n = 21$) by these culture conditions (Fig. 4c).

Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 mRNA and protein expression

qRT-PCR analysis was used to investigate the effect of hypoxia (1 % O_2 for 48 h) on the mRNA expression levels of TRPV1 and TRPV4. As shown in Fig. 5a, TRPV1 and TRPV4 mRNA levels were not significantly changed in hypoxic culture conditions (in 4–6 separate experiments). Consistent with these

results, specific anti-TRPV1 and anti-TRPV4 antibodies detected bands at 100 and 98 kDa, respectively, consistently in 6–9 separate experiments (Fig. 5b). The size of these bands was in agreement with the predicted molecular mass of the two isoforms. Western blot analysis also showed that TRPV1 and TRPV4 expression was not significantly changed in hypoxic cells compared with normoxic ones (Fig. 5b).

Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 intracellular localization

In order to determine whether hypoxia effect may be associated with differences in TRPV1 and TRPV4 intracellular localization, we performed immunostaining experiments. First, we verified that cultured rat PASM cell expressed both α -SMA and calponin (Fig. 6a), well known smooth muscle cell markers, confirming the homogeneity of the cell population.

Anti-TRPV1 and anti-TRPV4 antibodies showed a diffused staining throughout the cell, revealing that PASM cell cultured under normoxia (21 % O_2 for 48 h) were TRPV1 and TRPV4 positive (Fig. 6b, d). Hypoxia (1 % O_2 for 48 h)

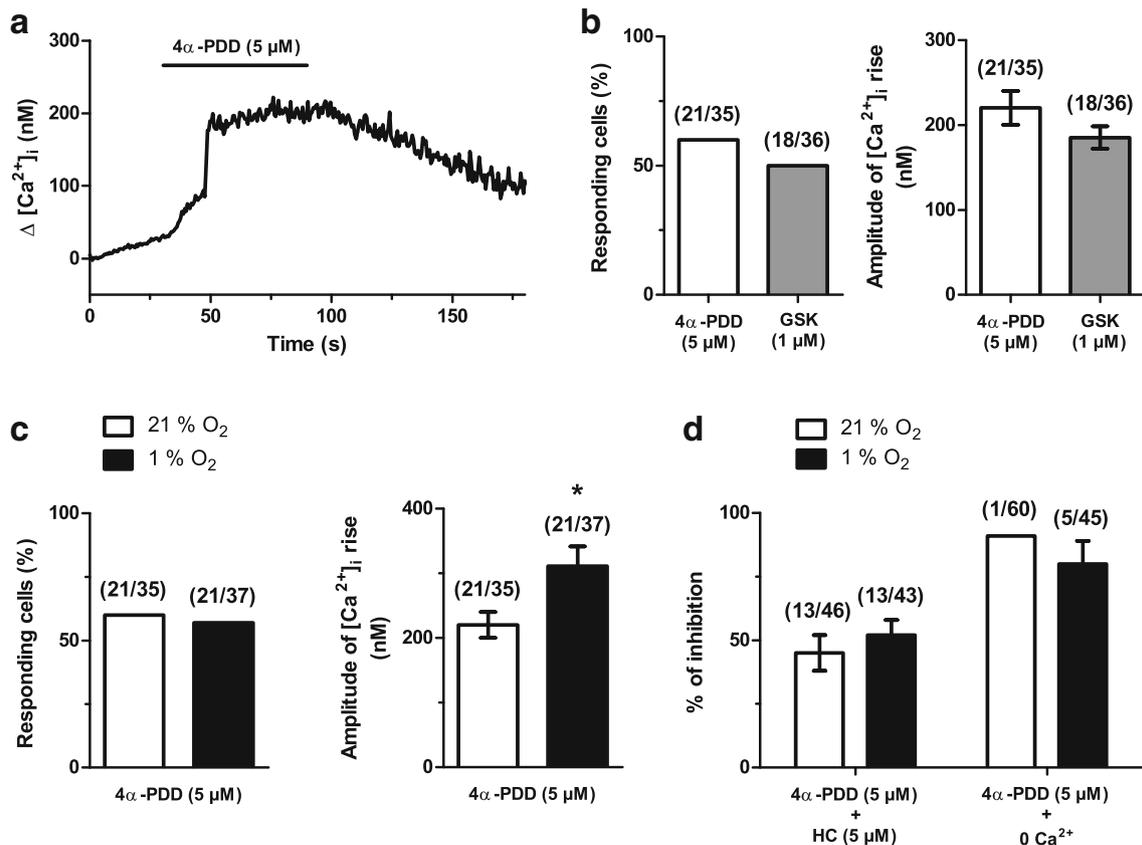


Fig. 4 Effect of hypoxia on TRPV4-induced calcium response. **a** $[Ca^{2+}]_i$ determination was carried out on single cell. Typical recordings of rat PSMC cultured 48 h under normoxia (21 % O₂) are shown when 4 α -PDD (5 μ M) was applied for the period indicated by the horizontal bar. **b** Percentage of responding cells and amplitude of the calcium rises in response to 4 α -PDD (5 μ M) or GSK1016790A (1 μ M). Cells were cultured 48 h under normoxia (21 % O₂). **c** Percentage of responding

cells and amplitude of the calcium rises in response to 4 α -PDD (5 μ M). Cells were cultured 48 h under normoxia (21 % O₂) or hypoxia (1 % O₂). **d** Inhibitory effect of HC067045 (HC, 5 μ M) or Ca²⁺-free solution (0 Ca²⁺) on the 4 α -PDD-induced calcium response. Data are mean value \pm S.E.M. The proportion of responding cells is indicated in brackets. Significant difference is indicated by one asterisk when $P < 0.05$, Mann-Whitney test

induced a specific TRPV1 membrane translocation (Fig. 6b). Indeed, hypoxia increased the average ratio (PM/CS) of the fluorescence signal of the cytoplasmic membrane (PM) to the fluorescence signal of the cytosol (CS) from 0.68 ± 0.04 ($n=11$) to 1.84 ± 0.73 ($n=11$) in normoxia and hypoxia PSMC, respectively (Fig. 6c). In contrast, no change of TRPV4 membrane-association was observed (Fig. 6d), and the PM/CS ratio was not modified under hypoxia, i.e., 0.67 ± 0.08 ($n=12$) vs. 0.70 ± 0.08 ($n=12$) in normoxia and hypoxia cells, respectively (Fig. 6e).

Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced PSMC migration

Since TRPV1 and TRPV4 channels are implicated in PSMC migration [25] and that these channels are affected by hypoxia (intracellular localization and calcium response), we therefore tested the ability of hypoxia to amplify TRPV1- and TRPV4-induced migratory responses. Figure 7a illustrates the effects of capsaicin and 4 α -PDD on PSMC migration as determined

by the wound-healing assay. Under normoxic culture conditions, when cells were incubated with 10 μ M capsaicin or 5 μ M 4 α -PDD for 24 h in serum-free DMEM, agonists significantly stimulated migration by 2.2- and 1.6-fold, respectively. Interestingly, hypoxia potentiated these migratory responses. Indeed, the same treatment of PSMC cultured under hypoxia (1 % O₂ for 48 h) with capsaicin or 4 α -PDD for 24 h increased cell migration by 203 and 123 %, respectively. Whatever the culture condition (normoxia or hypoxia), these agonist-induced migratory effects were inhibited by addition of capsazepine (10 μ M) or HC067047 (5 μ M).

In another set of experiments, we verified that this observed change in cell migration was not due to an increase in cell growth. Using BrdU and Wst-1 colorimetric methods, we assessed the ability of capsaicin and 4 α -PDD to increase cell proliferation and cellular growth/survival. As shown in Fig. 7b–c, whatever the method used and the culture condition (normoxia or hypoxia), stimulation of cells with capsaicin (10 μ M) or 4 α -PDD (5 μ M) for 24 h in low serum (0.2 % FCS) DMEM did not significantly increase cell proliferation

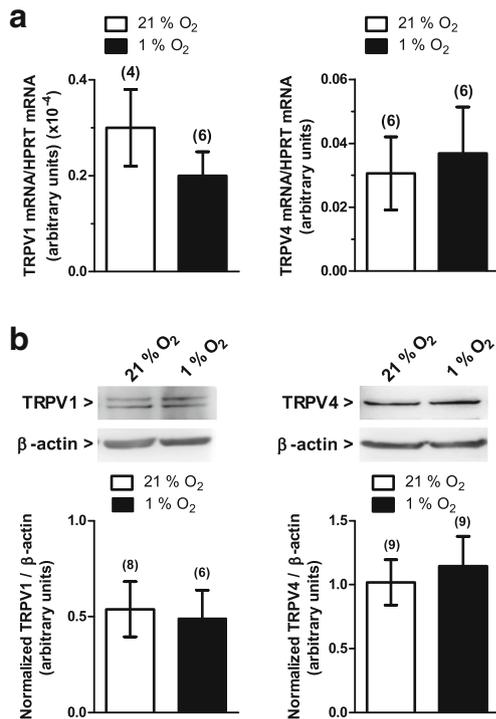


Fig. 5 Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 mRNA and protein expression. **a** qRT-PCR analysis of the relative expression of TRPV1 and TRPV4 mRNA in rat PASMC cultured 48 h under normoxia (21 % O₂) or hypoxia (1 % O₂). Data are expressed as percent normalized to HPRT mRNA. The number of independent experiments is indicated in brackets. Mann-Whitney test showed no significant difference. **b** Representative Western blot showing TRPV1 and TRPV4 channel expression in rat PASMC cultured 48 h under normoxia (21 % O₂) or hypoxia (1 % O₂). Upper panels indicate the expression of proteins of interest and β-actin. Lower panels indicate the summary of TRPV1 and TRPV4 protein expression measured by Western blot and normalized to β-actin expression level in rat PASMC cultured 48 h under normoxia or hypoxia. The number of independent experiments is indicated in brackets. Mann-Whitney test showed no significant difference

or cellular viability whereas positive control (DMEM with 10 % FCS) did it. In addition, as already described [46], the proliferation was significantly enhanced by hypoxia in presence of 10 % FCS (Fig. 7b)

Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced cytoskeleton reorganization

Since cell migration requires simultaneous changes in both cell morphology and adhesion [35], and since we have already demonstrated that TRPV1 and TRPV4 stimulation induces cytoskeleton reorganization [25], we investigated the effects of hypoxia on capsaicin- and 4α-PDD-induced cytoskeleton alteration.

First, we investigated the effect of hypoxia per se on cytoskeletal changes (Fig. 8). In control normoxic cells (Fig. 8a), staining of actin cytoskeleton with an anti-α-SMA antibody was diffuse throughout the cell and cells displayed actin stress

fibres generally parallel to the longitudinal axis. The density of the actin filament network increased in the cell periphery. Hypoxia (1 % O₂ for 48 h, Fig. 8d) significantly increased the intensity of the staining by 2.87-fold as compared to control staining (Fig. 8a, e). Staining for tubulin showed that the microtubule network was organized in fine networks from punctuates staining in both normoxia (Fig. 8f) and hypoxia (Fig. 8i). No significant changes were observed in the intensity of the staining upon hypoxic culture conditions (Fig. 8j). Finally, staining for vimentin revealed that intermediate filament network was organized in fine network from perinuclear areas (Fig. 8k). After 48 h under hypoxia (1 % O₂), the staining intensity was increased by 5.32-fold and was denser in the nuclear periphery (Fig. 8n–o). These results suggest that hypoxia per se is associated with changes in cytoskeleton architecture, and in the intracellular distribution and/or expression of cytoskeletal proteins.

Second, we confirmed that TRPV1 and TRPV4 stimulation induced the reorganization of the F-actin cytoskeleton (Fig. 8a–c, e), and the tubulin (Fig. 8f–h, j) and intermediate filament (Fig. 8k–m, o) networks in normoxic cells. Briefly, stimulation of cells with 10 μM capsaicin significantly increased the intensity of the staining for α-SMA and vimentin by 1.73- and 5.78-fold, respectively, whereas no significant change was observed concerning the tubulin network. In the presence of 5 μM 4α-PDD, the staining of the actin filament and tubulin networks was more intense (93 and 109 % increases, respectively) whereas no significant change was observed concerning the vimentin network.

Finally, we assessed the potential effect of hypoxia on this TRPV1- and TRPV4-induced cytoskeleton reorganization. Hypoxia exposure (1 % O₂ for 48 h) did not potentiate the TRPV1- and TRPV4-induced cytoskeleton reorganization, except for the 4α-PDD-induced vimentin network reorganization (Fig. 8e, j, o). However, in presence of capsazepine (10 μM) and HC067047 (5 μM), the effect of hypoxia per se on cytoskeletal changes (Fig. 9) was inhibited suggesting that this effect could implicate TRPV1 and TRPV4 channels.

Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced NFAT nuclear translocation

We then investigated the Ca²⁺/calcineurin/NFAT cascade signaling pathway since the Ca²⁺-dependent transcription factor NFAT (nuclear factor of activated T cells) is a common substrate of calcineurin involved in gene transcription. We focused on NFATc4 (NFAT3) isoform, the prominent isoform in rat pulmonary artery [48].

Immunofluorescence staining for NFATc4 in control normoxic cells showed cytoplasmic localization with little or no NFAT in the nuclei (Fig. 10a). Treatments of cells with capsaicin (10 μM) or 4α-PDD (5 μM) for 30 min caused reproducible translocation of NFATc4 into nuclei as shown

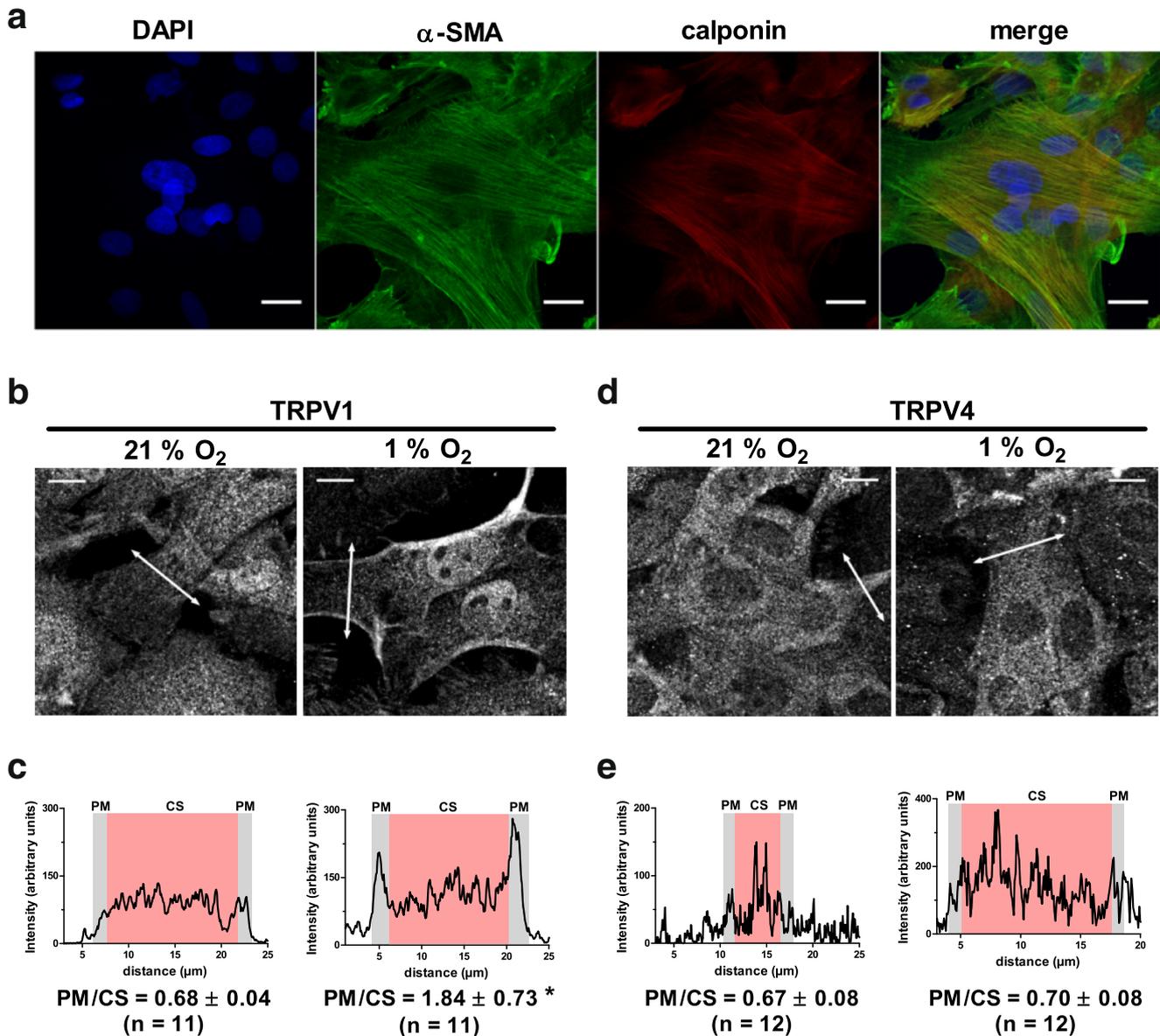


Fig. 6 Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 intracellular localization. **a** Representative confocal immunofluorescence fields of smooth muscle cell markers in rat PASMC cultured under normoxia (21 % O₂). Cell nuclei were stained with DAPI. Cells were stained with a primary antibody for α smooth muscle actin (α -SMA) and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody, and with a primary antibody for calponin and an Alexa-Fluor 568-conjugated secondary antibody. **b, d** Representative confocal immunofluorescence fields of rat PASMC cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h) or hypoxia (1 % O₂ for 48 h). Cells were stained with a primary antibody for TRPV1 or

TRPV4, and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **c, e** Evaluation of membrane localization of TRPV1 and TRPV4 channels by the fluorescence intensity profile of a typical line scan indicated by the *double-headed arrows* in cell. The average ratios (PM/CS) of the fluorescence signals of the cytoplasmic membrane (PM) to the fluorescence signals of the cytosol (CS) of representative cells are indicated under the *panels*. All images were taken with the same illumination time. Data are mean value \pm S.E.M. The number of cells is indicated in *brackets*. Significant difference is indicated by *one asterisk* when $P < 0.05$, Mann-Whitney test. *Scale bar* = 10 μ m

in the representative confocal fields and their corresponding intensity profiles (Fig. 10b and d). Quantitative analysis demonstrated that the NFATc4 nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio was 2.03 ± 0.13 ($n = 30$, Fig. 10f) in basal conditions and 3.50 ± 0.22 ($n = 29$, Fig. 10f) and 3.58 ± 0.24 ($n = 52$, Fig. 10g) after capsaicin or 4 α -PDD stimulation, respectively. We therefore investigated the change of NFATc4 localization in

PASMC pretreated for 30 min with 5 μ M BAPTA-AM, a cell permeant Ca²⁺ chelator, or 1 μ M cyclosporin A (Fig. 10c, e), an inhibitor of calcineurin which prevents the NFAT nuclear translocation. In these conditions, a significant decrease in agonist-induced NFATc4 nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio was observed as compared to control conditions (Fig. 10f, g).

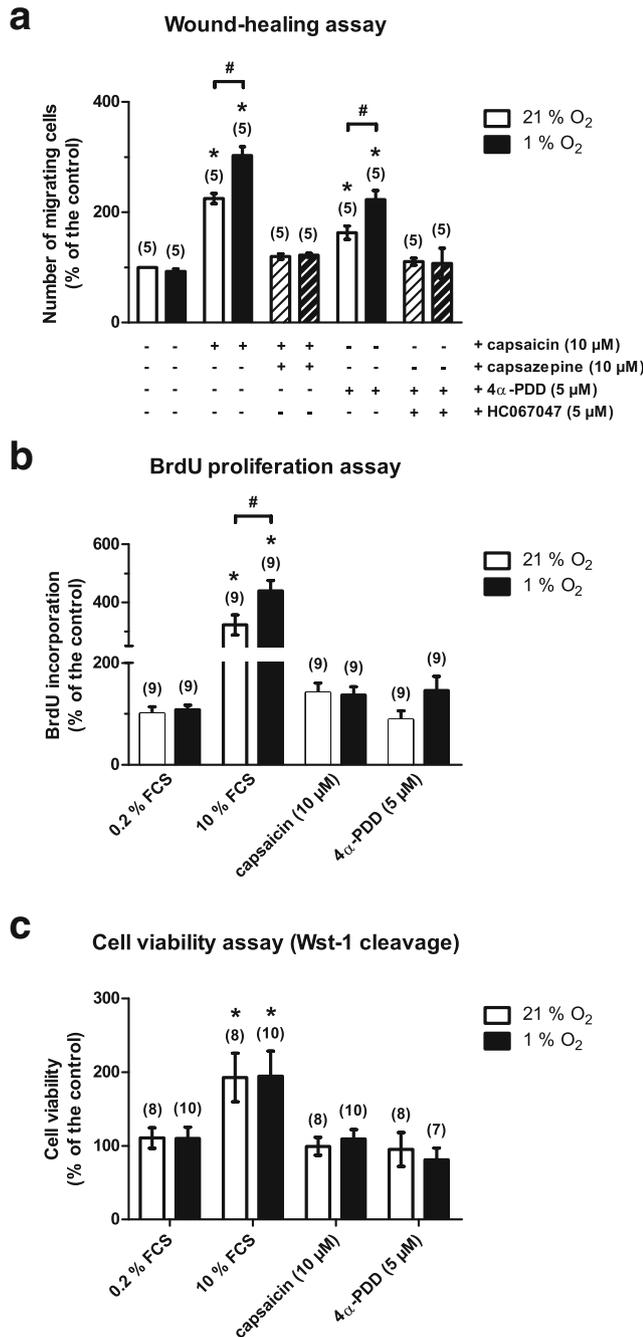


Fig. 7 Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced PASMCM migration. **a** Effects of capsaicin or 4α-PDD on migration of rat PASMCM cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h) or hypoxia (1 % O₂ for 48 h), evaluated by wound-healing assay. Cells were migrated in serum-free DMEM (control conditions, 0 % FCS), supplemented with 10 μM capsaicin, or 10 μM capsaicin with 10 μM capsazepine, or 5 μM 4α-PDD, or 5 μM 4α-PDD with 5 μM HC067047 for 24 h. Results are expressed as a percentage of cells migrating in control conditions. **b, c** Effects of capsaicin or 4α-PDD on proliferation (**b**) and viability (**c**) of rat PASMCM cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h) or hypoxia (1 % O₂ for 48 h), evaluated by BrdU and Wst-1 colorimetric methods, respectively. Cell proliferation was assessed by quantitative determination of DNA synthesis using the Cell Proliferation ELISA BrdU colorimetric method. Cell viability was assessed by the colorimetric water soluble tetrazolium-1 assay, based on living cells' cleavage of tetrazolium salt into formazan. Cells were incubated for 24 h in DMEM containing 0.2 % FCS (control conditions, 0.2 % FCS) supplemented with 10 μM capsaicin (TRPV1) or 5 μM 4α-PDD (TRPV4), or DMEM containing 10 % FCS before BrdU or Wst-1 incubation. Data are mean value±S.E.M. The number of independent experiments is indicated in the brackets. Significant difference between control conditions without agonist and experimental conditions is indicated by *one asterisk* ($P<0.05$). Significant difference between normoxic and hypoxic conditions is indicated by *simple number sign* ($P<0.05$), Mann-Whitney test

relocalization was inhibited in presence of BAPTA-AM (5 μM) or cyclosporin A (1 μM).

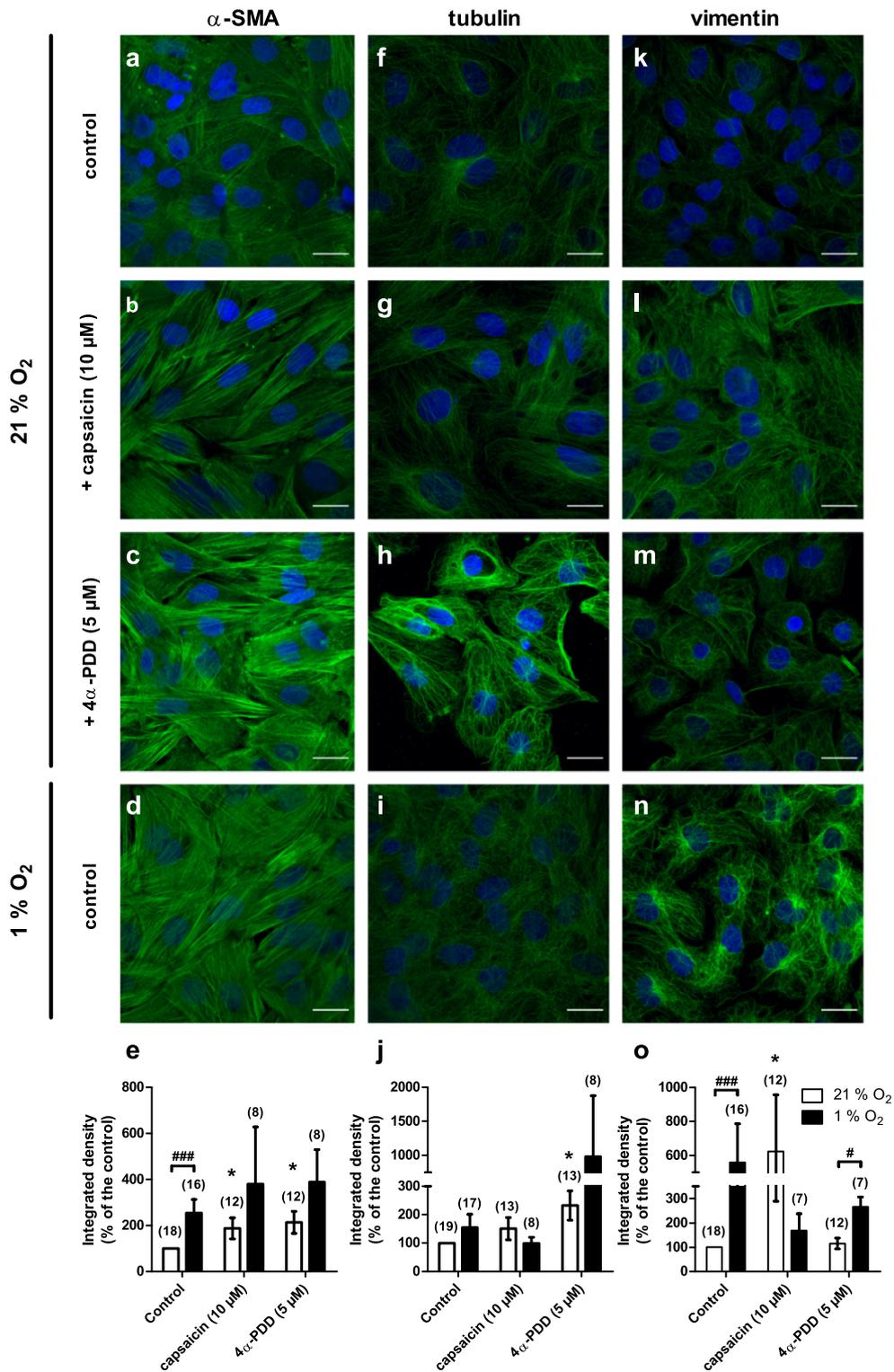
Finally, to determine if stretch is able to induce NFAT translocation sensitive to hypoxia, we investigated the change of NFATc4 localization in PASMCM superfused with hypotonic extracellular solution (225 mOsm/kg). This hypotonic stimulation caused reproducible translocation of NFATc4 into nuclei as shown in the representative confocal fields and their corresponding intensity profiles (Fig. 11a). Indeed, in normoxic cells, the NFATc4 nuclear/cytoplasmic ratio of fluorescence was increased by 97 % after hypotonic solution exposure (Fig. 11b). However, this effect was not potentiated by hypoxia (Fig. 11c).

Discussion

In vivo, during development of hypoxic PH, PA are subjected to numerous stimuli such as increased pulmonary arterial pressure or exposure to circulating factors in addition to hypoxia. In the present work, we thus investigated the role of hypoxia on PASMCM independently of these additional factors. Using classical agonists and antagonists at the commonly used concentrations in cultured PASMCM [2,5,25,29,38,46,49–51], we have demonstrated that hypoxia modulates TRPV1 and TRPV4 channels that are the molecular basis of SAC, to potentiate the effect of stretch thus suggesting that these channels can act as direct signal transducers in the pathophysiology of PH.

In a previous study [4], in PASMCM from chronically hypoxic rat (CH rat), a common animal model of PH, we have demonstrated an increased in the activity of SAC and in its related hypotonic solution-induced calcium response. Indeed,

Then, we investigated the effect of hypoxia (1 % O₂ for 48 h) on NFATc4 nuclear translocation (Fig. 10f, g). In the absence of agonist, the NFATc4 nuclear/cytoplasmic ratio of fluorescence was increased by 39 % after hypoxia exposure: 2.83 ± 0.22 ($n=40$, in hypoxia, Fig. 10f) vs. 2.03 ± 0.13 ($n=30$, in normoxia, Fig. 10f). In contrast, hypoxia exposure did not potentiate the TRPV1- and TRPV4-induced nuclear translocation observed in normoxia: the NFATc4 nuclear/cytoplasmic fluorescence ratio was 2.90 ± 0.28 ($n=23$, Fig. 10f) and 3.68 ± 0.39 ($n=24$, Fig. 10g), respectively. As in normoxic conditions, this agonist-induced NFATc4



although the *in vitro* applied tension by cell swelling is circumferential, whereas *in vivo* the applied tension is longitudinal according to the orientation of the cell within arteries, these two types of stimulation activated the same population of SAC with a similar sensitivity to pharmacological agents. In the present study, we isolated PSMC from normoxic rat and

cultured these cells under *in vitro* hypoxia. We showed that hypoxia (1 or 10 % O₂ for 48 h) significantly increased the hypotonic solution-induced calcium response, suggesting that hypoxia might affect PSMC and SAC in particular. As hypoxia is known to impact on K⁺ channels and thus on membrane potential [31], a determinant of Ca²⁺ entry, we confirm

Fig. 8 Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced cytoskeleton reorganization of PASM. Representative confocal immunofluorescence fields of rat PASM cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h) or hypoxia (1 % O₂ for 48 h). **a–d** Cells were stained with a primary antibody for α smooth muscle actin (α -SMA) and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **f–i** Microtubule network stained with a primary antibody for tubulin and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. **k–n** Intermediate filament network stained with a primary antibody for vimentin and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. Quantification of fluorescence is expressed as a percentage of integrated density of normoxic (21 % O₂) or hypoxic cells (1 % O₂) for α -SMA (**e**), tubulin (**j**), and vimentin (**o**). Cell nuclei were stained with DAPI. All images were taken with the same illumination time. Data are mean value \pm S.E.M. The number of independent experiments is indicated in the *brackets*. Significant difference between control conditions without agonist and experimental conditions is indicated by *one asterisk* ($P < 0.05$). Significant difference between normoxic and hypoxic conditions is indicated by *simple number sign* ($P < 0.05$), or by *triple number sign* ($P < 0.001$), Mann-Whitney test. Scale bar = 20 μ m

these results using another strategy (patch-clamp technique in cell-attached configuration). In the presence of TEA, at a holding potential of -80 mV, negative pressure directly applied to the cell membrane via the patch-clamp pipette induced stretch-activated inward currents. In PASM cultured under hypoxia, channel activity was enhanced in comparison with that observed in PASM cultured under normoxia, pointing out that SAC were affected by in vitro hypoxia exposure independently of K⁺ channel modulation. As reported in intralobar pulmonary arteries from CH rat suffering from PH [4], we propose that in vitro hypoxia-induced hyper-activity of SAC occurring with subsequent higher elevation of [Ca²⁺]_i may generate myogenic tone, contributing in part to hypoxic PH. Moreover, in the absence of extracellular calcium, the percentage of responding cells to hypotonic solution was increased as already observed in PASM from CH rat. We previously suggested [7] that SAC and ryanodine receptor type 1 (RyR1) are strongly coupled in PASM from CH rat, *caveolae* participating to this coupling by forming a complex microenvironment adequate for bringing closer membrane SAC and RyR1. Furthermore, the remaining hypotonic solution-induced calcium response in the presence of TRPV1 and TRPV4 inhibitors suggest that TRPV1 and TRPV4 are not the sole mechanosensitive channels implicated in this response. Indeed, several other TRP channels have been described as stretch-activated channels in rat PASM [12]. Hence, the relative contributions and interactions of TRPV1 and TRPV4 channels, and other stretch-activated channels in the hypotonic solution-induced calcium response require further investigations. Conversely, regardless of the severity of the hypoxia (1 or 10 % O₂), a shorter exposure of 24 h was not sufficient to increase this calcium response. In accordance, Yang et al. [49] have observed that in PA from the chronically hypoxic rat, the increase of mechanosensitive channel TRPV4 transcript was detected within 24 h, and the

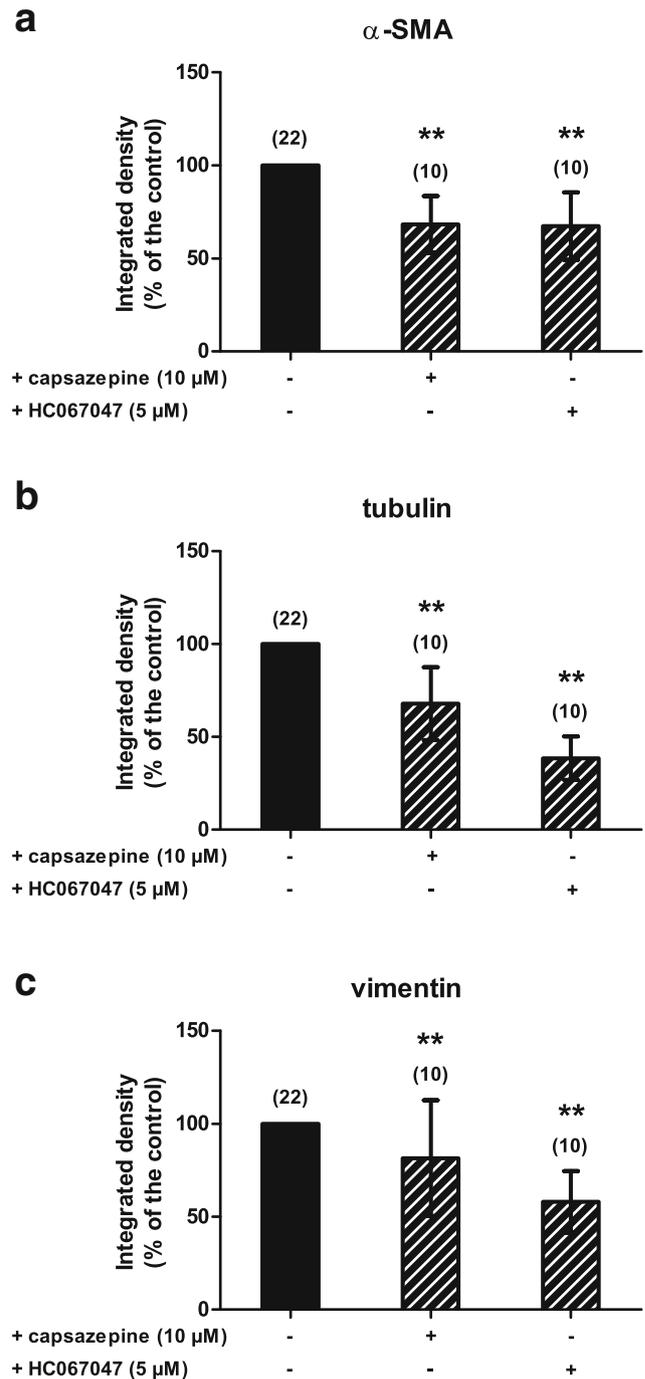
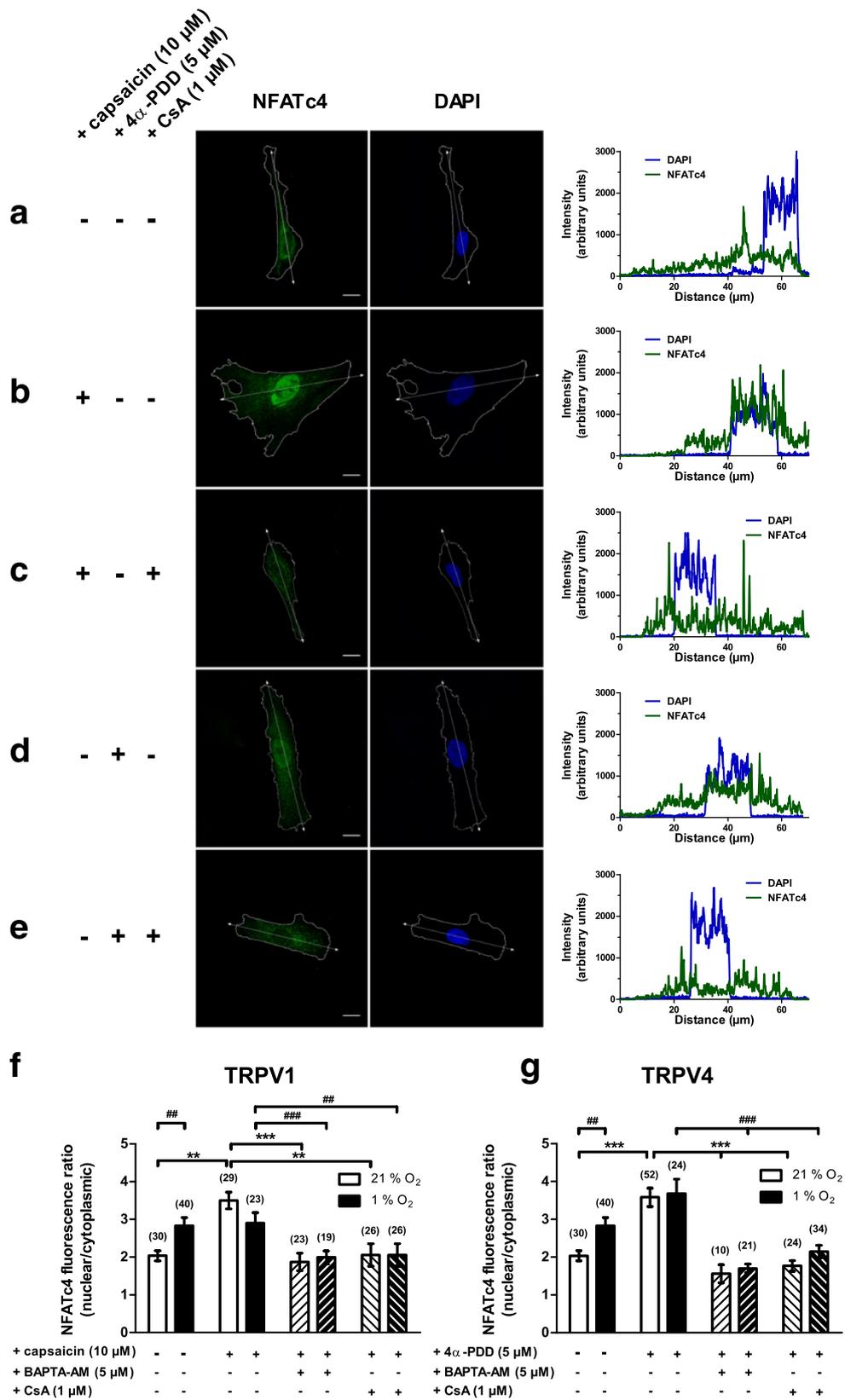


Fig. 9 Involvement of TRPV1 and TRPV4 in the hypoxia-induced cytoskeleton reorganization of PASM. As already described in the legend of the Fig. 8, cells were stained for the F-actin cytoskeleton, and the tubulin and intermediate filament networks using specific antibodies. Quantification of fluorescence is expressed as a percentage of integrated density of untreated cells for α -SMA (**a**), tubulin (**b**), and vimentin (**c**) in presence of capsazepine (10 μ M) or HC067047 (5 μ M) under hypoxic conditions (1 % O₂ for 48 h). Data are mean value \pm S.E.M. The number of independent experiments is indicated in the *brackets*. Significant difference between control hypoxic conditions without antagonist and experimental conditions is indicated by *two asterisks* when $P < 0.01$, Mann-Whitney test



increase in protein was only observed after 48 h of hypoxia exposure.

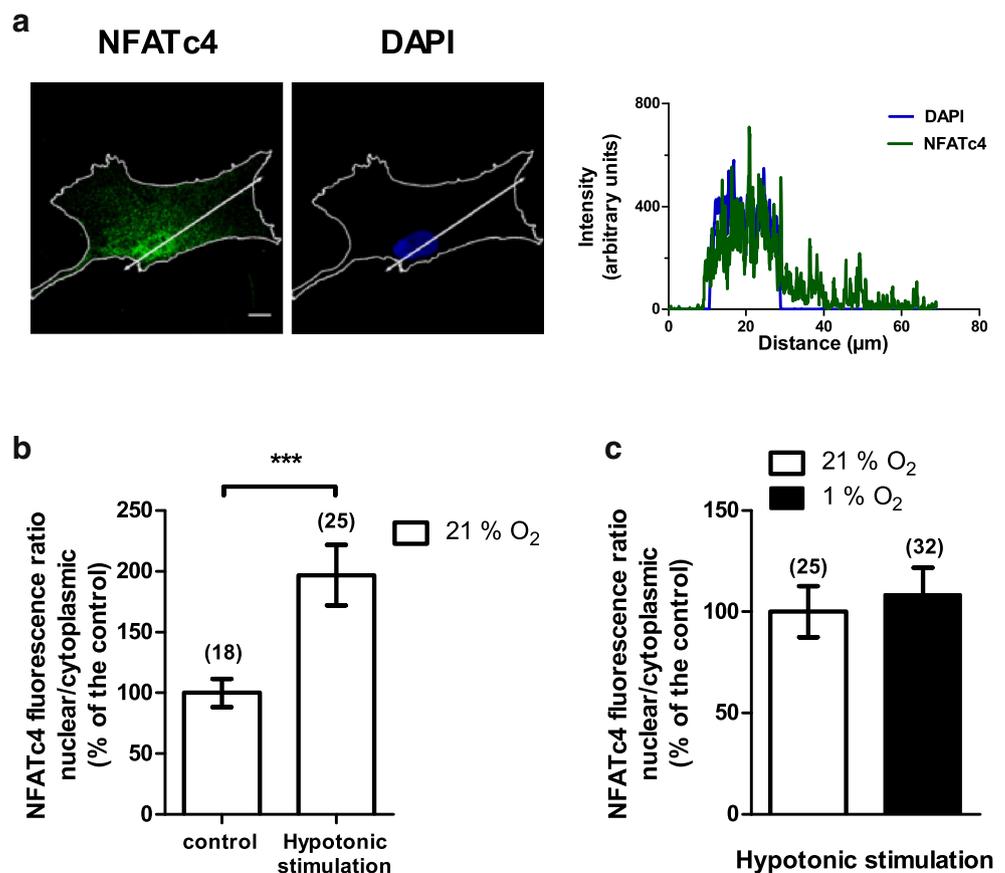
Then, among the different stretch-activated channels expressed in pulmonary artery, we focused our attention on

Fig. 10 Effect of hypoxia on TRPV1- and TRPV4-induced NFATc4 nuclear translocation. **a–e** Representative confocal immunofluorescence fields of NFATc4 staining in rat PASM C cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h). Cell nuclei were stained with DAPI. Cells were stained with a primary antibody for NFATc4 and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. Intensity profiles (*right panel*) were determined for regions indicated by the *double-headed arrows* in cell. **a** Control conditions, **b** treatment with capsaicin (10 μM) for 30 min, **c** pre-treatment with cyclosporin A (CsA, 1 μM) for 30 min followed by 30 min capsaicin stimulation (10 μM), **d** treatment with 4α-PDD (5 μM) for 30 min, **e** pre-treatment with CsA (1 μM) for 30 min followed by 30 min 4α-PDD stimulation (5 μM). *Scale bar*=10 μm. **f, g** Quantification of the NFATc4 fluorescence ratio (nuclear to cytoplasmic) after 30 min incubation with **f** capsaicin (10 μM) or **g** 4α-PDD (5 μM). Data are mean value ± S.E.M. The number of cells is indicated in *brackets*. Significant difference from normoxic (21 % O₂) control conditions is indicated by *two asterisks* ($P<0.01$), or *three asterisks* ($P<0.001$). Significant difference from hypoxic (1 % O₂) control conditions is indicated by *double number sign* ($P<0.01$), or *triple number sign* ($P<0.001$), Mann-Whitney test

TRPV1 and TRPV4 channels since they constitute the molecular basis of SAC [27,40] and are involved in the migration of rat PASM C [25]. Moreover, we and others recently demonstrated that the activity of TRPV4 was increased in PASM C from chronically hypoxic rat [2,49]. In this connection, the present work demonstrates that only the TRPV4-induced and not the TRPV1-induced calcium response was enhanced by in vitro hypoxia exposure (1 % O₂ for 48 h). Similarly, in

some cell types such as human umbilical vascular endothelial (HUVEC) cells, rat hippocampal astrocytes, TRPV4 activity was also increased by hypoxic stimuli [1,34]. Conversely, overnight exposure to hypoxia combined to hyperglycemia potentiated the TRPV1 activity in other cell type such as native rat sensory neurons and human embryonic kidney-derived 293 (HEK293) cells expressing TRPV1 [36]. In others recent studies, acute anoxia increased the TRPV1-induced calcium response in DRG neurons [15], whereas acute hypoxia partly activated basal TRPV1 current and attenuated capsaicin-induced TRPV1 current in HEK293 cells expressing TRPV1 [22]. The aforementioned studies thus demonstrate the complex effects of hypoxia on TRPV channels. One possible explanation is a specific effect of hypoxia on amino acid residues and conformations in the protein, altering intrinsic regulatory mechanism of the channel. Another possibility, considering the high sensitivity of TRPV1 and TRPV4 to a variety of endogenous lipid-derived molecules [43], is that hypoxia modulates the level of their endogenous ligands. Indeed, prolonged exposure of mice to hypoxia increased epoxyeicosatrienoic acid production after 24 h [32]. Finally, hypoxia could also increase expression and/or plasma membrane localization of TRPV. Several studies have revealed that expression of some subtypes of the TRP channels are enhanced by hypoxia. Exposure of rat cultured PASM C to

Fig. 11 Effect of hypoxia on hypotonic solution-induced NFATc4 nuclear translocation. **a** Representative confocal immunofluorescence fields of NFATc4 staining in PASM C cultured under normoxia (21 % O₂ for 48 h) and superfused with hypotonic extracellular solution (225 mOsm/kg) for 15 min. Cell nuclei were stained with DAPI. Cells were stained with a primary antibody for NFATc4 and an Alexa-Fluor 488-conjugated secondary antibody. Intensity profiles (*right panel*) were determined for regions indicated by the *double-headed arrows*. *Scale bar*=10 μm. **b, c** Quantification of the NFATc4 fluorescence ratio (nuclear to cytoplasmic). Data are mean value ± S.E.M. The number of cells is indicated in *brackets*. Significant difference from corresponding control condition is indicated by *three asterisks* ($P<0.001$), Mann-Whitney test



hypoxia increased TRPC1 and TRPC6 expression [47], and similar results were obtained for TRPV1 in human cultured PASMCM [46]. Hypoxia also elicited the membrane translocation of a TRPC6/TRPV5 fusion protein [20]. Our present results based upon qRT-PCR, Western blotting, and immunostaining experiments, revealed that, in rat PASMCM, the expression of TRPV1 and TRPV4 was not enhanced during the first hours of hypoxia exposure, thus favoring the hypothesis of a relocalization of the channels and/or an alteration of their intrinsic properties.

The present study also demonstrates that hypoxia significantly amplified the already described TRPV1- and TRPV4-induced PASMCM migration [25], a crucial step in the progression of PH [30]. Indeed, cell migration is a multifactorial and multistep process that requires a simultaneous change in both cell morphology and adhesion that depend on $[Ca^{2+}]_i$ [16]. However, calcium is not the only actor in the signaling cascade since, whereas the migratory response is more important in response to TRPV1 activation than to TRPV4, the reverse is true concerning the amplitude of the calcium response. Since (i) hypoxia, per se, is associated with changes in cytoskeleton architecture (as shown in the present work) or up-regulation of actin-associated proteins [52] and (ii) Goswami's group recently provided evidence that TRPV1 and TRPV4 directly interact with cytoskeleton [8,9], one can suppose that hypoxia facilitates the TRPV1- and TRPV4-induced depolymerization of microtubules, resulting in an enhanced migratory response.

We next sought to determine the participation of the NFAT transcription factor in these TRPV1 and TRPV4-induced effects. NFAT has been described as an integrator of calcium signaling, playing a crucial role in the physiopathology of PASMCM. Indeed, this transcription factor has been implicated in murine chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with α -SMA up-regulation [3]. Wang et al. also suggested that NFAT activation is involved in hypoxia-induced human PASMCM proliferation [44]. Moreover, it has been demonstrated that TRPV4-mediated Ca^{2+} influx ensures NFAT-dependent gene expression in osteoclasts [26]. Capsaicin-induced TRPV1 activation was also followed by a NFAT nuclear translocation in neurons of dorsal root ganglion (DRG) [21]. In the present study, capsaicin and 4 α -PDD induced comparable nuclear translocation of NFATc4. Since (i) a recent work demonstrated that intermittent hypoxia causes an NFATc3-dependent increase in vasoconstrictor reactivity to endothelin-1 in mouse mesenteric arteries [6] and (ii) hypoxia alters TRPV4-mediated calcium signaling (present study), we speculate that hypoxia could enhance TRPV1- and TRPV4-induced nuclear translocation of NFATc4. The present study further demonstrates that in vitro hypoxia exposure induced NFAT nuclear translocation, but hypoxia did not potentiate the TRPV1- and TRPV4-induced nuclear relocalization observed in normoxia. It is conceivable that NFAT nuclear translocation during hypoxia might stimulate TRPV1 and TRPV4

expression through a positive feedback mechanism thus facilitating agonist-induced responses.

In conclusion, this study demonstrates the effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels, enhancing their migratory induced-response in rat PASMCM. The present findings that in vitro hypoxia exposure affects SAC, TRPV1 and TRPV4 in particular, suggest that these channels could be primary target genes of hypoxia-dependent transcription pathways, playing critical role in the onset of the pathogenesis of hypoxia-induced PH. In addition, once the disease is established, the resulting increased intraluminal pressure and change in transmural pressure are then directly transduced by SAC which might then further enhance vascular remodeling and hyperreactivity, contributing to the exacerbation of the disease.

Acknowledgments The authors thank Dr. Arnaud Courtois for his helpful discussions. This work was supported by the "Fonds de Dotation pour la Recherche en Santé Respiratoire" (grant 2012/2013).

References

1. Butenko O, Dzamba D, Benesova J, Honsa P, Benfenati V, Rusnakova V, Ferroni S, Anderova M (2012) The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia. *PLoS One* 7(6):e39959
2. Dahan D, Ducret T, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Esteve E (2012) Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303(9):L824–L833
3. de Frutos S, Spangler R, Alo D, Bosc LV (2007) NFATc3 mediates chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with alpha-actin up-regulation. *J Biol Chem* 282(20):15081–15089
4. Ducret T, El Arrouchi J, Courtois A, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP (2010) Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats. *Cell Calcium* 48(5):251–259
5. Ducret T, Guibert C, Marthan R, Savineau JP (2008) Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells. *Cell Calcium* 43(4):315–323
6. Friedman JK, Nitta CH, Henderson KM, Codianni SJ, Sanchez L, Ramiro-Diaz JM, Howard TA, Giermakowska W, Kanagy NL, Gonzalez Bosc LV (2014) Intermittent hypoxia-induced increases in reactive oxygen species activate NFATc3 increasing endothelin-1 vasoconstrictor reactivity. *Vasc Pharmacol* 60(1):17–24
7. Gilbert G, Ducret T, Marthan R, Savineau JP, Quignard JF (2014) Stretch-induced Ca^{2+} signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca^{2+} store segregation. *Cardiovasc Res* 103(2):313–323
8. Goswami C, Dreger M, Otto H, Schwappach B, Hucho F (2006) Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1. *J Neurochem* 96(1):254–266
9. Goswami C, Kuhn J, Heppenstall PA, Hucho T (2010) Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells. *PLoS One* 5(7):e11654

10. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6):3440–3450
11. Guibert C, Ducret T, Savineau JP (2008) Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol* 98(1):10–23
12. Guibert C, Ducret T, Savineau J (2011) Ionic channels as therapeutic targets in pulmonary hypertension. *Recent Adv Pulm Vasc Biol* 57–90
13. Guibert C, Ducret T, Savineau JP (2011) Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells. *Adv Exp Med Biol* 704:687–706
14. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ (1981) Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391(2):85–100
15. Henrich M, Buckler KJ (2009) Acid-evoked Ca²⁺ signalling in rat sensory neurones: effects of anoxia and aglycaemia. *Pflugers Arch* 459(1):159–181
16. House SJ, Potier M, Bisailon J, Singer HA, Trebak M (2008) The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease. *Pflugers Arch* 456(5):769–785
17. Humbert M, Sitbon O, Simonneau G (2004) Treatment of pulmonary arterial hypertension. *N Engl J Med* 351(14):1425–1436
18. Inoue R, Jian Z, Kawarabayashi Y (2009) Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology. *Pharmacol Ther* 123(3):371–385
19. Jeffery TK, Wanstall JC (2001) Pulmonary vascular remodelling in hypoxic rats: effects of amlodipine, alone and with perindopril. *Eur J Pharmacol* 416(1–2):123–131
20. Keseru B, Barbosa-Sicard E, Popp R, Fisslthaler B, Dietrich A, Gudermann T, Hammock BD, Falck JR, Weissmann N, Busse R, Fleming I (2008) Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response. *FASEB J* 22(12):4306–4315
21. Kim MS, Usachev YM (2009) Mitochondrial Ca²⁺ cycling facilitates activation of the transcription factor NFAT in sensory neurons. *J Neurosci* 29(39):12101–12114
22. Kim KS, Yoo HY, Park KS, Kim JK, Zhang YH, Kim SJ (2012) Differential effects of acute hypoxia on the activation of TRPV1 by capsaicin and acidic pH. *J Physiol Sci* 62(2):93–103
23. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265–275
24. Mandegar M, Fung YC, Huang W, Remillard CV, Rubin LJ, Yuan JX (2004) Cellular and molecular mechanisms of pulmonary vascular remodeling: role in the development of pulmonary hypertension. *Microvasc Res* 68(2):75–103
25. Martin E, Dahan D, Cardouat G, Gillibert-Duplantier J, Marthan R, Savineau JP, Ducret T (2012) Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells. *Pflugers Arch* 464(3):261–272
26. Masuyama R, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, Carmeliet G (2008) TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab* 8(3):257–265
27. Mochizuki T, Sokabe T, Araki I, Fujishita K, Shibasaki K, Uchida K, Naruse K, Koizumi S, Takeda M, Tominaga M (2009) The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures. *J Biol Chem* 284(32):21257–21264
28. Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y (2003) TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res* 93(9):829–838
29. Penumatsa KC, Toksoz D, Warburton RR, Hilmer AJ, Liu T, Khosla C, Comhair SA, Fanburg BL (2014) Role of hypoxia-induced transglutaminase 2 in pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 307(7):L576–L585. doi:10.1152/ajplung.00162.2014
30. Pietra GG, Capron F, Stewart S, Leone O, Humbert M, Robbins IM, Reid LM, Tuder RM (2004) Pathologic assessment of vasculopathies in pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 43(12 Suppl S):25S–32S
31. Platoshyn O, Yu Y, Golovina VA, McDaniel SS, Krick S, Li L, Wang JY, Rubin LJ, Yuan JX (2001) Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 280(4):L801–L812
32. Pokreisz P, Fleming I, Kiss L, Barbosa-Sicard E, Fisslthaler B, Falck JR, Hammock BD, Kim IH, Szelid Z, Vermeersch P, Gillijns H, Pellens M, Grimminger F, van Zonneveld AJ, Collen D, Busse R, Janssens S (2006) Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling. *Hypertension* 47(4):762–770
33. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L (1979) Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features. *Am J Physiol* 236(6):H818–H827
34. Rath G, Saliez J, Behets G, Romero-Perez M, Leon-Gomez E, Bouzin C, Vriens J, Nilius B, Feron O, Dessy C (2012) Vascular hypoxic preconditioning relies on TRPV4-dependent calcium influx and proper intercellular gap junctions communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32(9):2241–2249
35. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704–1709
36. Ristoiu V, Shibasaki K, Uchida K, Zhou Y, Ton BH, Flonta ML, Tominaga M (2011) Hypoxia-induced sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 involves activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and PKC. *Pain* 152(4):936–945
37. Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, Souza R (2009) Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54(1 Suppl):S43–S54
38. Song S, Yamamura A, Yamamura H, Ayon RJ, Smith KA, Tang H, Makino A, Yuan JX (2014) Flow shear stress enhances intracellular Ca²⁺ signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension. *Am J Physiol Cell Physiol* 307(4):C373–C383. doi:10.1152/ajpcell.00115.2014
39. Soya M, Sato M, Sobhan U, Tsumura M, Ichinohe T, Tazaki M, Shibukawa Y (2014) Plasma membrane stretch activates transient receptor potential vanilloid and ankyrin channels in Merkel cells from hamster buccal mucosa. *Cell Calcium* 55(4):208–218
40. Spencer NJ, Kerrin A, Singer CA, Hennig GW, Gerthoffer WT, McDonnell O (2008) Identification of capsaicin-sensitive rectal mechanoreceptors activated by rectal distension in mice. *Neuroscience* 153(2):518–534
41. Stenmark KR, Meyrick B, Galie N, Mooi WJ, McMurtry IF (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: the hope for etiological discovery and pharmacological cure. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 297(6):L1013–L1032
42. Sylvester JT, Shimoda LA, Aaronson PI, Ward JP (2012) Hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Physiol Rev* 92(1):367–520
43. Vriens J, Appendino G, Nilius B (2009) Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 75(6):1262–1279
44. Wang C, Li JF, Zhao L, Liu J, Wan J, Wang YX, Wang J, Wang C (2009) Inhibition of SOC/Ca²⁺/NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells. *Respir Res* 10:123

45. Wang J, Shimoda LA, Sylvester JT (2004) Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286(4):L848–L858
46. Wang YX, Wang J, Wang C, Liu J, Shi LP, Xu M, Wang C (2008) Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells. *J Membr Biol* 223(3):151–159
47. Wang J, Weigand L, Lu W, Sylvester JT, Semenza GL, Shimoda LA (2006) Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 98(12):1528–1537
48. Yaghi A, Sims SM (2005) Constrictor-induced translocation of NFAT3 in human and rat pulmonary artery smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(6):L1061–L1074
49. Yang XR, Lin AH, Hughes JM, Flavahan NA, Cao YN, Liedtke W, Sham JS (2012) Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302(6):L555–L568
50. Yang XR, Lin MJ, McIntosh LS, Sham JS (2006) Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(6):L1267–L1276
51. Yoo HY, Park SJ, Seo EY, Park KS, Han JA, Kim KS, Shin DH, Earm YE, Zhang YH, Kim SJ (2012) Role of thromboxane A₂-activated nonselective cation channels in hypoxic pulmonary vasoconstriction of rat. *Am J Physiol Cell Physiol* 302(1):C307–C317. doi:10.1152/ajpcell.00153.2011
52. Zhang R, Zhou L, Li Q, Liu J, Yao W, Wan H (2009) Up-regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 41(4):467–475

2.3. Résultats complémentaires à ceux de l'article

De nombreuses études montrent le rôle clé du facteur NFAT dans le développement et le maintien de l'HTP [148, 312]. Cependant, plusieurs isoformes du NFAT sont exprimées dans les CMLAP [148, 154, 155], et de nombreux stimuli sont capables d'activer cette voie, tels que la phényléphrine [155] et l'hypoxie [148].

Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer quelle(s) isoforme(s) du NFAT étai(en)t activée(s) par l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ induite par l'ouverture des SAC. Les isoformes NFATc3 et NFATc4 sont les deux isoformes majoritairement exprimées dans les CMLAP [148, 155]. Mais, à l'heure actuelle, aucune n'est décrite comme étant activée par l'ouverture d'un SAC. Une étude montre la translocation nucléaire de NFATc1 par l'influx calcique induit par l'activation de TRPV4 au cours de la différenciation des ostéoclastes [313]. Nous avons donc testé ces trois isoformes après la stimulation de TRPV1 et TRPV4 par des expériences d'immunofluorescence.

Des marquages immunofluorescents pour NFATc1, NFATc3 et NFATc4 dans les cellules contrôles montrent un marquage diffus cytoplasmique (Figure 50) et [311]. L'application de 4 α -PDD (5 μ M) ou de capsaïcine (10 μ M), agonistes respectifs de TRPV4 et TRPV1, induit une translocation nucléaire reproductible de l'isoforme NFATc4 [311], mais pas des isoformes NFATc1 et NFATc3 (Figure 50).

Le traitement avec l'un ou l'autre des agonistes à différentes durées, révèle que le pourcentage maximal de cellules présentant un marquage nucléaire pour le NFATc4 intervient à 30 minutes d'incubation (Figure 51 et Figure 52).

Ces résultats montrent que l'activation de l'un ou l'autre des canaux TRPV1 et TRPV4 permet seulement la translocation nucléaire de l'isoforme NFATc4. De nombreux travaux montrent pourtant une intervention prépondérante de l'isoforme NFATc3 dans le muscle lisse pulmonaire, et plus particulièrement dans l'HTP. En effet, l'exposition à une hypoxie chronique provoque la translocation nucléaire de cette isoforme dans les artères intrapulmonaires de souris [148]. De plus, les souris knock-out pour cette isoforme présentent un épaissement moindre de la média dans un contexte d'HTP [148]. Une autre étude présente NFATc1 comme cible de l'influx calcique médié par TRPV4 dans la différenciation des ostéoclastes [314]. Parallèlement, dans une étude de A. Yaghi et S. M. Sims [155], seule l'isoforme NFATc4 est activé par la stimulation d'un vasoconstricteur (phényléphrine), mais aussi par le 20-HETE, récemment montré comme activateur de TRPV1 [271]. Nos résultats suggèrent donc une voie de signalisation couplant NFATc4 et TRPV1/V4 dans les CMLAP, différentes des voies préalablement décrites impliquant NFATc3.

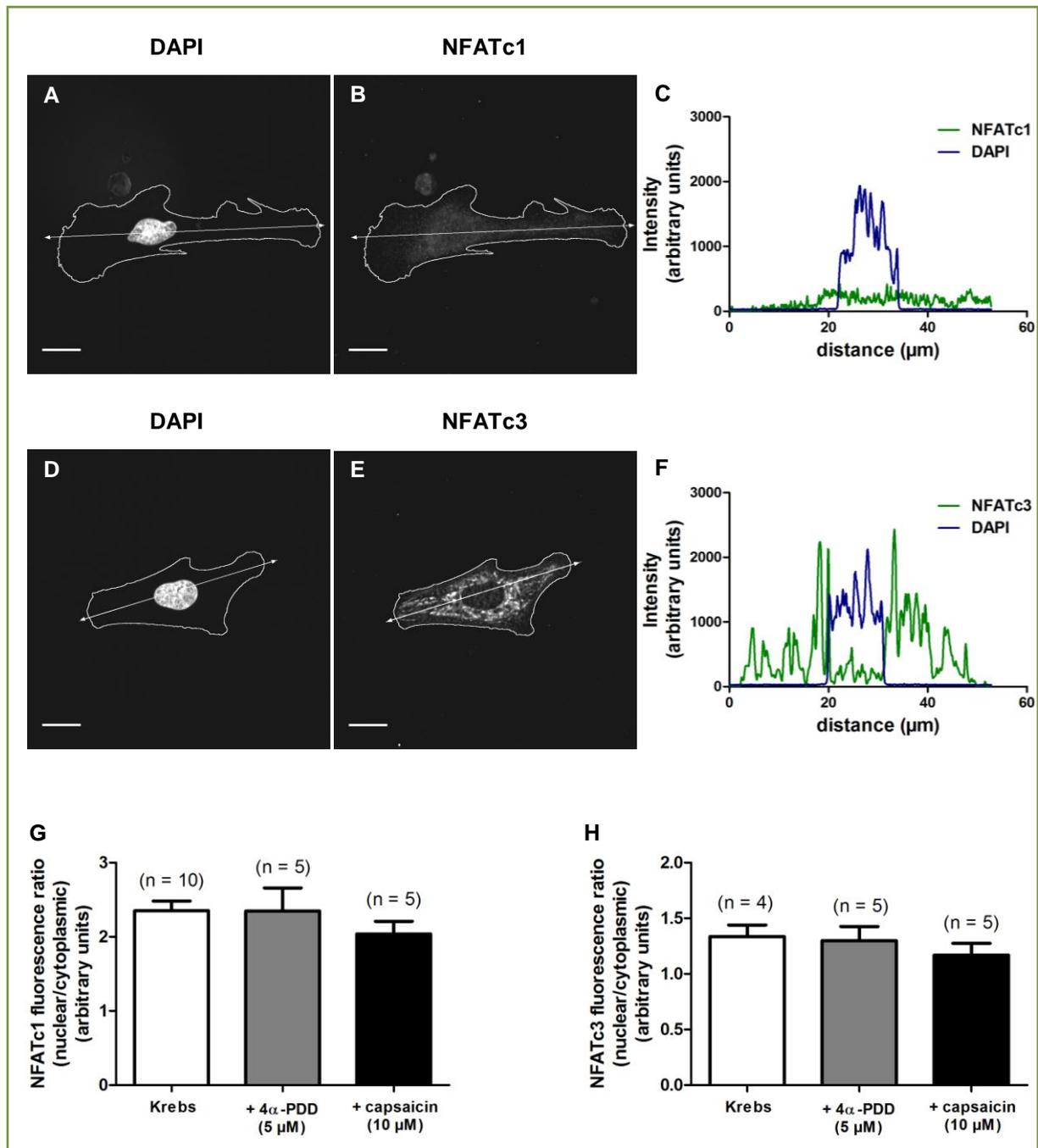


Figure 50 : Expression de NFATc1, et NFATc3 dans des CMLAP de rat.

Images obtenues par immunofluorescence confocale montrant l'expression des isoformes NFATc1 et NFATc3 dans des CMLAP de rat. Les cellules ont été marquées pour le NFAT (B et E), les noyaux ont été marqués au DAPI (A et D). (C et F) profil de l'intensité de fluorescence du DAPI (en bleu) et du NFATc1 (C en vert) ou NFATc3 (F en vert) le long de la double flèche (A-B et D-E). La barre d'échelle représente 10 μm. (G et H) Translocation des isoformes NFATc1 et NFATc3 après stimulation au 4α-PDD (5 μM) ou à la capsaïcine (10 μM) pendant 30 minutes. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± SEM. (n) indique le nombre de cellules étudiées.

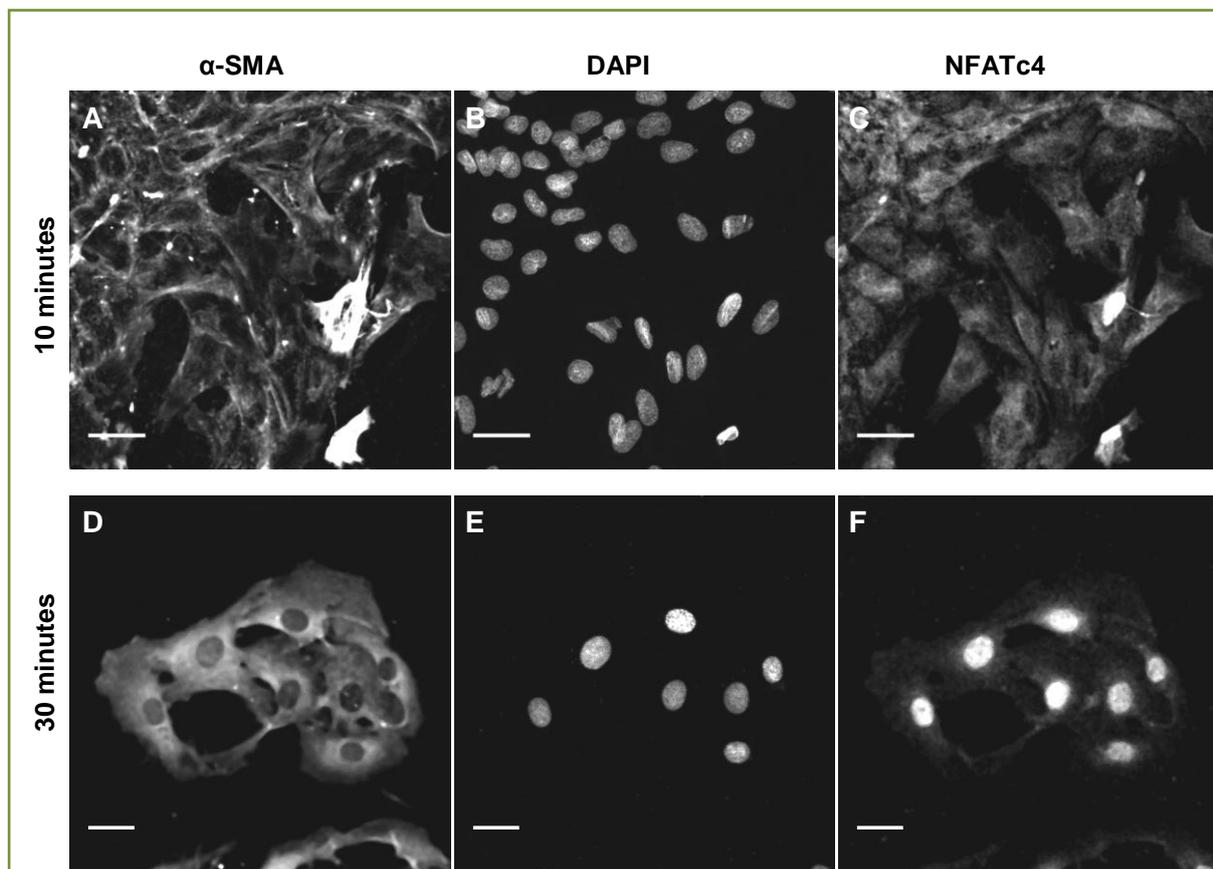


Figure 51 : Cinétique de la translocation de NFATc4 induite par la stimulation de TRPV1.

(A-C) CMLAP incubées pendant 10 minutes avec du 4α-PDD (5 μM).

(D-F) CMLAP incubées pendant 30 minutes avec du 4α-PDD (5 μM). Les cellules ont été marquées pour l'α actine du muscle lisse (α-SMA) (A et D), et pour NFATc4 (C et F). Les noyaux sont marqués au DAPI (B et E). La barre d'échelle représente 25 μm.

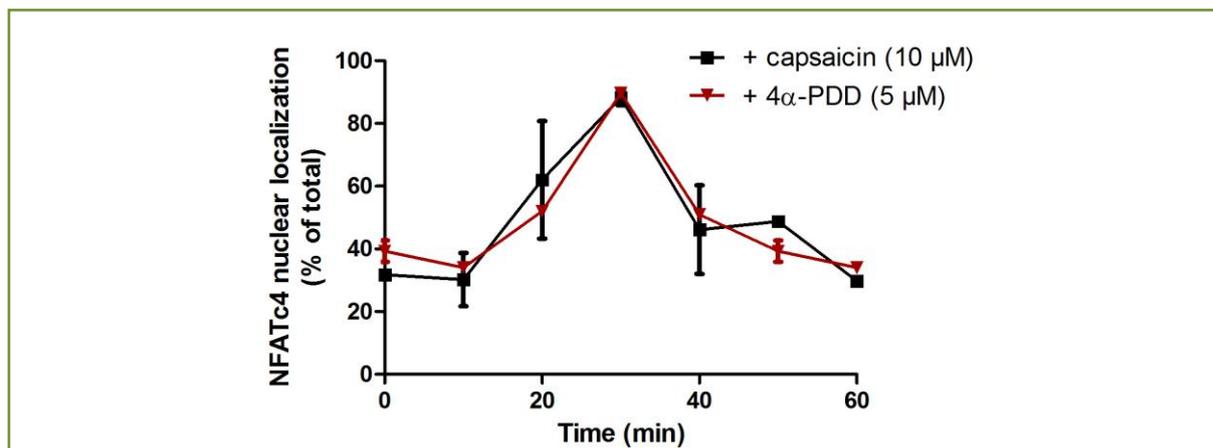


Figure 52 : Translocation nucléaire de NFATc4 au cours du temps suite à la stimulation de TRPV1 et TRPV4.

Translocation nucléaire induite par l'application de 4α-PDD (5 μM) ou de capsaïcine (10 μM) en fonction du temps. Les cellules ont été incubées pendant le temps indiqué sur l'axe des abscisses. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± SEM. Expérience réalisée sur des CMLAP issues de trois animaux.

2.4. Conclusion effet de l'hypoxie

Les résultats obtenus précédemment montrent un effet direct de l'hypoxie sur l'activation des canaux TRPV1 et TRPV4 dans les CMLAP de rat. Cependant, ce type de conditionnement ne permet pas de mimer entièrement un phénotype de CMLAP issue de rat hypoxique chronique. En effet, la surexpression des canaux TRPV1 et TRPV4, observée dans le modèle animal n'est pas présente après le conditionnement *in vitro*. Il est donc tout à fait pertinent d'évaluer l'implication du stress mécanique sur ces cellules indépendamment de l'influence de l'hypoxie. Est-ce que le facteur "stress mécanique" est impliqué dans les mécanismes précoces de l'établissement d'une HTP en induisant une surexpression des SAC, ou agit-il uniquement comme stimulus, participant à la suractivation des SAC déjà modulés par l'hypoxie ?

3. L'étirement exerce-t-il un effet direct sur les canaux TRPV4 dans les CMLAP ?

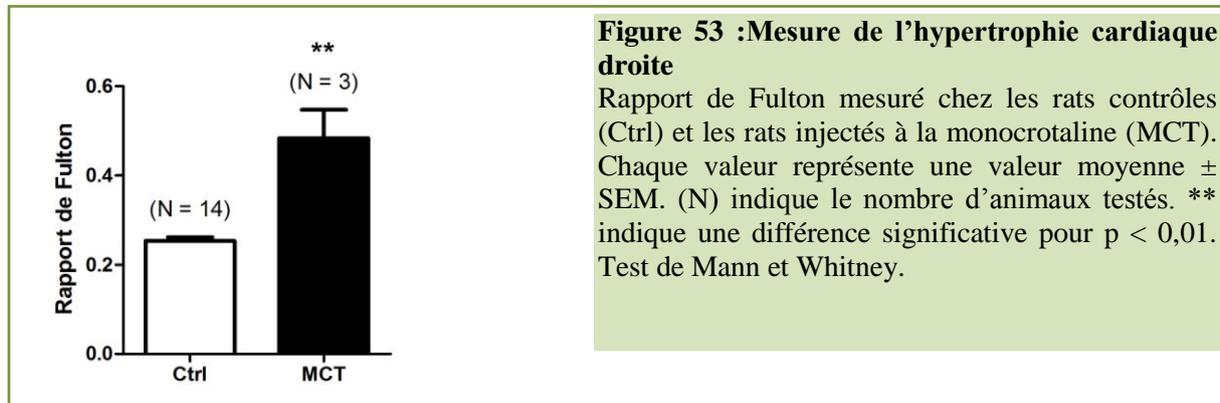
Les CML vasculaires sont, de par leur localisation, **exposées continuellement à des contraintes mécaniques**. Les CMLAP de patients souffrant d'HTP sont sujettes à des contraintes excessives dues à l'augmentation de la pression sanguine. Ces contraintes mécaniques peuvent influencer les fonctions cellulaires telles que la migration ou la prolifération, comme cela a été montré dans les CML d'artères systémiques où l'étirement cyclique potentialise la prolifération [125].

Le but de cette étude est donc d'explorer *in vitro* l'influence d'un stress mécanique en s'affranchissant de la composante hypoxique intervenant dans le modèle des animaux hypoxiques chroniques couramment utilisés dans le domaine de l'étude de l'HTP. Grâce à une collaboration avec le Pr Philippe Gailly de l'Université Catholique de Louvain, nous avons pu obtenir des souris mutées pour TRPV4 (souris knock-out pour *trpv4*). Ce modèle nous permet de combiner l'extinction du gène *trpv4* avec des outils pharmacologiques. De plus, dans la mesure où TRPV4 est l'isoforme des TRPV la plus exprimée dans les CMLAP [248, 278], mais également l'isoforme présentant les réponses calciques les plus importantes [87] et les plus augmentées lors de l'HTP, nous avons donc décidé de focaliser ce deuxième aspect de l'étude uniquement, sur cette isoforme. TRPV4 est notamment impliqué lors de la vasoconstriction hypoxique [242], et est donc sujette au stress mécanique engendré par cette contraction. De plus, cette isoforme est également impliquée dans la réponse contractile à la 5-HT [296, 297], dont la concentration circulante est augmentée chez les patients HTP [51]. Enfin, des travaux du laboratoire montrent un rôle de TRPV4 dans la migration des CMLAP [87]. Ces critères suggèrent un rôle majeur de ce canal lors de l'établissement de l'HTP.

Les modèles d'animaux hypoxiques chroniques développent une surexpression et une suractivation des canaux TRPV4. Mais est-ce que ces observations peuvent être induites par l'augmentation des tensions pariétales ? Tout d'abord, nous avons donc voulu voir si l'augmentation du stress mécanique pouvait être assez importante pour induire une suractivation de TRPV4 dans un modèle *in vivo*. Pour cela, nous avons comparé les réponses calciques induites par l'activation de TRPV4 dans des CMLAP issues de rats "monocrotaline" à des CMLAP issues de rats sains. Bien que ce modèle d'HTAP comporte une forte composante immunologique, ainsi qu'une dysfonction endothéliale importante, le modèle du rat "monocrotaline" pourrait nous permettre d'évaluer le rôle de l'augmentation des tensions pariétales sans intervention de l'hypoxie.

3.1. Utilisation du rat "monocrotaline"

Au terme des quatre semaines suivant l'injection de la monocrotaline, temps nécessaire au développement de l'HTAP, l'hypertrophie cardiaque droite a été évaluée par la mesure du rapport de Fulton afin de vérifier l'état hypertendu des animaux. Dans le groupe des rats "monocrotaline", ce rapport est significativement augmenté de $0,25 \pm 0,01$ à $0,48 \pm 0,06$ (Figure 53).



3.2. Activation des SAC

L'HTAP se caractérise par une perturbation de l'homéostasie calcique au niveau des CMLAP. Nous avons suivi les variations de la $[Ca^{2+}]_i$ suite à une stimulation des canaux SAC par un étirement de la membrane plasmique dû à l'application d'une solution hypotonique (225 mOsm). L'application de cette solution hypotonique pendant deux minutes induit une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ de 107 ± 11 nM ($n = 30$) dans les CMLAP issues de rats contrôles (Figure 54). En revanche, l'amplitude de la réponse calcique dans les CMLAP issues de rats "monocrotaline" est de 418 ± 42 nM ($n = 31$) (Figure 54). Cette valeur est significativement plus importante que dans les CMLAP contrôles.

Afin de vérifier que cette élévation de la $[Ca^{2+}]_i$ correspond bien à un influx calcique à travers les SAC, ces mêmes expériences ont été réalisées en présence d'inhibiteurs des SAC : la streptomycine (200 μ M), le gadolinium (100 μ M) et la GsMTx-4 (5 μ M).

En présence de 200 μ M de streptomycine, les cellules analysées présentent une augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$, significativement plus faible (164 ± 36 nM ; $n = 18$) que celle observée pour les CMLAP de rats "monocrotaline" en absence de streptomycine (Figure 54). L'amplitude des réponses est également significativement plus faible en présence de GsMTx-4 (5 μ M), elle est de 133 ± 51 nM ($n = 12$), et de 59 ± 10 nM ($n = 19$) en présence de gadolinium (100 μ M) (Figure 54).

Nos résultats montrent une amplitude de la réponse calcique induite par choc osmotique plus importante dans les CMLAP issues de rats "monocrotaline" et suggèrent une implication des SAC.

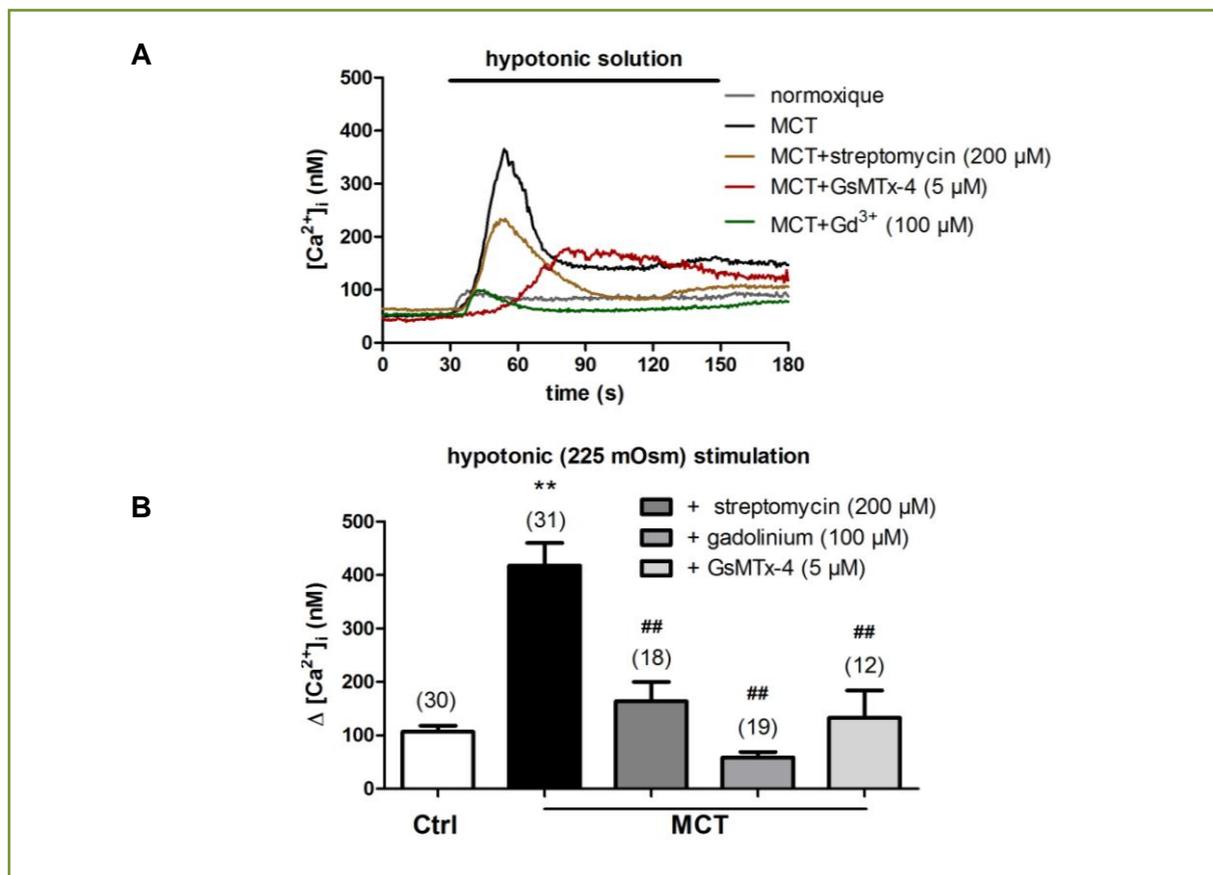


Figure 54 : Mesure de la [Ca²⁺]_i suite à la stimulation des SAC.

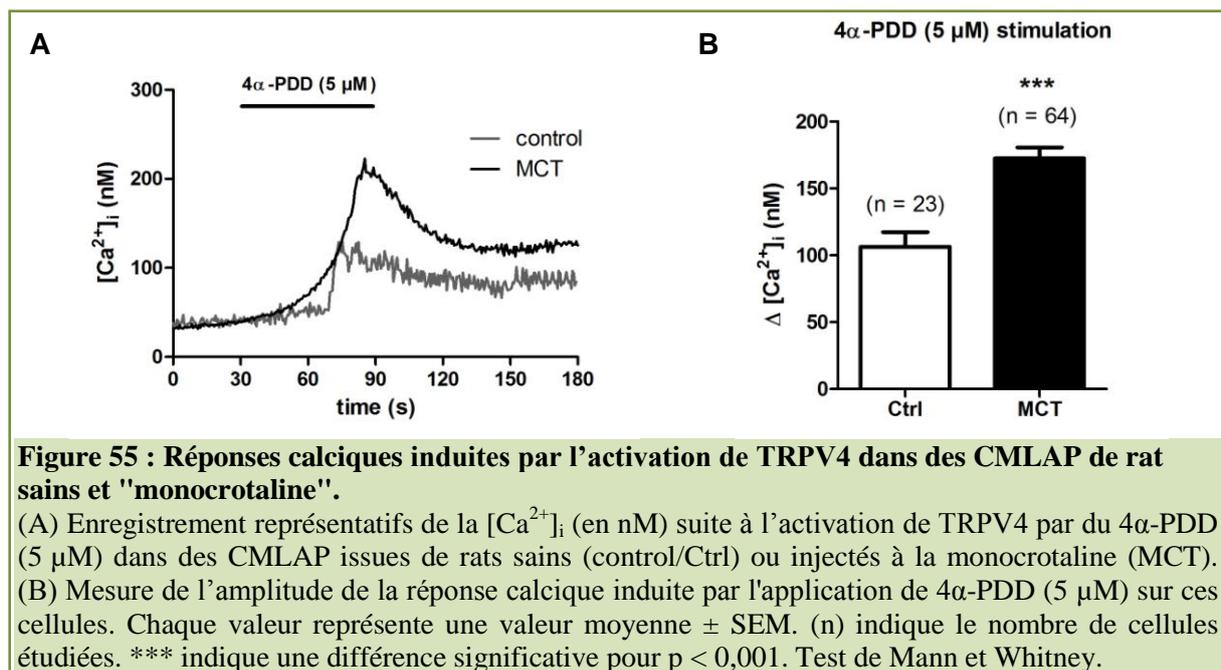
(A) Enregistrement des réponses calciques suite à l'application d'une solution hypotonique (225 mOsm) sur des CMLAP issues de rats contrôles (ctrl, en gris) ou de rats injectés à la monocrotaline (MCT, en noir), en absence ou présence d'inhibiteurs des SAC : streptomycine (200 μM, en brun), gadolinium (Gd³⁺ : 100 μM, en vert) et GsMTx-4 (5 μM, en rouge). (B) Mesure de l'amplitude de la [Ca²⁺]_i. Chaque valeur représente une valeur moyenne ± SEM. Le chiffre entre parenthèse indique le nombre de cellules étudiées. ** indique une différence significative pour p < 0,01 par rapport aux cellules contrôles et ## indique une différence significative pour p < 0,01 par rapport aux CMLAP issues de rat "monocrotaline" en absence d'inhibiteur. Test de Mann et Whitney.

3.3. Activation de TRPV4

Dans la suite des expériences, nous avons voulu étudier l'activation de TRPV4. L'amplitude de la réponse calcique induite par l'activation de TRPV4 par le 4α-PDD (5 μM) est significativement augmentée dans les CMLAP issues de rats "monocrotaline" par rapport aux CMLAP issues de rats contrôles, et présentent une amplitude de 173 ± 8 nM (n = 64) et 106 ± 11 nM (n = 23) respectivement (Figure 55). Ces résultats montrent donc une suractivation de TRPV4 dans l'HTAP indépendamment de l'hypoxie. On peut suggérer une action de l'augmentation des tensions pariétales engendrées par l'hypertension, sur les canaux TRPV4. Cependant ce modèle *in vivo* développe une forte dysfonction endothéliale, ne nous permettant pas d'attribuer ces résultats à l'effet du stress mécanique seul, mais il montre qu'*in vivo* l'hypoxie n'est pas indispensable pour induire une suractivation de TRPV4.

Nous avons donc développé un modèle cellulaire *in vitro* afin d'étudier l'action du stress mécanique, indépendamment de tout autre facteur sur l'activité et l'expression des canaux TRPV4, mais également sur la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires. De la même manière que pour l'hypoxie, nous avons exposé des CMLAP de souris (pour tirer parti de l'utilisation de la souris *trpv4* knock-out) à un étirement uniaxial cyclique *in vitro*.

Dès leur achèvement, les résultats présentés dans cette partie devraient donner lieu à la rédaction d'un second article dont je serai le premier auteur : "**Cyclic mechanical stretch activates TRPV4-mediated pulmonary arterial smooth muscle cell reorientation and proliferation**".



3.4. Description du modèle d'étirement *in vitro*

Nous avons cultivé des cellules musculaires lisses d'artères intrapulmonaires de **souris saines normoxiques** sur un support flexible, une chambre en silicone préalablement recouverte d'une matrice de collagène I (3,66 mg/mL), et les avons soumises à un étirement cyclique (1 Hz, à 10 % ou 20 % d'étirement) en utilisant le système STREX STX-140-10 (B-bridge international).

Un étirement cyclique permet de mimer en partie les variations de tension pariétale intervenant au cours du cycle cardiaque (variations de tension correspondantes au cycle systole/diastole). Cependant, notons que la fréquence de ce cycle est nettement plus élevée chez les rongeurs, et en particulier chez la souris (environ 500 à 600 pulsations/minute), que chez l'Homme (environ 70 pulsations/minute au repos). La fréquence d'étirement de 1 Hz imposée par l'appareil (60 cycles/minute) est la fréquence maximale imposable au système.

3.5. Effet de l'étirement sur l'activité de TRPV4

Nous avons ensuite cherché à caractériser l'effet d'un étirement cyclique sur l'activité des canaux TRPV4 de CMLAP de souris. Nous avons donc réalisé des expériences d'imagerie calcique à l'aide de la sonde fluorescente Fura-PE3/AM, en stimulant les cellules avec du 4 α -PDD (5 μ M), agoniste de TRPV4.

Le conditionnement à l'étirement (10 ou 20 %, 1 Hz) pendant 24 heures ne permet pas d'observer de différences significatives du ratio de fluorescence basal ($\lambda_{340\text{nm}} / \lambda_{380\text{nm}}$) (avant stimulation) entre les cellules ayant subi un conditionnement à l'étirement de 10 ou 20 % ($10,5 \pm 0,6$; n = 12 et $10,8 \pm 0,8$; n = 29 respectivement) et les cellules contrôles ($11,2 \pm 0,4$; n = 59) (Figure 56 C). Après stimulation des CMLAP avec le 4 α -PDD (5 μ M) on observe une augmentation du ratio de fluorescence (Figure 56 A). Cette réponse est transitoire, nous observons ensuite un retour à la valeur basale.

L'amplitude du ratio de fluorescence suite à l'activation de TRPV4 n'est pas modifiée après un conditionnement à l'étirement (10 %, 1 Hz, 24 heures). En effet, on observe une amplitude du ratio de fluorescence de $2,6 \pm 0,2$ (n = 59) en conditions contrôles et de $1,7 \pm 0,3$ (n = 12), dans les CMLAP soumises à un étirement de 10 % (1 Hz) pendant 24 heures (Figure 56 D). À l'inverse, un stress mécanique plus important (20%, 1 Hz) pendant 24 heures provoque une augmentation significative de l'amplitude par rapport aux cellules contrôles avec un Δ ratio de $5,0 \pm 0,6$, (n = 29) (Figure 56 D). De plus, on observe également une augmentation significative de la pente de la courbe, avec $0,24 \pm 0,04 \Delta\text{ratio}\cdot\text{s}^{-1}$ (n = 29) après conditionnement à l'étirement (24 heures, 20 %, 1 Hz) et $0,13 \pm 0,02 \Delta\text{ratio}\cdot\text{s}^{-1}$ (n = 59) en conditions contrôles (Figure 56 E). Le conditionnement à un étirement de 20 % durant 24 heures induit donc une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ significativement plus forte et plus rapide suite à l'activation de TRPV4 par son agoniste le 4 α -PDD (5 μ M). Les cellules issues de souris TRPV4-KO ne montrent aucune variation de la fluorescence émise suite à la stimulation avec le 4 α -PDD (Figure 56 B), aussi bien en conditions contrôles qu'après 24 heures d'étirement, contrairement aux cellules issues de souris WT. Ces résultats prouvent la spécificité de l'agoniste utilisé pour ces expériences.

Nous avons ensuite voulu confirmer ces résultats grâce à des expériences de patch-clamp en configuration "cellule entière" afin de réaliser des courbes I/V suite à l'activation de TRPV4 par du 4 α -PDD (5 μ M). En conditions contrôles, l'amplitude du courant généré à -80 mV est de $-12,1 \pm 5,7$ pA/pF (n = 5), versus de $-31,1 \pm 13,3$ pA/pF (n = 6) après 24 heures d'étirement (20 %, 1 Hz) (Figure 56 F et G). En raison du faible nombre de cellules stimulées lors de ces expériences préliminaires, cette augmentation d'amplitude n'est pas significative et nécessite la poursuite des enregistrements électrophysiologiques.

Ces premiers résultats montrent que l'étirement uniaxial cyclique module la réponse calcique induite par l'activation de TRPV4 dans les CMLAP. En effet, 24 heures de conditionnement à un stress mécanique sont suffisantes pour induire une augmentation significative de la réponse calcique induite par l'activation du canal TRPV4.

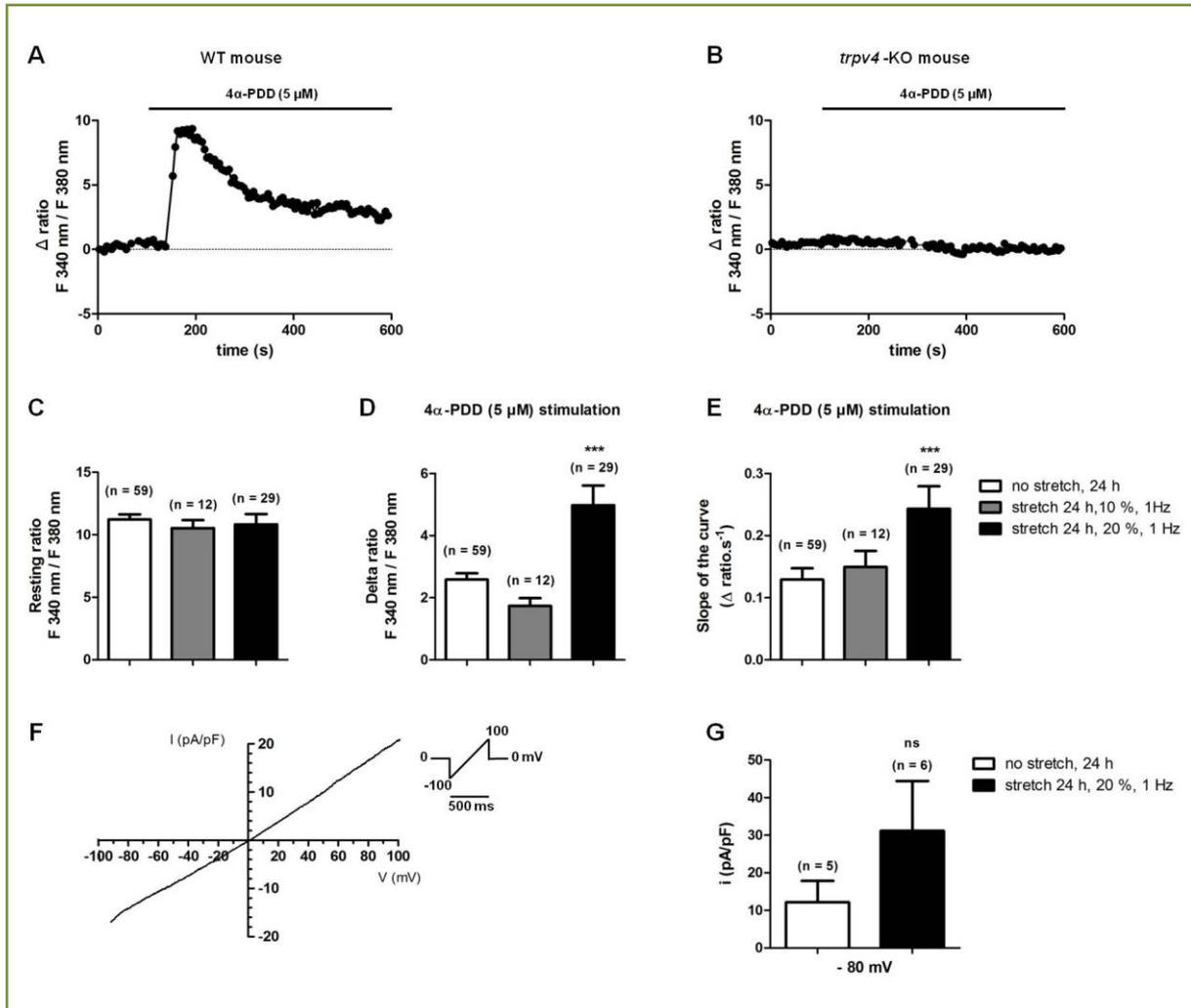


Figure 56 : Effet de l'étirement sur l'activité de TRPV4.

(A) Réponses calciques induites par l'application de 4α-PDD (5 μM) sur des CMLAP issues de souris WT ou TRPV4-KO (B). (C) Ratio de fluorescence basale, (D) amplitude de la réponse calcique et (E) pente de l'augmentation du ratio de fluorescence en Δratio.s⁻¹, induite par l'application de 4α-PDD (5 μM) sur CMLAP issues de souris WT soumises à un étirement uniaxial cyclique (1 Hz, 24 heures) de 10 % (en gris) ou 20 % (en noir) ou non (en blanc). (F) Enregistrement électrophysiologique en configuration cellule entière montrant un courant représentatif après application de 4α-PDD (5 μM) sur des CMLAP de souris WT en absence de conditionnement à l'étirement. (G) Amplitude du courant à -80 mV de CMLAP stimulées au 4α-PDD (5 μM) après conditionnement à un étirement uniaxial cyclique (1 Hz, 24 heures) de 20 % (en noir) ou non (en blanc). Chaque valeur représente une valeur moyenne ± SEM. (n) indique le nombre de cellules étudiées. *** indique une différence significative pour p < 0,001 par rapport au contrôle sans étirement. ns : non significatif. (C-E) Test de Kruskal et Wallis et (G) test de Mann et Whitney.

3.6. Effet de l'étirement sur la localisation cellulaire de TRPV4

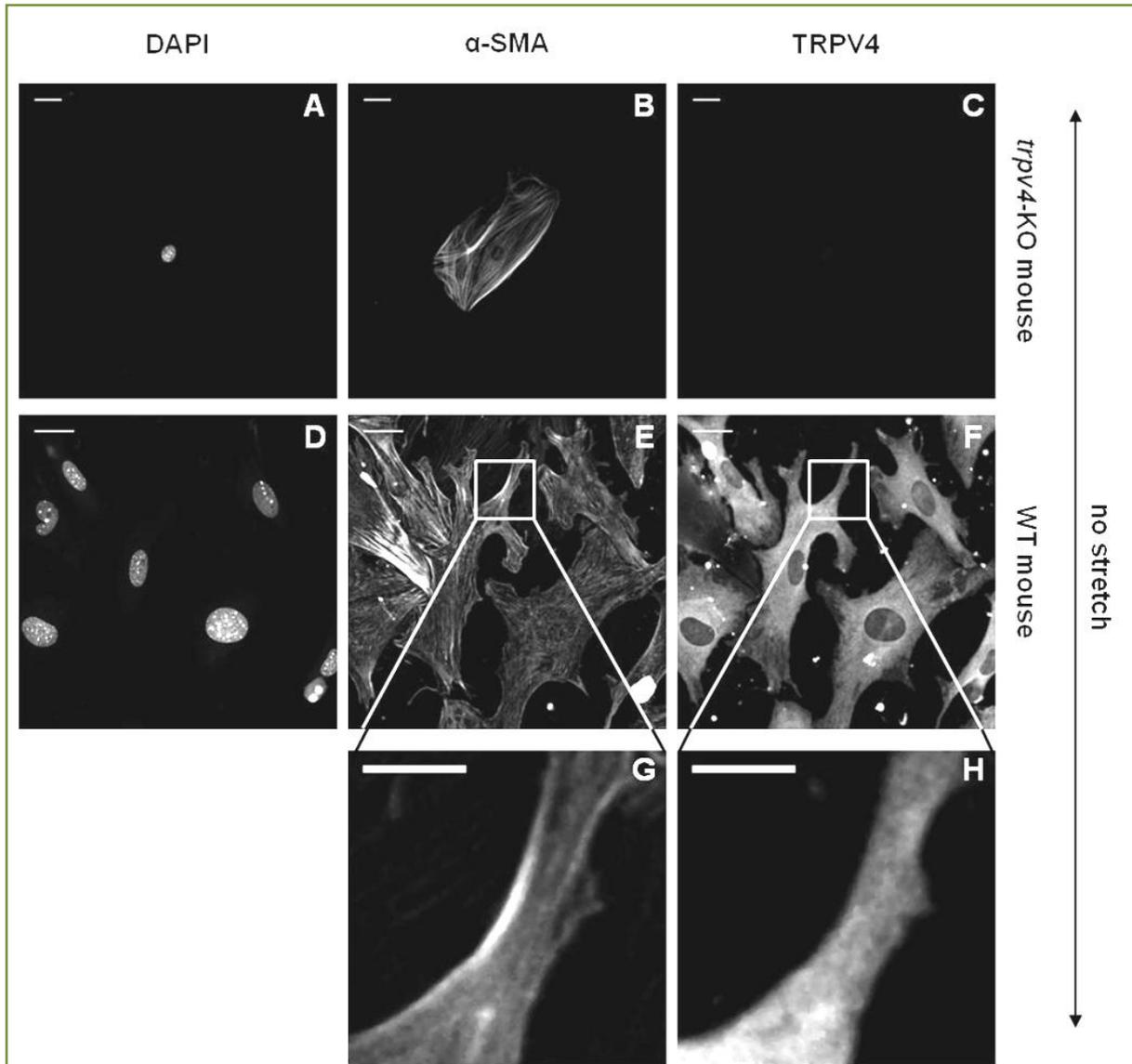


Figure 57 : Localisation de TRPV4 dans des CMLAP en absence d'étirement.

Images obtenues par immunofluorescence confocale de CMLAP de souris *trpv4* KO (A-C) et WT (D-F). La barre d'échelle représente 25 μm . (A et D) Marquages au DAPI des noyaux, (B et E) pour l' α -actine de muscle lisse (α -SMA) et (C et F) pour TRPV4. (G et H) Agrandissement des zones correspondantes au carré blanc des marquages α -SMA et TRPV4 respectivement. La barre d'échelle représente 10 μm .

Le conditionnement à l'étirement potentialise la réponse calcique induite par l'activation de TRPV4. De la même manière que l'hypoxie induit une relocalisation des canaux TRPC6 à la membrane [309], le stress mécanique pourrait augmenter la proportion de canaux activables à la membrane, et ainsi potentialiser la réponse calcique induite par l'activation de TRPV4. Cette hypothèse a été vérifiée par immunofluorescence en étudiant la localisation de TRPV4 au sein de la CMLAP. Des expériences préliminaires réalisées sur des CMLAP issues de souris TRPV4-KO présentent une absence de marquage pour TRPV4. Ces résultats prouvent la spécificité de l'anticorps primaire dirigé contre TRPV4 (Figure 57 A-C).

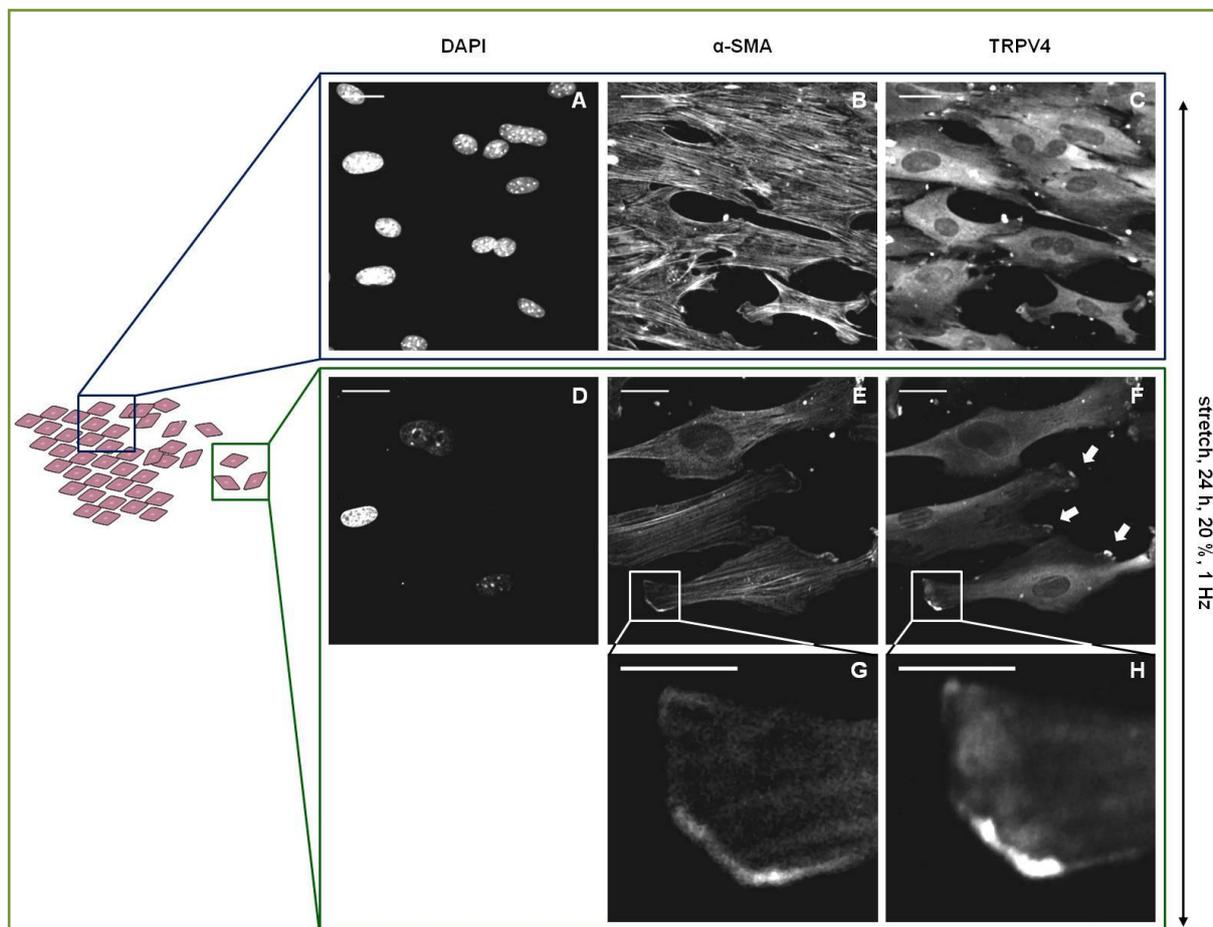


Figure 58 : Le conditionnement à l'étirement induit une relocalisation de TRPV4.

Images obtenues par immunofluorescence confocale de CMLAP de souris soumises à un étirement uniaxial de 20 % (24 heures, 1 Hz). (A et D) Marquages au DAPI des noyaux, (B et E) pour l' α -actine de muscle lisse (α -SMA) et (C et F) pour TRPV4. (A-C) CMLAP confluentes au sein du tapis cellulaire. (D-F) CMLAP en bordure de culture. La relocalisation de TRPV4 est indiquée par les flèches blanches. La barre d'échelle représente 25 μ m. (G et H) Agrandissement des zones correspondantes au carré blanc des marquages α -SMA et TRPV4 respectivement. La barre d'échelle représente 10 μ m.

Dans les CMLAP issues de souris WT, le marquage pour TRPV4 présente une distribution homogène dans le cytoplasme des cellules positives pour l' α -actine du muscle lisse (Figure 57 F et H). Après 24 heures d'étirement (20 %, 1 Hz), on observe une relocalisation du canal. En effet, le marquage pour TRPV4 est plus prononcé à certaines extrémités de la cellule, le marquage cytoplasmique n'ayant pas complètement disparu (Figure 58 F). Cependant cette relocalisation n'est pas observée sur l'ensemble des cellules présentes sur la membrane étirable. En effet, on peut remarquer que les cellules confluentes, au sein du tapis cellulaire montrent une expression de TRPV4 similaire à la condition contrôle (Figure 58 C). À l'inverse, les cellules en bordures de culture, qui possèdent un aspect de cellules migrantes (prolongements cytoplasmiques) présentent une relocalisation du canal (Figure 58 F et H). Les extensions membranaires où se retrouve le marquage pour TRPV4 correspondent à l'accumulation du marquage pour l' α -SMA sous membranaire (Figure 58 G et H) et suggèrent la présence du canal au sein de structures de type lamellipodes ou filopodes, essentielles lors de la migration cellulaire.

L'augmentation de la réponse calcique pourrait également être due à une surexpression du canal. Des expériences de RT-PCR quantitative et de Western-blot sont actuellement en cours de réalisation au laboratoire, et nous permettront de vérifier cette hypothèse.

3.7. Effet de l'étirement sur la signalisation calcique induite par la vidange des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique

Les résultats précédents montrent qu'un étirement uniaxial cyclique important (1 Hz, 20 %, 24 heures) induit une augmentation significative de la signalisation calcique induite par l'activation de TRPV4. La perturbation de l'homéostasie calcique est un élément important lors du développement de l'HTP. De plus, une étude récente menée au laboratoire montre que l'organisation spatiale des stocks calciques et des RyR dans les CMLAP de rat est importante pour la signalisation cellulaire et qu'est impliquée dans l'HTP. Ainsi, cette étude met en évidence que la réponse calcique induite par un choc osmotique est augmentée dans les CMLAP de rats ayant développé une HTP, et que cette augmentation est associée à une distribution spatiale différente des isoformes des RyR. [299]. Une augmentation de la signalisation calcique induite par l'activation de TRPV4 pourrait avoir pour conséquence l'augmentation de la recapture du calcium dans le réticulum sarcoplasmique via les pompes SERCA par exemple. Il est donc pertinent d'évaluer le rôle d'un conditionnement *in vitro* à l'étirement sur l'état des stocks calciques. Pour cela, nous avons réalisé des expériences d'imagerie calcique (sonde Fura-PE3/AM) en induisant la vidange des stocks calciques du réticulum en bloquant les pompes SERCA à l'aide d'acide cyclopiazonique (10 μM) et de thapsigargine (1 μM).

Avant stimulation, en absence de calcium extracellulaire, les CMLAP de souris WT présentent une $[\text{Ca}^{2+}]_i$ stable de pour les CMLAP contrôles ($16,3 \pm 0,6$; $n = 29$), pour les CMLAP soumises à un étirement de 10 % ($14,1 \pm 0,5$; $n = 36$) et suite à un étirement de 20% (1 Hz, 24 heures) ($13,3 \pm 0,9$; $n = 7$) (Figure 59 A).

Suite à l'application d'acide cyclopiazonique (10 μM) et de thapsigargine (1 μM), on observe une augmentation de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. L'amplitude du ratio de fluorescence ($\lambda_{340\text{nm}}/\lambda_{380\text{nm}}$) présente un Δratio de $5,1 \pm 0,4$ ($n = 29$) en conditions contrôles qui augmente jusqu'à $6,8 \pm 0,5$ ($n = 36$) après un conditionnement à 10 % d'étirement et à $6,5 \pm 1,1$ ($n = 7$) après un conditionnement à 20 % d'étirement (Figure 59 B). En raison du faible nombre de souris utilisées lors de ces expériences préliminaires ($N = 2$), cette augmentation d'amplitude n'est pas significative et nécessite la poursuite des enregistrements.

Ces résultats concordent avec l'augmentation de l'influx calcique par CICR (calcium induced calcium-release) observé dans les CMLAP de rat "monocrotaline" [299]. Un influx calcique plus important à travers TRPV4 augmenterait la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ et potentiellement sa recapture dans le réticulum sarcoplasmique par des SERCA, augmentant ainsi la $[\text{Ca}^{2+}]$ dans le réticulum.

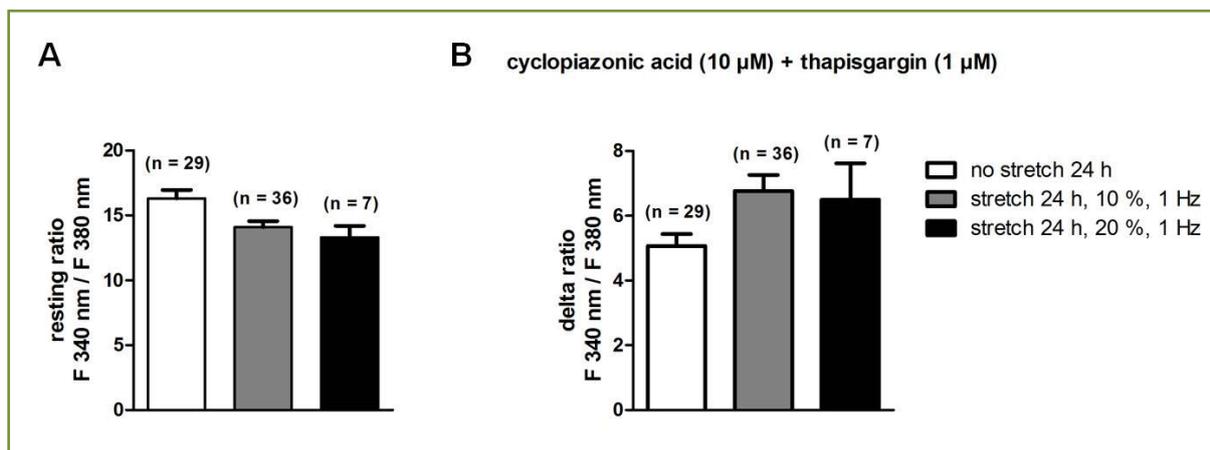


Figure 59 : Vidange des stocks calciques du réticulum sarcoplasmique par l'acide cyclopiazonique (10 μ M) et la thapsigargine (1 μ M).

(A) Ratio de fluorescence basale avant stimulation. (B) Augmentation du Δ ratio de fluorescence induite par l'application d'acide cyclopiazonique (CPA - 10 μ M) et de thapsigargine (TG - 1 μ M) sur des CMLAP issues de souris WT. Les cellules ont été soumises à un étirement cyclique de 10 ou 20 %, (1 Hz) ou non pendant 24 heures. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM. (n) indique le nombre de cellules étudiées.

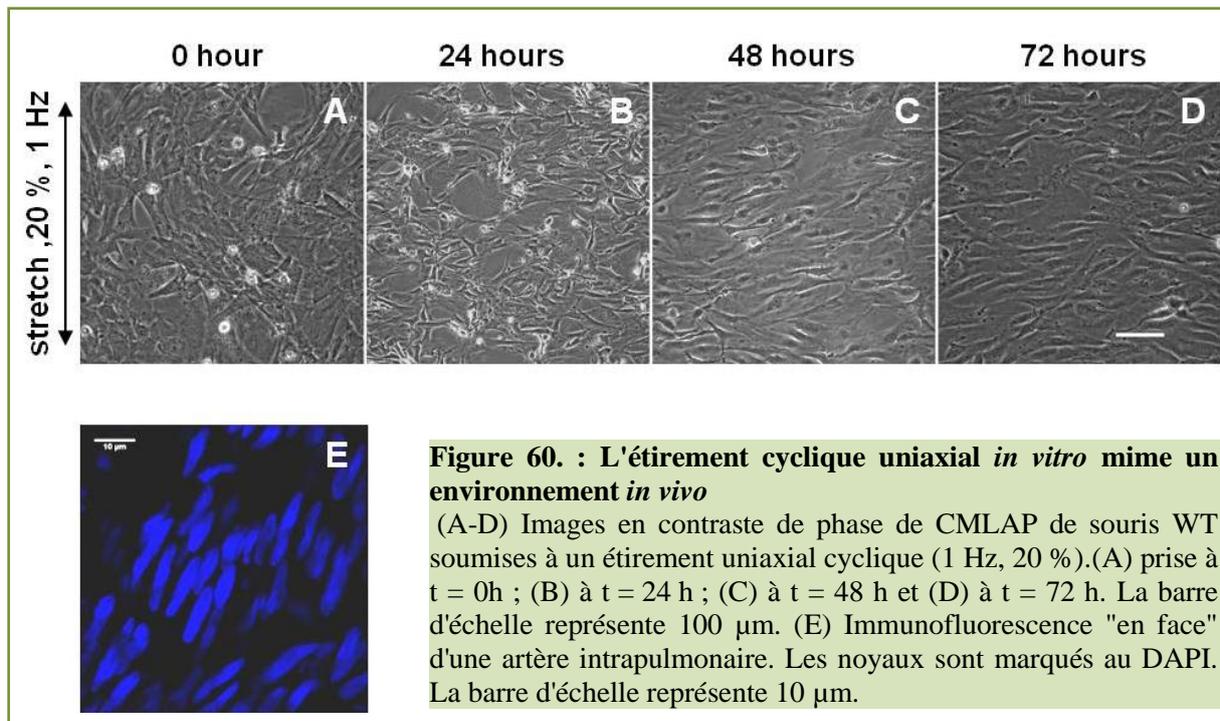
3.8. L'étirement uniaxial cyclique modifie l'organisation du tapis cellulaire

Après avoir quantifié l'influence de ce conditionnement *in vitro* sur la signalisation calcique, nous avons cherché à évaluer l'action du stress mécanique sur les mécanismes cellulaires impliqués dans le développement de l'HTP.

Premièrement, suite à un étirement cyclique (20 %, 1 Hz), le tapis cellulaire est réorganisé et présente un alignement perpendiculaire par rapport à l'axe d'étirement. Cette réorganisation cellulaire apparaît clairement et rapidement après le début de l'étirement et se maintient tant que l'étirement dure (testé jusqu'à 96 heures), (Figure 60 A-D). Cette réorganisation rappelle l'organisation des CMLAP au sein de leur tunique (Figure 60 E). En effet, comme décrit dans la section "1.2.2 la media" les CMLAP sont jointives et alignées de cette manière au sein de la media. Ce système *in vitro* permet un conditionnement des cellules qui semblent plus proche de leur environnement *in vivo*.

Si l'on suppose une intervention du stress mécanique dans l'établissement d'un phénotype de type "HTP", on peut alors se demander si les canaux sensibles à l'étirement, et plus particulièrement TRPV4, participent aux réponses précoces des CMLAP suivant l'application d'un étirement. Nous avons alors cherché à déterminer l'implication des SAC et de TRPV4 sur la réorganisation du tapis cellulaire.

L'analyse en microscopie confocale, des cellules marquées à la phalloïdine-FITC révèle que les fibres de stress d'actine sont réalignées perpendiculairement à l'axe de l'étirement. Comme décrit dans la section "matériels et méthodes", cet arrangement du cytosquelette d'actine nous permet de quantifier le pourcentage de cellules présentant un alignement à $90^\circ \pm 30^\circ$ par rapport à l'axe d'étirement.



On remarque alors que la réorientation des fibres de stress intervient très tôt après l'induction du stress mécanique. Après seulement deux heures d'étirement à 10 % (1 Hz), on observe une augmentation significative du pourcentage de cellules présentant un réalignement par rapport au tapis cellulaire en conditions contrôles. Ce pourcentage passe de $29,3 \pm 0,9$ % (N = 3) à $65,1 \pm 8,4$ % (N = 3). On peut également observer que l'intensité de l'étirement influence cette réorganisation. En effet, à 20 % d'étirement pour une durée identique (2 heures), le pourcentage de cellules alignées est significativement plus important avec $93,7 \pm 0,9$ % (N = 3) de cellules alignées (Figure 61). Par contre, de façon intéressante, en doublant la durée de l'étirement, on ne change pas les résultats observés précédemment. Après quatre heures d'étirement (1 Hz), l'orientation du tapis cellulaire ne change pas avec $28,7 \pm 1,2$ % (N = 3) de cellules alignées en conditions contrôles contre $61,1 \pm 2,8$ % (N = 3) et $93,1 \pm 4,2$ % (N = 3) de cellules alignées à 10 et 20 % d'étirement respectivement (Figure 62).

On peut constater que sur la période étudiée, le paramètre "intensité" d'étirement est prépondérant par rapport au paramètre "durée".

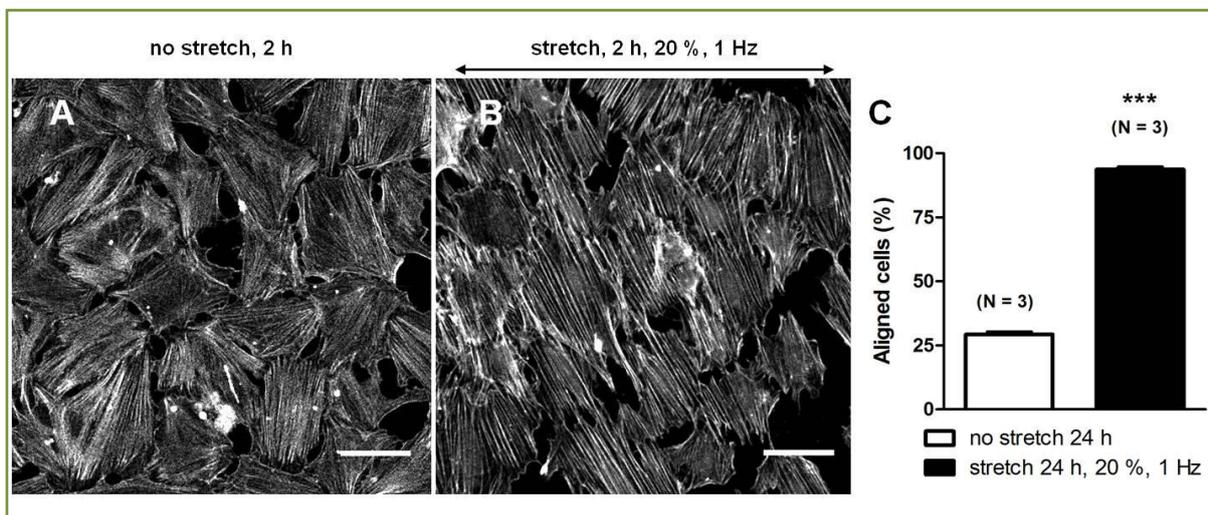


Figure 61 : L'étirement induit une réorganisation du tapis cellulaire.

(A-B) Marquages des fibres de stress d'actine à la phalloïdine-FITC sur des CMLAP de souris WT soumises à un étirement (20 %, 1 Hz, 2 heures) (B) ou non (A). La barre d'échelle représente 10 μ m. (C) Nombre de CMLAP présentant un alignement à $90^\circ \pm 30^\circ$ par rapport à l'axe d'étirement en % du nombre total de cellules soumises à un étirement (20 %, 1 Hz, 2 heures ; en noir) ou non (en blanc). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM. "N" représente le nombre de souris utilisées. Test du χ^2 .

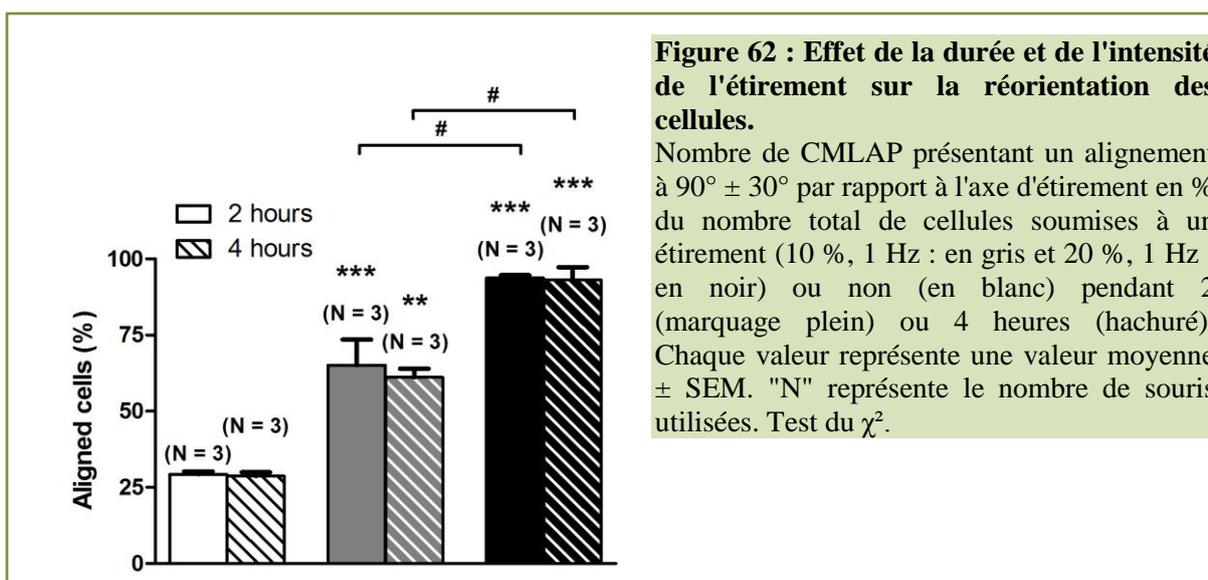


Figure 62 : Effet de la durée et de l'intensité de l'étirement sur la réorientation des cellules.

Nombre de CMLAP présentant un alignement à $90^\circ \pm 30^\circ$ par rapport à l'axe d'étirement en % du nombre total de cellules soumises à un étirement (10 %, 1 Hz : en gris et 20 %, 1 Hz : en noir) ou non (en blanc) pendant 2 (marquage plein) ou 4 heures (hachuré). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM. "N" représente le nombre de souris utilisées. Test du χ^2 .

3.9. Le réalignement cellulaire induit par l'étirement nécessite l'activation des canaux sensibles à l'étirement.

Afin de vérifier l'implication des SAC dans la réorganisation du tapis cellulaire, nous avons utilisé des inhibiteurs pharmacologiques des canaux SAC et TRPV. Dans un premier temps, nous avons testé l'implication des SAC en pré incubant pendant 30 minutes les CMLAP avec de la GsMTx-4 (5 μ M), inhibiteur des SAC. On observe alors plus que $41,5 \pm 2,5$ % (N = 3) de cellules alignées suite à un étirement de 10 % (1 Hz) pendant deux heures, et plus que $17,3 \pm 4,8$ % (N = 3) suite à un étirement de 20 % (1 Hz) pendant deux heures (Figure 63 B et D). Puis, l'implication des canaux TRPV a été évaluée grâce à l'application de rouge de ruthénium (10 μ M). On observe des résultats similaires avec $39,8 \pm 3,9$ % (N = 3) et $35,1 \pm 23,5$ % (N = 3) de cellules alignées suite à des étirements identiques (1 Hz, 2 heures à 10 % ou 20 %, respectivement) (Figure 63 A et D).

Enfin, l'intervention de TRPV4 a été évaluée par l'utilisation de CMLAP issues de souris *trpv4*-KO. Ces cellules ne présentent aucune réorganisation après un étirement (10 %, 1 Hz, 2 heures) avec $17,1 \pm 3,8$ % (N = 3) de cellule alignées (Figure 63 C et E).

Ces résultats suggèrent une intervention des canaux sensibles à l'étirement, et plus particulièrement du canal TRPV4, dans la réorganisation du tapis cellulaire à 90° par rapport à l'axe d'étirement.

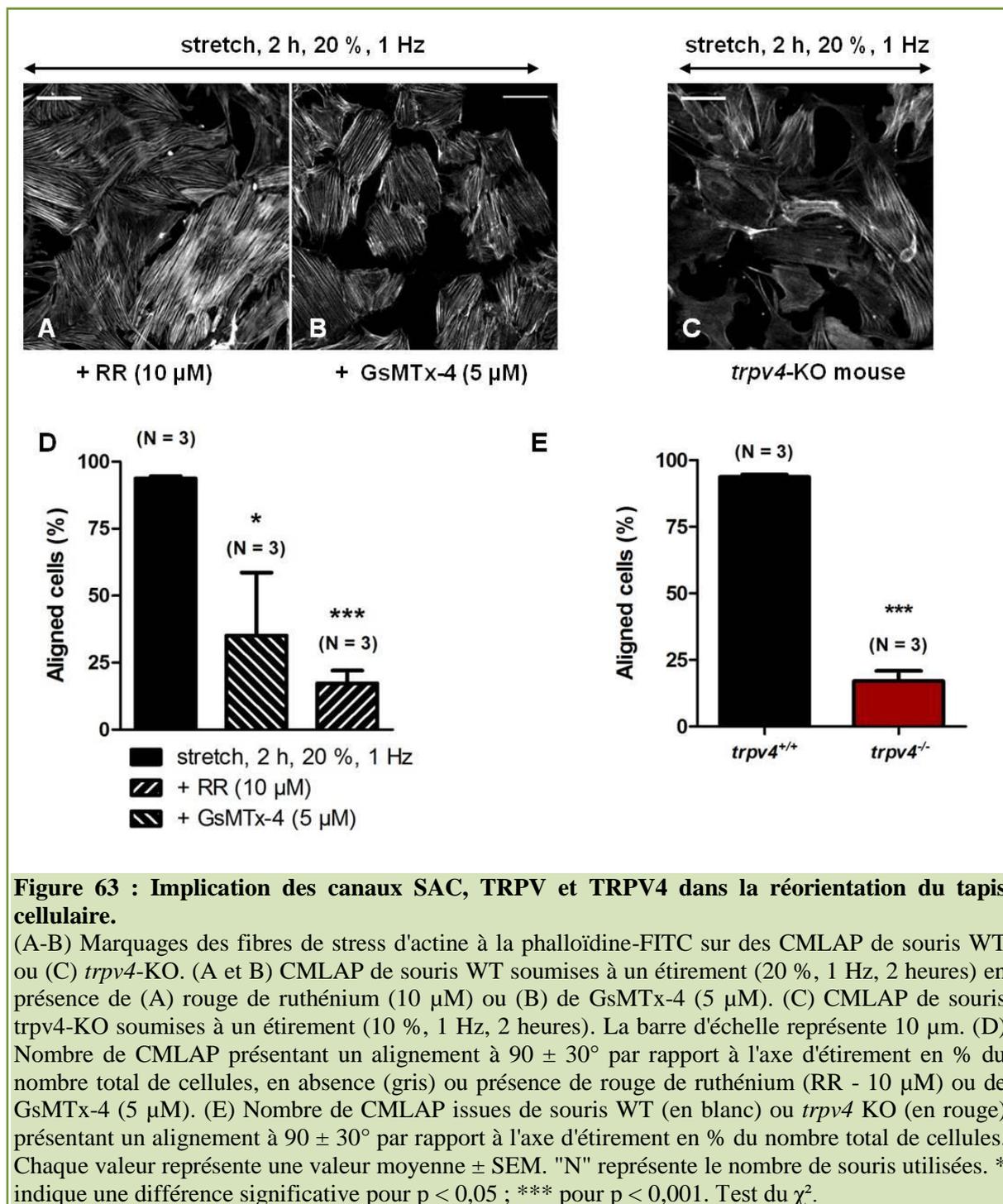
3.10. Effet de l'étirement sur la migration

Comme nous l'avons montré, l'étirement affecte l'orientation du tapis cellulaire rapidement après son application suggérant son implication dans les phénomènes migratoires. La réalisation de brèches sur les chambres en silicone n'était pas réalisable, nous avons donc cherché à évaluer l'effet de l'étirement mécanique par un suivi de cellules en vidéo microscopie "time-lapse".

Les CMLAP ont été suivies sur une période de 10 heures à une fréquence d'acquisition de 1 image toutes les 10 minutes. Les expériences préliminaires effectuées ne montrent aucune différence sur la distance parcourue spontanément par les CMLAP soumises à un étirement ou non. Nous avons aussi bien évalué la distance totale parcourue (distance accumulée) que la distance absolue (distance euclidienne). Les CMLAP contrôles et conditionnées ont parcouru respectivement 149 ± 14 μm (n = 24) et 147 ± 9 μm (n = 29) en 6 heures en terme de distance réellement parcourue (distance accumulée) (Figure 64 B). Ces mêmes cellules ont parcouru sur la même période de temps 70 ± 8 μm (n = 24) en conditions contrôles contre 76 ± 6 μm (n = 29) après le conditionnement *in vitro* (étirement de 20 %, 1 Hz, 24 heures) (Figure 64 A). Aucune différence significative n'a été observée entre ces deux populations de cellules.

Le conditionnement à l'étirement n'induit pas non plus de changement de vitesse de déplacement avec $0,36 \pm 0,04$ $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (n = 24) pour les CMLAP contrôles contre $0,33 \pm 0,02$ $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ (n = 29) après le conditionnement (Figure 64 D), ni de directions prises par les cellules lors de leur déplacement sur la matrice de collagène, avec $0,49 \pm 0,04$ (n = 24) pour les cellules contrôles et $0,51 \pm 0,03$ (n = 29) pour les cellules après le conditionnement (Figure 64 C).

Comme observé lors du conditionnement à l'hypoxie [311], le conditionnement à l'étirement ne potentialise pas la migration basale des CMLAP en absence de stimulus. Des expériences complémentaires en stimulant la migration des CMLAP de souris WT avec du 4 α -PDD (5 μM), sont en cours de réalisation au laboratoire. Ces résultats nous permettront de regarder l'effet du conditionnement à un stress mécanique sur la migration induite par l'activation de TRPV4.



3.11. Effet de l'étirement sur la prolifération cellulaire

La prolifération des CMLAP est un autre phénomène clé lors de la muscularisation des artères pulmonaires intervenant au cours de l'hypertension pulmonaire. La lecture du test colorimétrique de BrdU avec le lecteur de plaque n'était pas réalisable sur les chambres en silicone. Nous avons donc évalué le taux de prolifération à l'aide de la protéine KI-67 par immunofluorescence. La présence de cette protéine dans les noyaux (marqués au DAPI) reflète l'état prolifératif des CMLAP.

Un étirement cyclique de 20 % pendant 24 heures augmente significativement le nombre de cellules possédant un marquage KI-67 nucléaire, avec 15 ± 3 % de cellules marquées ($N = 3$) (Figure 65). Cependant un étirement plus faible (10 %) ne semble pas suffisant pour observer un changement de l'état prolifératif des CMLAP avec 10 ± 4 % de cellules en prolifération après conditionnement ($N = 3$), contre 7 ± 3 % de cellules en conditions contrôle ($N = 3$) (Figure 65). Des résultats préliminaires réalisés sur des CMLAP de souris *trpv4*-KO montrent une absence d'augmentation du marquage KI-67 nucléaire après un conditionnement à 20 % d'étirement pendant 24 heures (Figure 65). On observe 1 % de cellules marquées ($N = 1$), contre 4 % en condition contrôle ($N = 1$) (données non montrées).

Le paramètre intensité d'étirement influence la proportion de CMLAP en état prolifératif. En effet, un étirement important (20 %), établi comme mimant une condition pathologique potentialise la prolifération, alors qu'un étirement de 10 %, établi comme physiologique, n'induit pas de changement. Des expériences complémentaires seront réalisées afin d'évaluer si cette potentialisation de la prolifération pourrait être activée par l'augmentation de la signalisation calcique induite par l'activation de TRPV4.

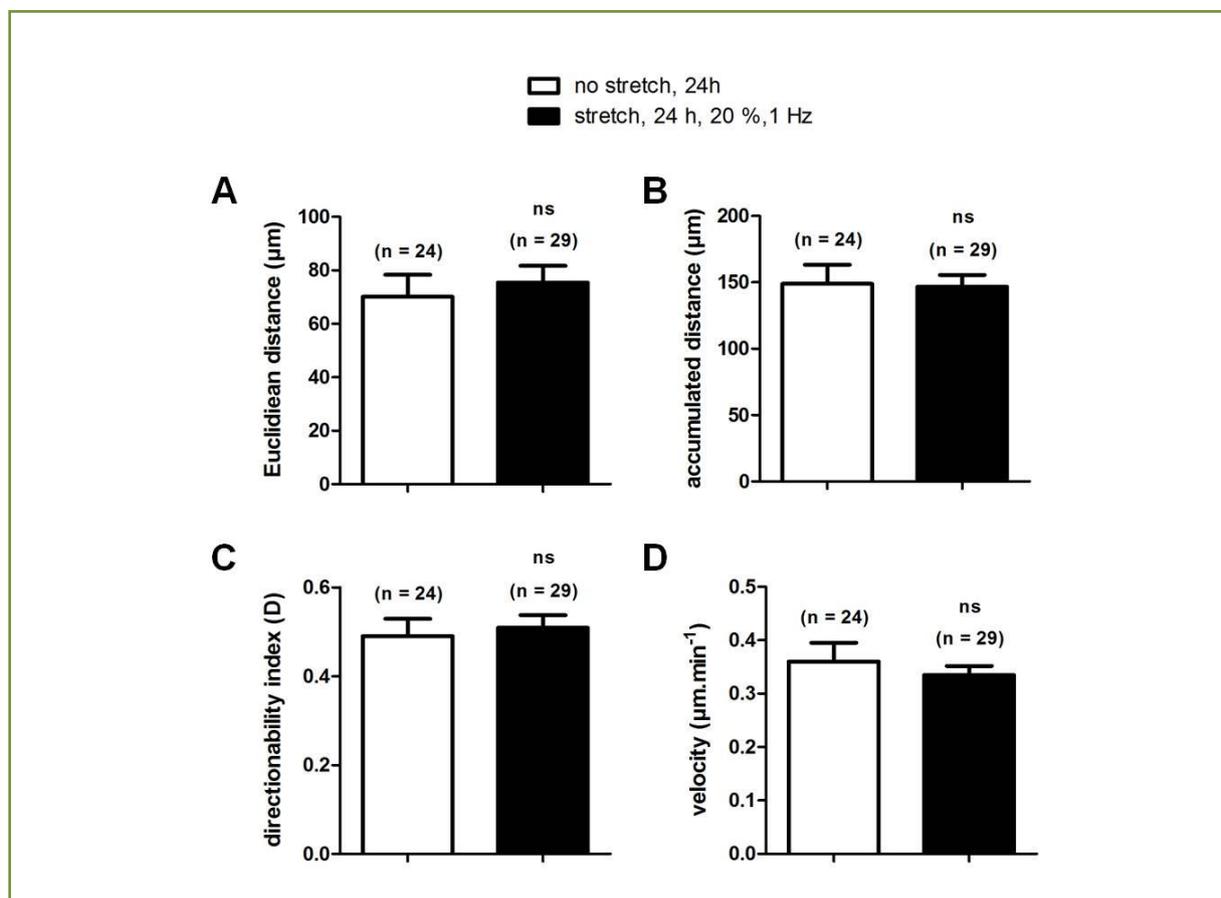


Figure 64 : Effet de l'étirement sur la migration des CMLAP.

(A) Distance euclidienne en μm . (B) Distance accumulée en μm . (C) Direction prise par les CMLAP. Cet index correspond au rapport entre la distance euclidienne et la distance accumulée. (D) Vitesse de déplacement des CMLAP en $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM : en noir pour les CMLAP soumises à un étirement uniaxial cyclique (20 %, 1 Hz, 24 heures), et en blanc pour les CMLAP contrôles. (n) représente le nombre de cellules étudiées. "ns" : non significatif. Test de Mann et Whitney.

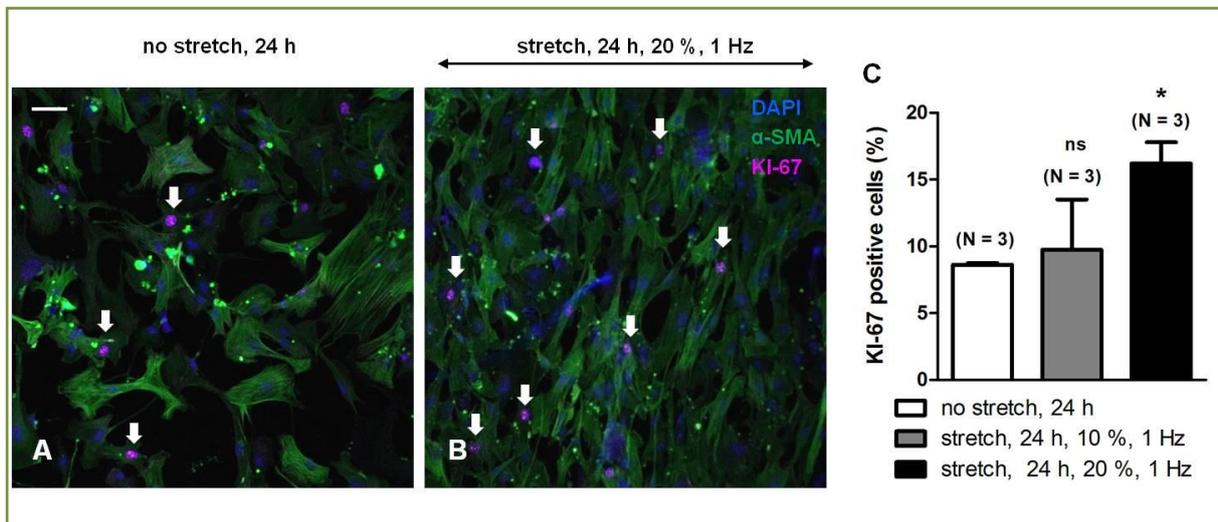


Figure 65 : Effet de l'étirement sur la prolifération des CMLAP.

Marquages immunofluorescents de CMLAP pour le marqueur KI-67 (en magenta, indiqué par les flèches) et pour l' α -actine du muscle lisse (α -SMA, en vert) après conditionnement à l'étirement (20 %, 1 Hz, 24 heures) (B) ou non (A). Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu). La barre d'échelle représente 50 μ m. (C) Quantité de CMLAP positives pour le marqueur KI-67 en % du nombre total de cellules. Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM. (N) représente le nombre de souris utilisées. * indique une différence de signification pour $p < 0.05$. Test du χ^2 .

3.12. Discussion effet de l'étirement

Au cours de cette étude, nous avons directement cherché à déterminer si les modifications observées sur les CMLAP lors d'une HTP pouvaient être induites par l'augmentation du stress mécanique (augmentation des tensions pariétales au sein de la media) survenant au cours de la pathologie. Les résultats présentés montrent pour la première fois **une action directe d'un stress mécanique appliqué *in vitro* sur des CMLAP indépendamment de tout autre facteur environnemental.**

Comme cela a été montré dans l'étude de Dick et ses collaborateurs [315], le conditionnement à un étirement de 10 % peut être assimilé à un "étirement physiologique", et le conditionnement à un étirement de 20 % à un étirement pathologique qui surviendrait au cours d'une HTP. Les auteurs montrent que suite à un étirement de 20 % de la longueur initiale pendant 24 heures les CMLAP de rat présentent des niveaux de production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) significativement supérieurs aux CMLAP en absence d'étirement ou soumises à un étirement de 10 %. Dans notre étude, nous avons tout d'abord montré que **l'amplitude de la réponse calcique induite par l'activation de TRPV4 (4 α -PDD, 5 μ M) était corrélée avec l'intensité de l'étirement.** En effet, celle-ci est fortement augmentée par le conditionnement à un étirement de 20 % pendant 24 heures, (Figure 56), de la même manière que dans les cellules issues de rats hypoxiques chroniques [103, 278]. À l'inverse, un étirement modéré (10 %) n'induit pas de modification de la signalisation calcique (Figure 56). Les vaisseaux sanguins sont constamment exposés à des contraintes mécaniques. En conditions physiologiques, la pression intraluminale des artères pulmonaires est faible (15 mmHg), et les variations de tensions pulsatiles sont connues pour réguler le tonus vasomoteur, ainsi que pour maintenir un phénotype musculaire lisse contractile [316]. Avec l'augmentation des résistances à l'écoulement et l'augmentation du travail du cœur droit survenant au cours de l'HTP, on peut supposer que les contraintes mécaniques liées aux tensions pariétales augmentent elles aussi. Un étirement supérieur à 10 % pourrait constituer un stimulus menant à l'augmentation de la signalisation calcique des CMLAP.

L'augmentation de la réponse calcique que nous avons observée **pourrait être due à une surexpression des canaux TRPV4**, comme cela a été montré précédemment dans le modèle du rat hypoxique chronique [103, 278]. Cette hypothèse sera vérifiée par des expériences de RT-PCR quantitative et de Western-blot, actuellement en cours de réalisation au laboratoire. Mais l'augmentation de la réponse calcique observée pourrait également être due à une augmentation de **la proportion de canaux à la membrane**. Ce mécanisme a déjà été montré pour l'isoforme TRPV2 après application locale d'un stress mécanique sur des cellules de fibrocarcinome (HT1080) [317], ou par une stimulation des cellules CHO, transfectées avec TRPV2 à l'IGF-1 [310]. D'autres études montrent que l'hypoxie induit une relocalisation de TRPC6 [309] et de TRPV1 dans les CMLAP [311]. Nous avons donc réalisé une première série d'expériences d'immunofluorescence couplée à de la microscopie confocale nous permettant de suivre la localisation de TRPV4. Ainsi, les premiers résultats obtenus montrent **une relocalisation à la membrane de TRPV4 dans les CMLAP soumises à un étirement de 20 % pendant 24 heures, conditions induisant une augmentation des réponses calciques** (Figure 57). L'étirement induit donc une redistribution du pool de TRPV4 cytosolique à la membrane, ces résultats préliminaires étant à confirmer par une analyse quantitative.

Nos résultats montrent également que cette relocalisation touche principalement les **CMLAP isolées, en bordure du tapis cellulaire, alors que les CMLAP confluentes au sein du tapis cellulaire présentent un marquage cytosolique**. Une étude réalisée sur des cellules BTEC (cellules de carcinomes mammaires) montrent des réponses calciques induites par l'activation de TRPV4 (avec du 4 α -PDD) différentes selon la localisation des cellules. Les réponses calciques sont significativement plus importantes dans les cellules en bordure du tapis cellulaire, par rapport à des cellules au sein du tapis cellulaire [318]. Les auteurs attribuent un caractère migratoire aux cellules en bordure de culture. Mais peut-on corrélérer l'augmentation de l'influx calcique induit par une relocalisation de TRPV4 à la migration ? La migration des CMLAP vers les vaisseaux non muscularisés est l'un des mécanismes intervenant lors de l'établissement de l'HTP. Or les études du laboratoire montrent que TRPV4 est impliqué dans la migration des CMLAP de rats normoxiques [87, 297]. De plus, des études montrent que l'application d'un **stress mécanique de type étirement est impliqué dans la régulation de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales** [319, 320], ainsi que dans l'angiogenèse [321, 322].

La migration cellulaire consiste en un assemblage (au niveau du front de migration) et un désassemblage (queue de rétractation) constants d'adhésions à la matrice extracellulaire [323, 324]. De plus, la distribution de différents messagers et effecteurs, tels que les Rho GTPases, des kinases et les ions Ca²⁺ [233, 325] contribuent à créer et maintenir une polarité cellulaire nécessaire au mécanisme de la migration. Puisque **le calcium fait office de second messenger dans les mécanismes liés à la migration**, des études ont démontré l'action des canaux calciques voltage-dépendants de type-L [326], mais aussi des canaux TRPM7 [327, 328], TRPC1 [329], TRPV1 et TRPV4 [87] dans la migration. Une étude montre notamment que TRPM7 est responsable de l'influx calcique au sein des lamellipodes du front de migration des fibroblastes, permettant la polarisation de la cellule [330] en direction des chémoattractants. De plus, il a été montré qu'une accumulation de TRPV2 à la membrane induit une augmentation de l'influx calcique qui potentialise la migration des cellules de cancer de la prostate (cellules PC3) par l'augmentation de l'expression de métalloprotéinases de la matrice (MMP2 et MMP9) [331]. Les points d'adhésions focaux contiennent de nombreuses protéines, notamment des protéines qui lient la matrice extracellulaire (comme les intégrines), mais aussi des protéines qui lient le cytosquelette d'actine (comme la taline). **Des interactions entre TRPV4 et différents éléments impliqués dans la migration ont déjà été décrites**. Ainsi TRPV4 interagit directement avec MAP-7 (microtubule-associated protein 7) [332], l'actine et la tubuline [221,

223]. Enfin, une étude récente montre **une expression et une intervention de TRPV4 au niveau de la queue de rétraction de cellules HEK [333]**. Ainsi, dans notre étude la relocalisation de TRPV4 induite par étirement "pathologique" pourrait créer un microdomaine calcique au sein de prolongements membranaires, et pourrait ainsi fournir un influx de calcium **proche des protéines calcium-dépendantes intervenant dans la migration telles que la calpaïne**, une protéase impliquée dans le désassemblage des adhésions focales. Un mécanisme similaire a déjà été montré pour TRPM7 [334]. L'entrée de calcium induite par l'ouverture de TRPV4 faciliterait ainsi les cycles d'assemblages/désassemblages des points de contacts focaux, et **potentialiserait la migration des CMLAP**.

La migration fait également intervenir une réorganisation du cytosquelette. Nous avons montré que l'application d'un étirement uniaxial cyclique (1 Hz) à différentes intensités (10 % ou 20 % d'élongation) sur une courte période (2 heures) **induisait un remodelage du cytosquelette d'actine corrélé à une réorientation des CMLAP en culture à 90° par rapport à l'axe d'étirement**. Grâce à l'application d'inhibiteurs des SAC et des canaux TRPV, ainsi que par l'utilisation de CMLAP issues de souris *trpv4*-KO, nous avons pu mettre en évidence que TRPV4 était l'un des SAC requis pour la réorientation des CMLAP en réponse à l'étirement cyclique. Des études d'autres groupes ont montré qu'un étirement uniaxial induisait une réorientation similaire, (c.à.d. perpendiculairement à la force mécanique), des cellules endothéliales de veine ombilicale [335], mais également des cellules endothéliales des petits vaisseaux via l'activation de TRPV4 [306]. D'autres groupes montrent un alignement similaire sur des fibroblastes [302]. Il est désormais établi que TRPV4 peut être activé par des dérivés de l'acide arachidonique comme les EET (8,9-EET et 11,12 EET) [292]. Ainsi, une étude montre que l'acide arachidonique induit un remodelage du cytosquelette d'actine ainsi qu'une augmentation de l'expression membranaire de TRPV4 dans des cellules dérivées de carcinomes mammaires (BTEC) [318]. Nos résultats suggèrent donc que l'étirement induit une mobilisation de TRPV4 à la membrane plasmique nécessaire au remodelage d'actine précédant la migration.

En plus de la migration, la prolifération des CMLAP est également une étape importante dans la muscularisation des petits vaisseaux et l'hypertrophie de la media au cours de l'HTP [59]. **Nos résultats montrent une augmentation du nombre de cellules positives pour KI-67**, un marqueur de cellules en prolifération, après un conditionnement à l'étirement (20 %, 1 Hz, 24 heures), conditions induisant une augmentation de la réponse calcique au 4 α -PDD (5 μ M). Nos résultats préliminaires réalisés sur les CMLAP issues de souris *trpv4*-KO montrent une prolifération pratiquement absente suite à un étirement (20 %, 1 Hz, 24 heures). Comme l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est requise pour induire la prolifération [88, 89], des études ont déjà montré que certains TRP interviennent dans l'induction de la prolifération des CMLAP. Par exemple, l'activité de TRPC1 est associée avec la prolifération des CMLAP [88, 249]. De même, les cellules KO pour *trpm7* ne prolifèrent plus suite à la stimulation par l'angiotensine II [336]. Une étude récente du laboratoire a montré que la perturbation de l'homéostasie calcique dans les CMLAP issues de rats hypoxiques chroniques et "monocrotaline" est associée à une modification de l'organisation des stocks calciques intracellulaires ainsi qu'à une augmentation de l'influx calcique par CICR [299]. De plus, une autre étude du laboratoire montre une interaction entre TRPV4 et RyR₂ qui potentialise l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ [103]. Nos résultats suggèrent une augmentation de la $[Ca^{2+}]$ contenue dans le réticulum suite à un conditionnement à l'étirement (Figure 59). Il est possible que cette réserve de calcium intracellulaire participe à la perturbation de l'homéostasie calcique observée en contexte pathologique. Le stress mécanique induit donc une modification de la signalisation calcique intracellulaire de la même manière que dans les CMLAP issues d'animaux HTP.

En conclusion, le conditionnement *in vitro* par un étirement cyclique permet de mimer certains aspects cellulaires de l'HTP dans les CLMAP, en particulier la migration et la prolifération. Ce conditionnement est également suffisant pour augmenter la réponse calcique induite par TRPV4. Cette suractivation pourrait être la conséquence d'une mobilisation de canaux à la membrane, et faciliterait les mécanismes moléculaires de la migration et de la prolifération des CMLAP, deux mécanismes clés intervenants au cours de l'épaississement de la media. Nous faisons l'hypothèse alors que **l'augmentation des tensions pariétales des artères intrapulmonaires observée durant l'établissement de l'HTP générerait une cascade de mécanismes cellulaires induit par la relocalisation et l'activation de TRPV4 et concourant à l'épaississement de la media et à la muscularisation des petits vaisseaux.**

4. Conclusion

Les deux conditionnements développés au cours de cette thèse mettent en évidence pour la première fois **l'action directe de l'hypoxie et d'un stress mécanique (étirement cyclique) sur des CMLAP**. Ces résultats montrent qu'un conditionnement *in vitro* est suffisant pour mimer plusieurs aspects de l'HTP (Figure 67), aussi bien au niveau moléculaire (suractivation de TRPV4), qu'au niveau cellulaire (migration et prolifération).

Les canaux de type TRPV4 sont mécanosensibles [337] et sont impliqués dans la migration des CMLAP de rat [87]. De plus, des études révèlent une surexpression et une suractivation de TRPV4 dans les CMLAP de rats hypoxiques chroniques [103, 278]. Nous avons donc étudié indépendamment l'implication de deux stimuli physiques survenant au niveau de la circulation pulmonaire : l'hypoxie et le stress mécanique. Ces deux stimuli sont d'autant plus intéressants à étudier qu'ils sont plus présents dans un contexte d'hypertension pulmonaire de groupe 3. Tout d'abord, les travaux menés au cours de cette thèse mettent en évidence que l'influx calcique induit par l'activation de TRPV4 est augmenté dans les CMLAP de rats sains à la suite d'un conditionnement hypoxique (1 % O₂, 48 heures) [311]. De manière similaire, plusieurs études montrent que suite à un stimulus hypoxique, l'activité de TRPV4 est également augmentée dans les cellules endothéliales ombilicales humaines (HUVEC) et dans les astrocytes de rat [298, 338]. Nos résultats révèlent que suite au conditionnement hypoxique (1 % O₂, 48 heures), l'expression de TRPV4 n'est pas modifiée dans les CMLAP de rat. Le conditionnement utilisé n'induit pas non plus de mobilisation de TRPV4 à la membrane. Une explication possible à l'augmentation de l'influx calcique, est que l'hypoxie affecte certains résidus d'acides aminés et la conformation de la protéine, altérant les propriétés intrinsèques du canal. Une autre possibilité, en considérant la sensibilité du canal pour les nombreuses molécules dérivées de lipides endogènes [339], est que l'hypoxie augmente le niveau de ces ligands endogènes. En effet, l'exposition de souris à l'hypoxie augmente la production d'EET (8,9-EET et 11,12 EET) dans les poumons [292]. Cette hypothèse est renforcée par une étude qui montre que TRPV4 est activé dans les CMLAP de rat [297] par l'activation de la phospholipase A2 (PLA2) et la production d'EET [297, 340] induite par la sérotonine. Notre étude montre également des effets différents sur TRPV1, un autre canal mécanosensible qui partage une forte homologie de séquence avec TRPV4. En effet, le conditionnement à l'hypoxie (1 % O₂, 48 heures) n'induit pas de modification de l'activité de TRPV1. Cependant, ce conditionnement induit une mobilisation du canal à la membrane. Comme TRPV1 interagit avec les microtubules [225], on peut supposer que cette relocalisation du canal, proche du cytosquelette de tubuline, faciliterait l'entrée de calcium nécessaire au remodelage du cytosquelette et à la migration.

En parallèle, nos travaux mettent en évidence une augmentation de la signalisation calcique induite par TRPV4 dans les CMLAP de souris saines suite à un conditionnement à l'étirement (20 %, 1 Hz, 24 heures) (Figure 56). De la même façon que l'hypoxie induit la translocation de la protéine de fusion TRPC6/TRPV5 [309], nos résultats montrent une relocalisation de TRPV4 après un conditionnement à l'étirement (20 %, 1 Hz, 24 heures) (Figure 57) pouvant expliquer l'augmentation de la réponse calcique observée. Ces premiers résultats mettent en évidence un fait notable : **les deux stimuli physiques environnementaux étudiés induisent des perturbations de la physiologie de la cellule musculaire lisse qui convergent vers une même cible : la suractivation de TRPV4, mais à travers des mécanismes moléculaires différents.**

L'étude menée au cours de cette thèse montre également que l'hypoxie amplifie la migration cellulaire induite par la stimulation de TRPV4 [311] précédemment décrite [87]. La migration est un processus complexe, impliquant de nombreux facteurs faisant intervenir des changements de morphologies et d'adhésions cellulaires dépendant du Ca²⁺ [234].

L'hypoxie induit des changements d'architecture du cytosquelette, et les travaux du groupe du Pr Goswami prouvent une interaction entre TRPV4 et le cytosquelette [223, 341]. On peut donc supposer que l'hypoxie facilite la réorganisation du cytosquelette induite par TRPV4. De même, le conditionnement à l'étirement induit une réorganisation du tapis cellulaire, impliquant une réorientation des fibres de stress d'actine (Figure 61). L'inhibition de ce processus dans les CMLAP issues de souris TRPV4-KO (Figure 63) renforce l'hypothèse de l'implication de l'activation de TRPV4 dans les mécanismes liés à la migration.

Enfin, nous avons mis en évidence la participation du facteur de transcription NFAT. NFAT est décrit comme un intégrateur de la signalisation calcique, jouant un rôle important dans le développement de l'HTP. En effet, ce facteur de transcription est impliqué dans le remodelage artériel pulmonaire induit par l'hypoxie chronique [148], mais il est également impliqué dans la prolifération des CMLAP humaines [308]. Nous avons montré que l'exposition à une hypoxie *in vitro* induisait, *per se*, une translocation nucléaire de NFATc4, mais l'hypoxie ne potentialise pas la translocation induite par l'activation de TRPV4 [311]. Nous supposons alors que l'hypoxie stimulerait l'expression de TRPV4, via la translocation de NFAT, facilitant ainsi la réponse induite par l'activation de TRPV4. Nos résultats mettent également en évidence que le conditionnement à l'étirement potentialise la prolifération des CMLAP de souris (Figure 65), comme cela a été montré dans les CML d'artères systémiques [125]. Cette augmentation de la prolifération est induite par un conditionnement identique à celui responsable de l'augmentation de la signalisation calcique induite par TRPV4, ainsi qu'à la relocalisation de TRPV4 à la membrane. Des résultats préliminaires montrent que la prolifération des PASMC de souris est réduite dans les PASMC issues de souris TRPV4-KO (Figure 65). Comme cela a été observé dans le muscle lisse bronchique [342], nous supposons que la translocation nucléaire de NFAT, via l'activation de TRPV4, faciliterait la prolifération des CMLAP.

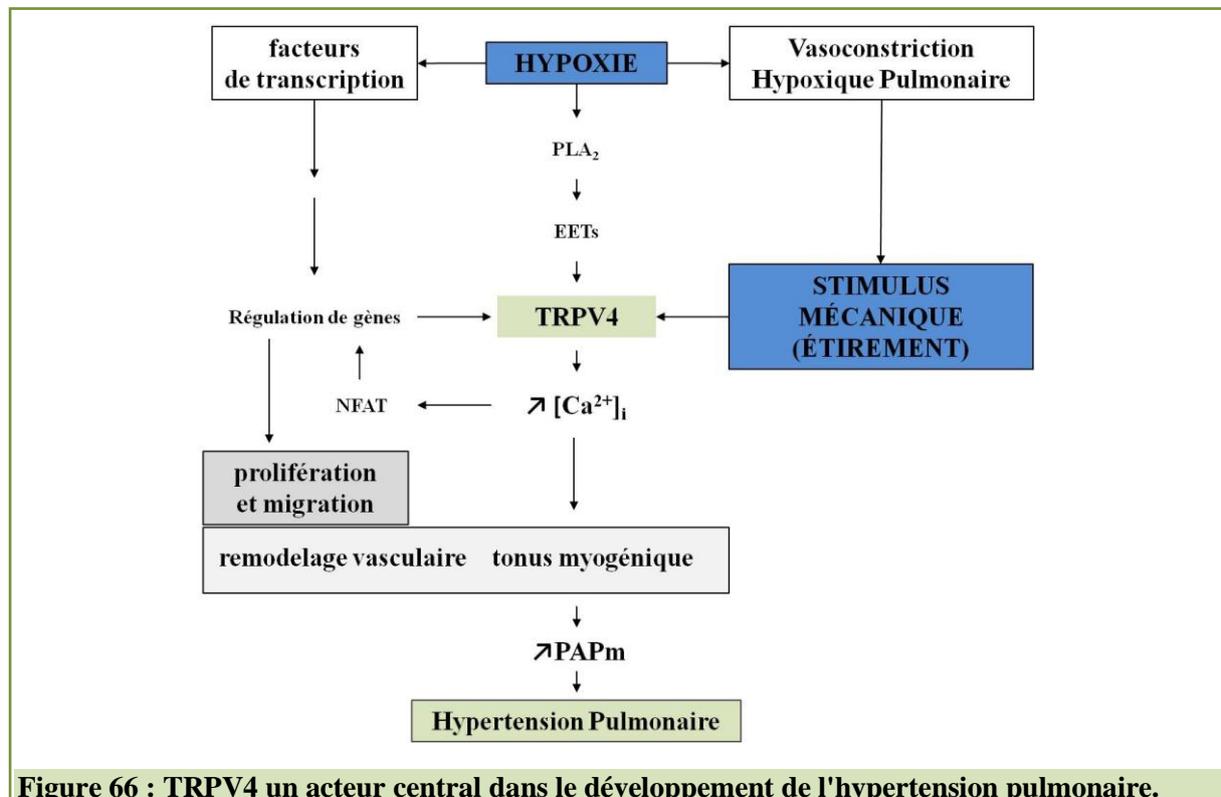


Figure 66 : TRPV4 un acteur central dans le développement de l'hypertension pulmonaire.

En conclusion, notre étude renforce l'hypothèse que TRPV4 serait un acteur central dans le développement de l'HTP. L'hypoxie et le stress mécanique, engendré par la vasoconstriction hypoxique, induiraient un influx calcique via l'activation de TRPV4. Durant l'HTP, la suractivation de ce canal engendrerait une voie de signalisation potentialisatrice de mécanismes aboutissant au remodelage de la media, à l'augmentation des résistances à l'écoulement, à l'augmentation de la PAPm et au maintien de l'HTP (Figure 66). Avec la surexpression et la suractivation des canaux TRPC1 et TRPC6 déjà décrites dans la littérature, **TRPV4 constitue un nouvel acteur dans la signalisation calcique des AIP, contribuant à l'exacerbation de la pathologie par son action multifactorielle.**

Il serait également intéressant d'étudier l'impact qu'auraient les deux stimuli étudiés au cours de cette thèse de manière simultanée, et non plus en parallèle. Ces deux stimuli agissent sur la signalisation induite par l'activation de TRPV4. La combinaison de ces deux conditionnements (hypoxie et étirement cyclique) permettrait de déterminer *in vitro* si ces deux stimuli ont des effets cumulatifs sur la physiologie de la CMLAP. Comme détaillé dans la section "perspectives", la combinaison des deux conditionnements, ainsi qu'une approche tissulaire, plus intégrée, sur artère entière, apporteront d'autres d'éléments de compréhension pouvant servir de comparaison pour nos deux modèles.

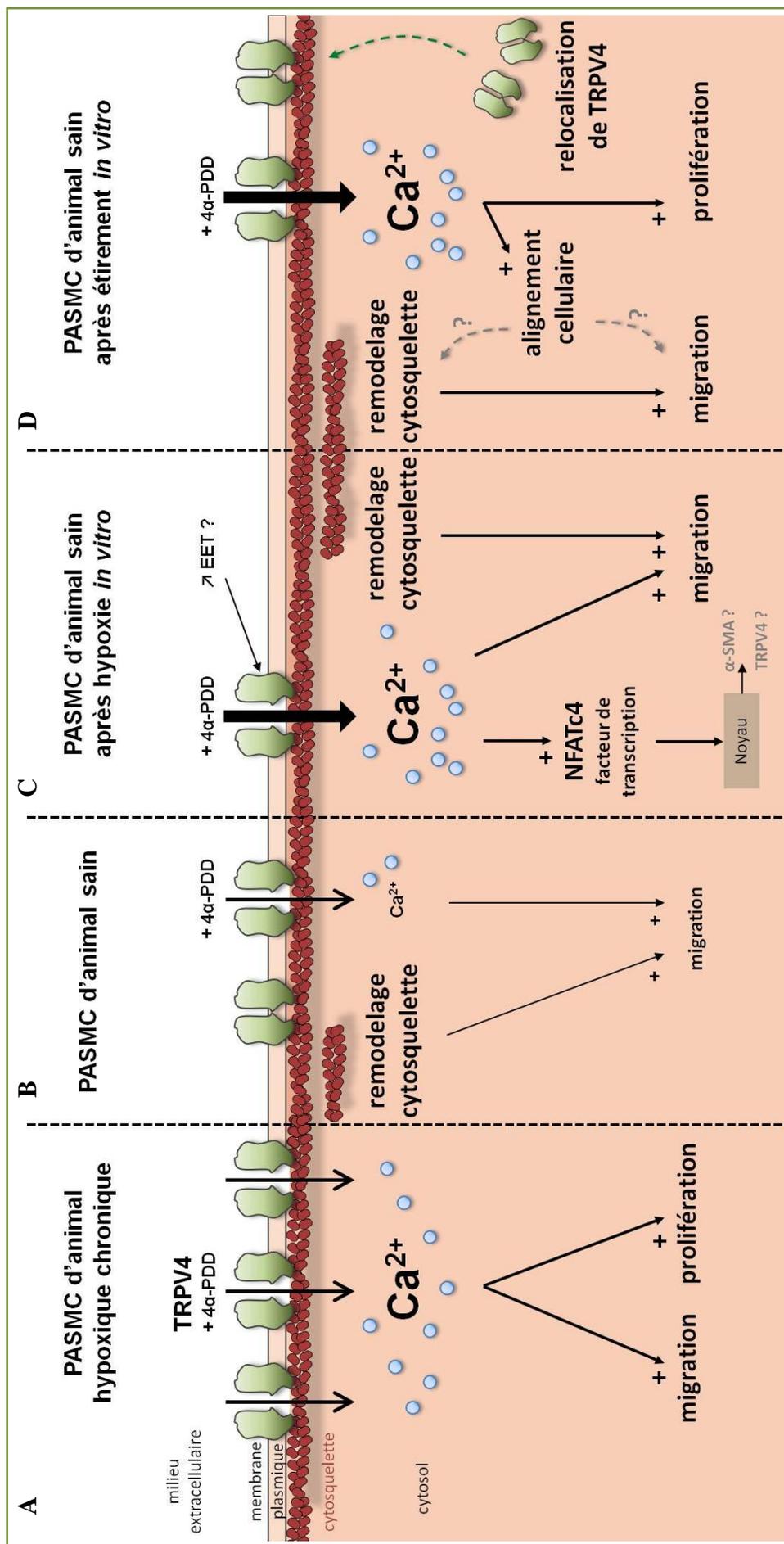


Figure 67 : Comparaison des signalisations cellulaires entre le modèle pathologique hypoxique chronique et les deux conditionnements *in vitro* développés dans cette étude.

(A) Représentation schématique des mécanismes cellulaires intervenant dans des CMLAP issues d'un animal hypoxique chronique. (B) Représentation schématique des mécanismes cellulaires intervenant dans des CMLAP issues d'un animal sain normoxique. (C) Action d'un conditionnement hypoxique (1 % O₂) pendant 48 heures sur des CMLAP issues d'un animal sain normoxique. (D) Action d'un conditionnement à l'étirement sur des CMLAP issues d'un animal sain normoxique. "+" indique une potentialisation.

PERSPECTIVES

1. Étude *in vitro* du double conditionnement : stretch et hypoxie

Nos travaux montrent un effet direct à la fois de l'hypoxie et de l'étirement sur les CMLAP *in vitro*. Les deux modèles mis en place permettent de retrouver certains aspects cellulaires caractéristiques des CMLAP au cours d'une HTP. Dans la mesure où ces deux facteurs sont présents dans le modèle animal d'HTP (de groupe 3), il serait intéressant d'étudier, *in vitro*, un conditionnement cellulaire cumulant l'hypoxie et l'étirement cyclique. L'utilisation d'un tel conditionnement pourra nous permettre de déterminer, à l'aide d'expériences similaires à celles réalisées au cours de cette thèse, si ces facteurs ont des effets cumulatifs sur la physiologie des CMLAP ou s'ils induisent d'autres réponses caractéristiques d'une HTP telles que l'inhibition de l'apoptose.

2. Étude *ex vivo* de modèles intégrés

2.1. Microvaisseaux pressurisés

L'influence des deux conditionnements développés au cours de cette thèse pourra être étudiée sur les interactions complexes entre les différentes populations cellulaires de l'artère intrapulmonaire, notamment en ce qui concerne les jonctions myo-endothéliales. Mes travaux pourraient être enrichis par des études dans des modèles plus intégrés : au niveau du tissu entier et isolé.

Tout d'abord, l'utilisation d'artères entières isolées nous permettra d'approfondir ces études au sein du tissu intact. Après dissection les microvaisseaux d'artères intrapulmonaires (diamètre < 200-300 μm) provenant de souris sauvage et knock-out pour Trpv4 seront canulés et pressurisés à 37 °C dans un artériographe adapté à la culture tissulaire. En effet, ce dispositif commercialisé par Danish Myo Technology (Culture Myograph System 204), et disponible au laboratoire, permet de conserver plusieurs jours les microvaisseaux en contrôlant leur niveau de pressurisation (Figure 68). Ce modèle intégré présente les avantages, d'une part, de conserver un endothélium fonctionnel, acteur important de la réactivité vasculaire pulmonaire impliqué dans l'HTP, et d'autre part, de travailler sur des vaisseaux de faible diamètre. En effet, il existe une hétérogénéité phénotypique et fonctionnelle le long du lit artériel pulmonaire, les petits vaisseaux pulmonaires étant particulièrement importants dans la régulation du flux sanguin artériel aussi bien en conditions physiologiques (vasoconstriction hypoxique pulmonaire) que pathologiques (hypertension pulmonaire), où leur remodelage participe à l'augmentation des résistances vasculaires.

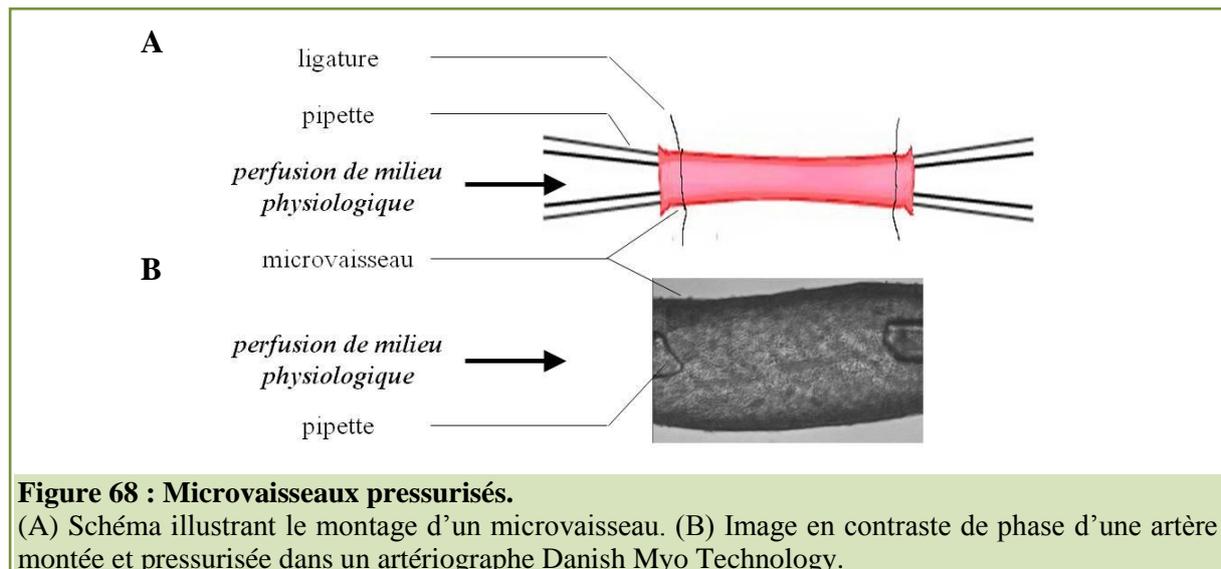
Ce système permettrait, de manière similaire aux travaux présentés dans le cadre de cette thèse, d'étudier indépendamment l'intervention de l'hypoxie ou du stress mécanique sur les artères pulmonaires par des conditionnements *ex vivo*.

Premièrement, les microvaisseaux pourraient être exposés à une hypoxie, en modulant la portion d'oxygène dans le mélange de gaz servant à buller le milieu de perfusion. Puis, les microvaisseaux pourraient être conditionnés à différents niveaux de pressurisation, en modulant la pression intraluminale.

Les microvaisseaux seront alors placés sur un système d'imagerie calcique (Coolsnap fx Monochrome, Photometrics) permettant ainsi les mesures simultanées de la concentration calcique intravasculaire (via la sonde Fura-PE3/AM) et de la contraction (par mesure des variations de diamètre de l'artère). Les conséquences des deux conditionnements seront alors

évaluées sur l'expression de TRPV4 (immunofluorescence, qRT-PCR, Western-blot), ainsi que sur l'activité (réponse calcique et contraction). L'identification d'autres isoformes de TRPV mécanosensibles sera déterminée en étudiant les réponses calciques aux différents agonistes, ainsi que par des approches de siRNA sur tissu entier [343], en plus de l'utilisation des artères issues de souris knock-out pour *trpv4*.

Cependant la canulation d'artères intrapulmonaires de souris reste difficile, de par leur petite taille, mais surtout par **la présence de nombreuses ramifications**, rendant difficile la pressurisation des artères. Des travaux de mise au point sont en cours de réalisation au laboratoire.



2.2. Tranches de poumon

Enfin, l'utilisation de tranches de poumons pourrait permettre d'étudier simultanément *in situ* les CMLAP et les cellules endothéliales. Dans ce modèle, on conserve l'organisation spatiale des différents éléments (voies respiratoires, système circulatoire, parenchyme) et l'influence du tissu environnant notamment via les terminaisons nerveuses et les cellules du système immunitaire. Il permettrait une étude simultanée des principaux mécanismes liés au développement d'une HTP : la vasoconstriction par la mesure du diamètre des vaisseaux, le remodelage de la media par la mesure directe de son épaisseur, et de la lumière des vaisseaux dans différentes conditions, ainsi que la prolifération des CMLAP par marquage du KI-67. Cette méthode, couramment utilisée sur le cerveau, est plus délicate à appliquer sur le poumon, car c'est un organe présentant une grande élasticité. C'est pourquoi, afin de réaliser des sections des différents lobes pulmonaires, les voies aériennes devront être remplies préalablement par de l'agarose [344], rigidifiant ainsi le tissu sans léser les structures à étudier, puis des coupes seront réalisées à l'aide d'un vibratome.

3. Modèle *in vivo* : Étude du modèle d'hypertension pulmonaire sévère

L'implication de TRPV4 dans un modèle d'hypertension pulmonaire sévère serait intéressante à étudier. Les rats ayant subi le double traitement (hypoxie chronique et injection de monocrotaline) présentent un rapport de Fulton significativement plus élevé que les rats sains ($0,48 \pm 0,04$; N = 6 et $0,25 \pm 0,01$; N = 14 respectivement). Des études préliminaires montrent une très forte suractivation de ce canal dans ce modèle pathologique. En effet, une augmentation significative de l'amplitude de la $[Ca^{2+}]_i$ est observée après stimulation au 4α -PDD ($5 \mu\text{M}$) avec : $193 \pm 18 \text{ nM}$ (n = 27) pour le modèle sévère contre $106 \pm 11 \text{ nM}$ (n = 23) chez le contrôle (Figure 69).

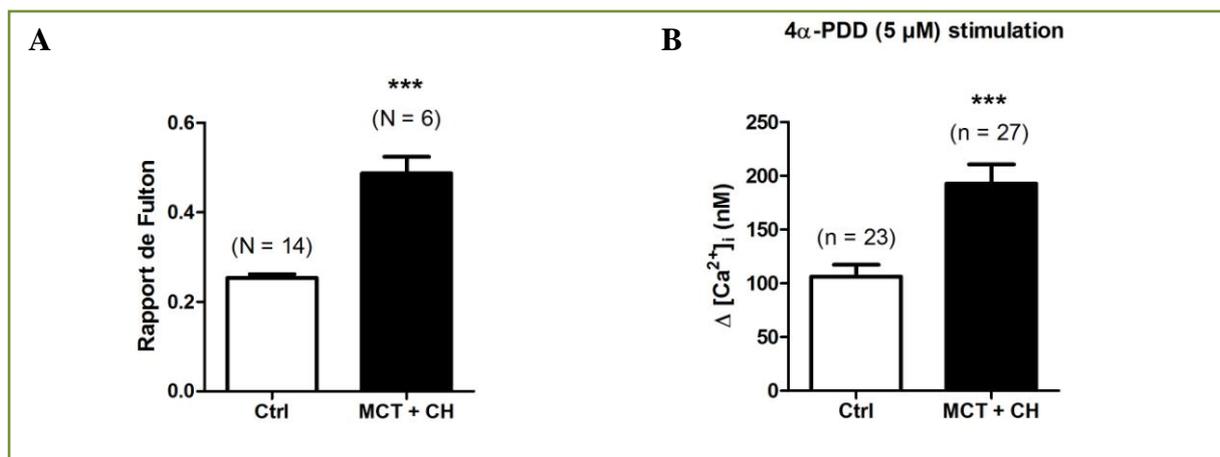


Figure 69 : Résultats préliminaires dans un modèle d'HTP sévère.

(A) Rapport de Fulton mesuré chez les rats contrôles (Ctrl) et le modèle sévère d'HTP (injectés à la monocrotaline et soumis à une hypoxie chronique – MCT + CH). (B) Augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ en nM induite par l'application de 4α -PDD ($5 \mu\text{M}$) sur des CMLAP issues de rats contrôles (Ctrl) ou de modèle d'HTP sévère (injectés à la monocrotaline et soumis à une hypoxie chronique – MCT + CH). Chaque valeur représente une valeur moyenne \pm SEM. (N) indique le nombre d'animaux testés, (n) indique le nombre de cellules étudiées. *** indique une différence significative pour $p < 0,001$. Test de Mann et Whitney.

4. Étude sur l'humain

Enfin, l'accès à du tissu humain (via une collaboration entamée avec le service de chirurgie thoracique du CHU de Bordeaux) est particulièrement important. Les résultats obtenus chez l'animal, au cours de cette thèse, mais également les résultats des expériences prévues en perspectives devront être confirmés dans des CMLAP humaines.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le travail de cette thèse apporte des éléments de réponses sur le rôle et l'implication des canaux TRPV4 dans la circulation pulmonaire, et notamment dans le développement de l'hypertension pulmonaire, une des principales pathologies de la circulation pulmonaire.

Durant l'établissement d'une hypertension pulmonaire de groupe 3 (liée à une hypoxie), deux facteurs physiques peuvent agir sur les cellules musculaires lisses de la circulation pulmonaire : l'hypoxie et le stress mécanique (engendré par l'augmentation des tensions pariétales). Nous avons montré que chacun de ces facteurs environnementaux à la cellule musculaire lisse, indépendamment l'un de l'autre, pouvait induire une modification de la signalisation calcique induite par les canaux de type SAC et TRPV4. D'un point de vue fondamental, ces travaux présentent un intérêt physiopathologique évident car ils permettront de mieux comprendre les mécanismes qui, au sein de la paroi des artères pulmonaires, conduisent au développement et au maintien de l'hypertension pulmonaire (HTP). En termes de santé publique, l'HTP représente un enjeu important, en raison du fort taux de mortalité lié au développement d'une insuffisance ventriculaire droite. Les démarches thérapeutiques pour contrer l'HTP sont encore très limitées (essentiellement des vasodilatateurs) et aboutissent trop souvent à une greffe cœur/poumon avec une courte espérance de vie après l'opération.

Les résultats obtenus au cours de cette étude pourront contribuer à l'identification de nouvelles cibles moléculaires et éventuellement à l'élaboration de stratégies thérapeutiques ciblant les canaux sensibles à l'étirement et plus particulièrement les canaux TRPV mécanosensibles dans la circulation pulmonaire. Ces stratégies cibleraient les mécanismes cellulaires liés au remodelage vasculaire et à l'hypertrophie de la media qui ont lieu au cours de l'HTP. Au niveau cellulaire, l'augmentation de la $[Ca^{2+}]_i$ est corrélée avec une augmentation de l'expression et de l'activation de TRPV4 chez les animaux hypoxiques chroniques. L'implication de TRPV4 dans de nombreux mécanismes liés à la pathologie (perturbation de l'homéostasie calcique, augmentation de la migration et de la prolifération) en fait une cible thérapeutique de choix, pouvant agir sur plusieurs aspects de la pathologie. Cependant, son implication dans la physiologie des CMLAP peut être perçue d'un point de vue bénéfique (vasoconstriction hypoxique pulmonaire) ou délétère (participation dans la muscularisation des petits vaisseaux). De plus, ce canal est fortement exprimé dans l'endothélium [345, 346], mais également dans la circulation systémique (aussi bien dans les grands vaisseaux que dans les petits) [248, 347], ainsi que dans les voies aériennes [348]. Ces éléments sont à prendre en considération pour une éventuelle utilisation thérapeutique afin d'éviter des effets secondaires délétères. De plus, ce canal est polymodal, il peut être activé par un grand nombre de stimuli, et les agents pharmacologiques actuels ciblant TRPV4 ne sont pas tissus spécifiques pour entreprendre leur utilisation en tant que traitement. Cependant des études sont actuellement en cours afin de développer de telles molécules [349]. La génération d'agents pharmacologiques pouvant cibler spécifiquement une isoforme des TRP est l'un des enjeux majeur des années à venir.

Une autre démarche consisterait à agir sur les acteurs qui interviennent dans les voies de signalisations induites par l'activation de TRPV4. Le facteur de transcription NFAT, par exemple, joue un rôle important dans le développement de l'HTP en participant à la muscularisation des petits vaisseaux. Ce dernier fait actuellement l'objet de nombreuses études, notamment dans le contexte de l'HTP. Certains agents ciblant cette voie (comme la cyclosporine qui inhibe la calcineurine par exemple) sont déjà utilisés en tant qu'immunodépresseurs (transplantation d'organes par exemple). Le VIVIT, un peptide inhibiteur de la calcineurine, est déjà en cours de test clinique dans le traitement de l'HTP [154].

En conclusion, nous espérons qu'une compréhension plus approfondie, ainsi qu'une vision plus intégrée des canaux TRP mécanosensibles dans la pathologie, faciliteront le développement de nouveaux traitements pour les patients atteints d'hypertension pulmonaire.

BIBLIOGRAPHIE

1. West, J.B., *Pulmonary physiology and pathophysiology*, ed. W.a. Wilkins. Vol. 1. 1978.
2. Ando, H., et al., *Cardiac microvascular endothelial cells express alpha-smooth muscle actin and show low NOS III activity*. *Am J Physiol*, 1999. **276**(5 Pt 2): p. H1755-68.
3. Peter Harris and D. Heath, *The Human Pulmonary Circulation*, ed. C. Livingstone. Vol. 1. 1977.
4. Cournand, A., R.A. Bloomfield, and H.D. Lauson, *Double lumen catheter for intravenous and intracardiac blood sampling and pressure recording*. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1945. **60**: p. 73-5.
5. Lewitsky, M.G., *Pulmonary Physiology, eighth edition*, ed. M. Graw-Hill. Vol. 1. 2013.
6. Song, S., et al., *Flow shear stress enhances intracellular Ca²⁺ signaling in pulmonary artery smooth muscle cells from patients with pulmonary arterial hypertension*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2014. **307**(4): p. C373-83.
7. Sun, R.Y., et al., *Effects of lung volume and alveolar surface tension on pulmonary vascular resistance*. *J Appl Physiol* (1985), 1987. **62**(4): p. 1622-6.
8. von Euler, U.S. and G. Liljestrand, *Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat*. *Acta Physiol. Scand.*, 1946. **12**: p. 301-320.
9. Sylvester, J.T., et al., *Hypoxic pulmonary vasoconstriction*. *Physiol Rev*, 2012. **92**(1): p. 367-520.
10. Guénard, H., *Physiologie Humaine*, ed. Pradel. Vol. 1. 2001.
11. Somlyo, A.P. and A.V. Somlyo, *Signal transduction and regulation in smooth muscle*. *Nature*, 1994. **372**(6503): p. 231-6.
12. Archer, S.L., et al., *Impairment of hypoxic pulmonary vasoconstriction in mice lacking the voltage-gated potassium channel Kv1.5*. *FASEB J*, 2001. **15**(10): p. 1801-3.
13. Hong, Z., et al., *Subacute hypoxia decreases voltage-activated potassium channel expression and function in pulmonary artery myocytes*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2004. **31**(3): p. 337-43.
14. Moudgil, R., E.D. Michelakis, and S.L. Archer, *Hypoxic pulmonary vasoconstriction*. *J Appl Physiol* (1985), 2005. **98**(1): p. 390-403.
15. Heath, D., *The histological features and physical characteristics of the pulmonary trunk at high altitude*. *Pathol Microbiol (Basel)*, 1973. **39**(3): p. 266-9.
16. Nakanishi, K., et al., *Pulmonary, vascular responses in rats exposed to chronic hypobaric hypoxia at two different altitude levels*. *Pathol Res Pract*, 1996. **192**(10): p. 1057-67.
17. Sizlan, A., et al., *Blood pressure changes in young male subjects exposed to a median altitude*. *Clin Auton Res*, 2008. **18**(2): p. 84-9.
18. Banchemo, N., *Cardiovascular responses to chronic hypoxia*. *Annu Rev Physiol*, 1987. **49**: p. 465-76.
19. Vizek, M., C.K. Pickett, and J.V. Weil, *Biphasic ventilatory response of adult cats to sustained hypoxia has central origin*. *J Appl Physiol* (1985), 1987. **63**(4): p. 1658-64.
20. Ge, R.L., et al., *Blunted hypoxic pulmonary vasoconstrictive response in the rodent *Ochotona curzoniae* (pika) at high altitude*. *Am J Physiol*, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1792-9.
21. Powell, S.R., et al., *Acute effects of nonlethal in utero hypoxia on fetal guinea pig heart and lack of persistent cardiac or cerebral effects in the neonate*. *Biol Neonate*, 2004. **86**(4): p. 240-6.
22. Naeije, R. and C. Dedobbeleer, *Pulmonary hypertension and the right ventricle in hypoxia*. *Exp Physiol*, 2013. **98**(8): p. 1247-56.
23. Lumb, A.B. and P. Slinger, *Hypoxic pulmonary vasoconstriction: physiology and anesthetic implications*. *Anesthesiology*, 2015. **122**(4): p. 932-46.
24. Simonneau, G., *[A new clinical classification of pulmonary hypertension]*. *Bull Acad Natl Med*, 2009. **193**(8): p. 1897-909.
25. Simonneau, G., et al., *Updated clinical classification of pulmonary hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(1 Suppl): p. S43-54.
26. Farber, H.W. and J. Loscalzo, *Pulmonary arterial hypertension*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(16): p. 1655-65.
27. Miyamoto, S., et al., *Clinical correlates and prognostic significance of six-minute walk test in patients with primary pulmonary hypertension. Comparison with cardiopulmonary exercise testing*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2000. **161**(2 Pt 1): p. 487-92.

28. Zafzir, N., et al., *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, 2007. **23**(2): p. 209-15.
29. Galie, N., et al., *Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT)*. Eur Heart J, 2009. **30**(20): p. 2493-537.
30. Badesch, D.B., et al., *Diagnosis and assessment of pulmonary arterial hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2009. **54**(1 Suppl): p. S55-66.
31. Humbert, M., et al., *Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry*. Am J Respir Crit Care Med, 2006. **173**(9): p. 1023-30.
32. Weitzenblum, E. and A. Chaouat, *Severe pulmonary hypertension in COPD: is it a distinct disease?* Chest, 2005. **127**(5): p. 1480-2.
33. Simonneau, G., et al., *Updated clinical classification of pulmonary hypertension*. J Am Coll Cardiol, 2013. **62**(25 Suppl): p. D34-41.
34. Authors/Task Force, M., et al., *2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS) Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT)*. Eur Heart J, 2015.
35. Bayliss, W.M., *On the local reactions of the arterial wall to changes of internal pressure*. J Physiol, 1902. **28**(3): p. 220-31.
36. Sadurski, R., et al., *Diameters of juxtacapillary venules determined by oil-drop method in rat lung*. J Appl Physiol (1985), 1994. **77**(2): p. 718-25.
37. Kuebler, W.M., X. Ying, and J. Bhattacharya, *Pressure-induced endothelial Ca(2+) oscillations in lung capillaries*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **282**(5): p. L917-23.
38. Tanabe, Y., et al., *Role of secretory phospholipase A(2) in rhythmic contraction of pulmonary arteries of rats with monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension*. J Pharmacol Sci, 2012. **119**(3): p. 271-81.
39. Broughton, B.R., B.R. Walker, and T.C. Resta, *Chronic hypoxia induces Rho kinase-dependent myogenic tone in small pulmonary arteries*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008. **294**(4): p. L797-806.
40. Naik, J.S., et al., *Pressure-induced smooth muscle cell depolarization in pulmonary arteries from control and chronically hypoxic rats does not cause myogenic vasoconstriction*. J Appl Physiol (1985), 2005. **98**(3): p. 1119-24.
41. Gao, Y. and J.U. Raj, *Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn*. Physiol Rev, 2010. **90**(4): p. 1291-335.
42. Belik, J., *Myogenic response in large pulmonary arteries and its ontogenesis*. Pediatr Res, 1994. **36**(1 Pt 1): p. 34-40.
43. Nakayama, K., et al., *Stretch-induced contraction of rabbit isolated pulmonary artery and the involvement of endothelium-derived thromboxane A2*. Br J Pharmacol, 1997. **122**(2): p. 199-208.
44. Tanabe, Y., et al., *Inhibition of untransformed prostaglandin H(2) production and stretch-induced contraction of rabbit pulmonary arteries by Indoxam, a selective secretory phospholipase A(2) inhibitor*. J Pharmacol Sci, 2011. **115**(4): p. 525-31.
45. Belik, J., *The myogenic response of arterial vessels is increased in fetal pulmonary hypertension*. Pediatr Res, 1995. **37**(2): p. 196-201.
46. Kulik, T.J., J.N. Evans, and W.J. Gamble, *Stretch-induced contraction in pulmonary arteries*. Am J Physiol, 1988. **255**(6 Pt 2): p. H1391-8.
47. Ducret, T., et al., *Stretch-activated channels in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats*. Cell Calcium, 2010. **48**(5): p. 251-9.

48. MacLean, M.R., et al., *5-Hydroxytryptamine receptors mediating vasoconstriction in pulmonary arteries from control and pulmonary hypertensive rats*. *Br J Pharmacol*, 1996. **119**(5): p. 917-30.
49. Rodat, L., et al., *Effect of chronic hypoxia on voltage-independent calcium influx activated by 5-HT in rat intrapulmonary arteries*. *Pflugers Arch*, 2007. **454**(1): p. 41-51.
50. Billaud, M., et al., *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**: p. 30.
51. Herve, P., et al., *Increased plasma serotonin in primary pulmonary hypertension*. *Am J Med*, 1995. **99**(3): p. 249-54.
52. Izikki, M., et al., *Tryptophan hydroxylase 1 knockout and tryptophan hydroxylase 2 polymorphism: effects on hypoxic pulmonary hypertension in mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007. **293**(4): p. L1045-52.
53. Dewachter, L., et al., *Angiopoietin/Tie2 pathway influences smooth muscle hyperplasia in idiopathic pulmonary hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **174**(9): p. 1025-33.
54. Rodat-Despoix, L., et al., *Signalling pathways involved in the contractile response to 5-HT in the human pulmonary artery*. *Eur Respir J*, 2009. **34**(6): p. 1338-47.
55. Willers, E.D., et al., *Serotonin transporter polymorphisms in familial and idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2006. **173**(7): p. 798-802.
56. Giaid, A., et al., *Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension*. *N Engl J Med*, 1993. **328**(24): p. 1732-9.
57. Hyvelin, J.M., et al., *Cellular mechanisms and role of endothelin-1-induced calcium oscillations in pulmonary arterial myocytes*. *Am J Physiol*, 1998. **275**(2 Pt 1): p. L269-82.
58. Jeffery, T.K. and J.C. Wanstall, *Pulmonary vascular remodeling: a target for therapeutic intervention in pulmonary hypertension*. *Pharmacol Ther*, 2001. **92**(1): p. 1-20.
59. Sheikh, A.Q., J.K. Lighthouse, and D.M. Greif, *Recapitulation of developing artery muscularization in pulmonary hypertension*. *Cell Rep*, 2014. **6**(5): p. 809-17.
60. Morrell, N.W., et al., *Cellular and molecular basis of pulmonary arterial hypertension*. *J Am Coll Cardiol*, 2009. **54**(1 Suppl): p. S20-31.
61. Morimatsu, Y., et al., *Development and characterization of an animal model of severe pulmonary arterial hypertension*. *J Vasc Res*, 2012. **49**(1): p. 33-42.
62. Sakao, S. and K. Tatsumi, *The effects of antiangiogenic compound SU5416 in a rat model of pulmonary arterial hypertension*. *Respiration*, 2011. **81**(3): p. 253-61.
63. Perros, F., et al., *Platelet-derived growth factor expression and function in idiopathic pulmonary arterial hypertension*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2008. **178**(1): p. 81-8.
64. Lee, S.L., et al., *Serotonin stimulates mitogen-activated protein kinase activity through the formation of superoxide anion*. *Am J Physiol*, 1999. **277**(2 Pt 1): p. L282-91.
65. Liu, Y., et al., *Rho kinase-induced nuclear translocation of ERK1/ERK2 in smooth muscle cell mitogenesis caused by serotonin*. *Circ Res*, 2004. **95**(6): p. 579-86.
66. Pitt, B.R., et al., *Serotonin increases DNA synthesis in rat proximal and distal pulmonary vascular smooth muscle cells in culture*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(2 Pt 1): p. L178-86.
67. Lee, S.L., et al., *Serotonin produces both hyperplasia and hypertrophy of bovine pulmonary artery smooth muscle cells in culture*. *Am J Physiol*, 1994. **266**(1 Pt 1): p. L46-52.
68. Lee, S.L., W.W. Wang, and B.L. Fanburg, *Association of Tyr phosphorylation of GTPase-activating protein with mitogenic action of serotonin*. *Am J Physiol*, 1997. **272**(1 Pt 1): p. C223-30.
69. Fanburg, B.L. and S.L. Lee, *A role for the serotonin transporter in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *J Clin Invest*, 2000. **105**(11): p. 1521-3.
70. MacLean, M.R. and Y. Dempsey, *Serotonin and pulmonary hypertension--from bench to bedside?* *Curr Opin Pharmacol*, 2009. **9**(3): p. 281-6.
71. Malenfant, S., et al., *Signal transduction in the development of pulmonary arterial hypertension*. *Pulm Circ*, 2013. **3**(2): p. 278-93.
72. Hayashida, K., et al., *Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *Chest*, 2005. **127**(5): p. 1793-8.

73. Qiao, L., et al., *Endothelial fate mapping in mice with pulmonary hypertension*. *Circulation*, 2014. **129**(6): p. 692-703.
74. Spees, J.L., et al., *Bone marrow progenitor cells contribute to repair and remodeling of the lung and heart in a rat model of progressive pulmonary hypertension*. *FASEB J*, 2008. **22**(4): p. 1226-36.
75. Stenmark, K.R., et al., *Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling*. *Physiology (Bethesda)*, 2006. **21**: p. 134-45.
76. Alberts, B., *Molecular Biology of the Cell*, ed. F. Médecine-Sciences. 1986, 2011. 1472.
77. Glading, A., D.A. Lauffenburger, and A. Wells, *Cutting to the chase: calpain proteases in cell motility*. *Trends Cell Biol*, 2002. **12**(1): p. 46-54.
78. Huttenlocher, A., et al., *Regulation of cell migration by the calcium-dependent protease calpain*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(52): p. 32719-22.
79. Louis, M., et al., *TRPC1 regulates skeletal myoblast migration and differentiation*. *J Cell Sci*, 2008. **121**(Pt 23): p. 3951-9.
80. Sarkar, J., et al., *MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010. **299**(6): p. L861-71.
81. Wojciak-Stothard, B., et al., *Role of RhoB in the regulation of pulmonary endothelial and smooth muscle cell responses to hypoxia*. *Circ Res*, 2012. **110**(11): p. 1423-34.
82. Paulin, R., et al., *Targeting cell motility in pulmonary arterial hypertension*. *Eur Respir J*, 2014. **43**(2): p. 531-44.
83. Leggett, K., et al., *Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **303**(4): p. L343-53.
84. Saadoun, S., et al., *Impairment of angiogenesis and cell migration by targeted aquaporin-1 gene disruption*. *Nature*, 2005. **434**(7034): p. 786-92.
85. Monzani, E., et al., *AQP1 is not only a water channel: it contributes to cell migration through Lin7/beta-catenin*. *PLoS One*, 2009. **4**(7): p. e6167.
86. Zhang, R., et al., *Up-regulation of two actin-associated proteins prompts pulmonary artery smooth muscle cell migration under hypoxia*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009. **41**(4): p. 467-75.
87. Martin, E., et al., *Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells*. *Pflugers Arch*, 2012. **464**(3): p. 261-72.
88. Golovina, V.A., et al., *Upregulated TRP and enhanced capacitative Ca(2+) entry in human pulmonary artery myocytes during proliferation*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **280**(2): p. H746-55.
89. Landsberg, J.W. and J.X. Yuan, *Calcium and TRP channels in pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation*. *News Physiol Sci*, 2004. **19**: p. 44-50.
90. Smaili, S.S., et al., *The role of calcium stores in apoptosis and autophagy*. *Curr Mol Med*, 2013. **13**(2): p. 252-65.
91. Morel, J.L., et al., *Crucial role of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for acetylcholine-induced Ca2+ oscillations in vascular myocytes*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003. **23**(9): p. 1567-75.
92. Grayson, T.H., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries*. *Cell Calcium*, 2004. **36**(6): p. 447-58.
93. Carafoli, E., *Calcium pump of the plasma membrane*. *Physiol Rev*, 1991. **71**(1): p. 129-53.
94. Carafoli, E., *The plasma membrane calcium pump. Structure, function, regulation*. *Biochim Biophys Acta*, 1992. **1101**(2): p. 266-7.
95. Eisner, D.A. and W.J. Lederer, *Na-Ca exchange: stoichiometry and electrogenicity*. *Am J Physiol*, 1985. **248**(3 Pt 1): p. C189-202.
96. Parekh, A.B. and R. Penner, *Store depletion and calcium influx*. *Physiol Rev*, 1997. **77**(4): p. 901-30.

97. Putney, J.W., Jr., *A model for receptor-regulated calcium entry*. Cell Calcium, 1986. **7**(1): p. 1-12.
98. Feske, S., et al., *A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 179-85.
99. Liou, J., et al., *STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx*. Curr Biol, 2005. **15**(13): p. 1235-41.
100. Roos, J., et al., *STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function*. J Cell Biol, 2005. **169**(3): p. 435-45.
101. Vig, M., et al., *CRACM1 is a plasma membrane protein essential for store-operated Ca²⁺ entry*. Science, 2006. **312**(5777): p. 1220-3.
102. Zhang, W.M., et al., *ET-1 activates Ca²⁺ sparks in PASMC: local Ca²⁺ signaling between inositol trisphosphate and ryanodine receptors*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003. **285**(3): p. L680-90.
103. Dahan, D., et al., *Implication of the ryanodine receptor in TRPV4-induced calcium response in pulmonary arterial smooth muscle cells from normoxic and chronically hypoxic rats*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012.
104. Urena, J., A. del Valle-Rodriguez, and J. Lopez-Barneo, *Metabotropic Ca²⁺ channel-induced calcium release in vascular smooth muscle*. Cell Calcium, 2007. **42**(4-5): p. 513-20.
105. West, J., et al., *Pulmonary hypertension in transgenic mice expressing a dominant-negative BMPRII gene in smooth muscle*. Circ Res, 2004. **94**(8): p. 1109-14.
106. Liu, X.R., et al., *Enhanced store-operated Ca²⁺ entry and TRPC channel expression in pulmonary arteries of monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(1): p. C77-87.
107. Song, M.Y., A. Makino, and J.X. Yuan, *STIM2 Contributes to Enhanced Store-operated Ca Entry in Pulmonary Artery Smooth Muscle Cells from Patients with Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension*. Pulm Circ, 2011. **1**(1): p. 84-94.
108. Pauvert, O., et al., *Effect of sildenafil on cyclic nucleotide phosphodiesterase activity, vascular tone and calcium signaling in rat pulmonary artery*. Br J Pharmacol, 2003. **139**(3): p. 513-22.
109. Yadav, V.R., et al., *Important role of PLC-gamma1 in hypoxic increase in intracellular calcium in pulmonary arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2013. **304**(3): p. L143-51.
110. Fagan, K.A., et al., *Attenuation of acute hypoxic pulmonary vasoconstriction and hypoxic pulmonary hypertension in mice by inhibition of Rho-kinase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(4): p. L656-64.
111. Gainé, S.P., M.A. Hales, and N.A. Flavahan, *Hypoxic pulmonary endothelial cells release a diffusible contractile factor distinct from endothelin*. Am J Physiol, 1998. **274**(4 Pt 1): p. L657-64.
112. Littler, C.M., et al., *Divergent contractile and structural responses of the murine PKC-epsilon null pulmonary circulation to chronic hypoxia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(6): p. L1083-93.
113. Ogawa, A., et al., *PDGF enhances store-operated Ca²⁺ entry by upregulating STIM1/Orai1 via activation of Akt/mTOR in human pulmonary arterial smooth muscle cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2012. **302**(2): p. C405-11.
114. Smirnov, S.V., et al., *Chronic hypoxia is associated with reduced delayed rectifier K⁺ current in rat pulmonary artery muscle cells*. Am J Physiol, 1994. **266**(1 Pt 2): p. H365-70.
115. Suzuki, H. and B.M. Twarog, *Membrane properties of smooth muscle cells in pulmonary hypertensive rats*. Am J Physiol, 1982. **242**(5): p. H907-15.
116. Platoshyn, O., et al., *Chronic hypoxia decreases K(V) channel expression and function in pulmonary artery myocytes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(4): p. L801-12.
117. Reeve, H.L., et al., *Alterations in a redox oxygen sensing mechanism in chronic hypoxia*. J Appl Physiol (1985), 2001. **90**(6): p. 2249-56.
118. Wang, J., et al., *Chronic hypoxia inhibits Kv channel gene expression in rat distal pulmonary artery*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **288**(6): p. L1049-58.

119. Sumpio, B.E., et al., *Alterations in aortic endothelial cell morphology and cytoskeletal protein synthesis during cyclic tensional deformation*. J Vasc Surg, 1988. **7**(1): p. 130-8.
120. Sumpio, B.E. and A.J. Banes, *Prostacyclin synthetic activity in cultured aortic endothelial cells undergoing cyclic mechanical deformation*. Surgery, 1988. **104**(2): p. 383-9.
121. Upchurch, G.R., Jr., et al., *Differences in secretion of prostacyclin by venous and arterial endothelial cells grown in vitro in a static versus a mechanically active environment*. J Vasc Surg, 1989. **10**(3): p. 292-8.
122. Owens, G.K., *Role of mechanical strain in regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1054-5.
123. Reusch, P., et al., *Mechanical strain increases smooth muscle and decreases nonmuscle myosin expression in rat vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1996. **79**(5): p. 1046-53.
124. Leung, D.Y., S. Glagov, and M.B. Mathews, *Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells in vitro*. Science, 1976. **191**(4226): p. 475-7.
125. Wilson, E., et al., *Mechanical strain induces growth of vascular smooth muscle cells via autocrine action of PDGF*. J Cell Biol, 1993. **123**(3): p. 741-7.
126. Mata-Greenwood, E., et al., *Cyclic stretch increases VEGF expression in pulmonary arterial smooth muscle cells via TGF-beta1 and reactive oxygen species: a requirement for NAD(P)H oxidase*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(2): p. L288-9.
127. Zhao, S., et al., *Synergistic effects of fluid shear stress and cyclic circumferential stretch on vascular endothelial cell morphology and cytoskeleton*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1995. **15**(10): p. 1781-6.
128. Weiser, M.C., et al., *Static tension is associated with increased smooth muscle cell DNA synthesis in rat pulmonary arteries*. Am J Physiol, 1995. **268**(3 Pt 2): p. H1133-8.
129. Setoguchi, M., et al., *Stretch-activated whole-cell currents in smooth muscle cells from mesenteric resistance artery of guinea-pig*. J Physiol, 1997. **501** (Pt 2): p. 343-53.
130. Davis, M.J. and M.A. Hill, *Signaling mechanisms underlying the vascular myogenic response*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 387-423.
131. Shimoda, L.A., et al., *HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **291**(5): p. L941-9.
132. Wang, J., et al., *Hypoxia inducible factor 1 mediates hypoxia-induced TRPC expression and elevated intracellular Ca²⁺ in pulmonary arterial smooth muscle cells*. Circ Res, 2006. **98**(12): p. 1528-37.
133. Hill-Eubanks, D.C., et al., *NFAT regulation in smooth muscle*. Trends Cardiovasc Med, 2003. **13**(2): p. 56-62.
134. Rao, A., C. Luo, and P.G. Hogan, *Transcription factors of the NFAT family: regulation and function*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 707-47.
135. Lopez-Rodriguez, C., et al., *NFAT5, a constitutively nuclear NFAT protein that does not cooperate with Fos and Jun*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(13): p. 7214-9.
136. Zhu, J. and F. McKeon, *Nucleocytoplasmic shuttling and the control of NF-AT signaling*. Cell Mol Life Sci, 2000. **57**(3): p. 411-20.
137. Aramburu, J., A. Rao, and C.B. Klee, *Calcineurin: from structure to function*. Curr Top Cell Regul, 2000. **36**: p. 237-95.
138. Okamura, H., et al., *Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity*. Mol Cell, 2000. **6**(3): p. 539-50.
139. Shibasaki, F., et al., *Role of kinases and the phosphatase calcineurin in the nuclear shuttling of transcription factor NF-AT4*. Nature, 1996. **382**(6589): p. 370-3.
140. Zhu, J., et al., *Intramolecular masking of nuclear import signal on NF-AT4 by casein kinase I and MEKK1*. Cell, 1998. **93**(5): p. 851-61.
141. Boss, V., et al., *The cyclosporin A-sensitive nuclear factor of activated T cells (NFAT) proteins are expressed in vascular smooth muscle cells. Differential localization of NFAT isoforms and induction of NFAT-mediated transcription by phospholipase C-coupled cell surface receptors*. J Biol Chem, 1998. **273**(31): p. 19664-71.

142. Gomez, M.F., et al., *Opposing actions of inositol 1,4,5-trisphosphate and ryanodine receptors on nuclear factor of activated T-cells regulation in smooth muscle*. J Biol Chem, 2002. **277**(40): p. 37756-64.
143. Graef, I.A., F. Chen, and G.R. Crabtree, *NFAT signaling in vertebrate development*. Curr Opin Genet Dev, 2001. **11**(5): p. 505-12.
144. Wada, H., et al., *Calcineurin-GATA-6 pathway is involved in smooth muscle-specific transcription*. J Cell Biol, 2002. **156**(6): p. 983-91.
145. Ohkawa, Y., K. Hayashi, and K. Sobue, *Calcineurin-mediated pathway involved in the differentiated phenotype of smooth muscle cells*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(1): p. 78-83.
146. Gonzalez Bosc, L.V., et al., *Intraluminal pressure is a stimulus for NFATc3 nuclear accumulation: role of calcium, endothelium-derived nitric oxide, and cGMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10702-9.
147. Graef, I.A., et al., *Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature*. Cell, 2001. **105**(7): p. 863-75.
148. de Frutos, S., et al., *NFATc3 mediates chronic hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling with alpha-actin up-regulation*. J Biol Chem, 2007. **282**(20): p. 15081-9.
149. Durmowicz, A.G. and K.R. Stenmark, *Mechanisms of structural remodeling in chronic pulmonary hypertension*. Pediatr Res, 1999. **20**(11): p. e91-e102.
150. Jones, R., M. Jacobson, and W. Steudel, *alpha-smooth-muscle actin and microvascular precursor smooth-muscle cells in pulmonary hypertension*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **20**(4): p. 582-94.
151. Owens, G.K., P.S. Rabinovitch, and S.M. Schwartz, *Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(12): p. 7759-63.
152. Bierer, R., et al., *NFATc3 is required for chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in adult and neonatal mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. **301**(6): p. L872-80.
153. de Frutos, S., et al., *Endothelin-1 contributes to increased NFATc3 activation by chronic hypoxia in pulmonary arteries*. Am J Physiol Cell Physiol, 2011. **301**(2): p. C441-50.
154. Bonnet, S., et al., *The nuclear factor of activated T cells in pulmonary arterial hypertension can be therapeutically targeted*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(27): p. 11418-23.
155. Yaghi, A. and S.M. Sims, *Constrictor-induced translocation of NFAT3 in human and rat pulmonary artery smooth muscle*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005. **289**(6): p. L1061-74.
156. Estep, J.E., et al., *[14C]monocrotaline kinetics and metabolism in the rat*. Drug Metab Dispos, 1991. **19**(1): p. 135-9.
157. Campian, M.E., et al., *How valid are animal models to evaluate treatments for pulmonary hypertension? Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2006. **373**(6): p. 391-400.
158. Wang, H.L., et al., *5-HT1B receptor augmented 5-HT vasoconstrictor response of pulmonary artery in monocrotaline-induced pulmonary hypertensive rats*. Acta Pharmacol Sin, 2001. **22**(3): p. 269-73.
159. Naeije, R. and L. Dewachter, *[Animal models of pulmonary arterial hypertension]*. Rev Mal Respir, 2007. **24**(4 Pt 1): p. 481-96.
160. Li, L., et al., *Inhibition of nuclear factor-kappaB in the lungs prevents monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice*. Hypertension, 2014. **63**(6): p. 1260-9.
161. Aliotta, J.M., et al., *Induction of pulmonary hypertensive changes by extracellular vesicles from monocrotaline-treated mice*. Cardiovasc Res, 2013. **100**(3): p. 354-62.
162. Hammad, M.A., et al., *Oxidized low-density lipoprotein and tissue factor are involved in monocrotaline/lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity*. Arch Toxicol, 2011. **85**(9): p. 1079-89.
163. Bonnet, S., et al., *Chronic hypoxia-induced spontaneous and rhythmic contractions in the rat main pulmonary artery*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **281**(1): p. L183-92.
164. Bonnet, S., et al., *Role of Ca(2+)-sensitive K(+) channels in the remission phase of pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary diseases*. Cardiovasc Res, 2003. **60**(2): p. 326-36.

165. Pauvert, O., et al., *Sildenafil alters calcium signaling and vascular tone in pulmonary arteries from chronically hypoxic rats*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004. **287**(3): p. L577-83.
166. Bonnet, S., et al., *Effect of chronic hypoxia on agonist-induced tone and calcium signaling in rat pulmonary artery*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **281**(1): p. L193-201.
167. Eddahibi, S., et al., *Induction of serotonin transporter by hypoxia in pulmonary vascular smooth muscle cells. Relationship with the mitogenic action of serotonin*. *Circ Res*, 1999. **84**(3): p. 329-36.
168. Sebkhi, A., et al., *Phosphodiesterase type 5 as a target for the treatment of hypoxia-induced pulmonary hypertension*. *Circulation*, 2003. **107**(25): p. 3230-5.
169. Weir, E.K. and A. Olschewski, *Role of ion channels in acute and chronic responses of the pulmonary vasculature to hypoxia*. *Cardiovasc Res*, 2006. **71**(4): p. 630-41.
170. Wang, Z., et al., *Progressive right ventricular functional and structural changes in a mouse model of pulmonary arterial hypertension*. *Physiol Rep*, 2013. **1**(7): p. e00184.
171. Gomez-Arroyo, J., et al., *A brief overview of mouse models of pulmonary arterial hypertension: problems and prospects*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2012. **302**(10): p. L977-91.
172. Mercier, O., et al., *Piglet model of chronic pulmonary hypertension*. *Pulm Circ*, 2013. **3**(4): p. 908-15.
173. Humbert, M., O. Sitbon, and G. Simonneau, *Treatment of pulmonary arterial hypertension*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(14): p. 1425-36.
174. Montani, D., et al., *[Pulmonary arterial hypertension]*. *Rev Mal Respir*, 2005. **22**(4): p. 651-66.
175. Ciuculan, L., et al., *Imatinib attenuates hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension pathology via reduction in 5-hydroxytryptamine through inhibition of tryptophan hydroxylase 1 expression*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2013. **187**(1): p. 78-89.
176. Olschewski, A., et al., *Ion channels and transporters as therapeutic targets in the pulmonary circulation*. *Pharmacol Ther*, 2014. **144**(3): p. 349-68.
177. Guibert, C., R. Marthan, and J.P. Savineau, *Modulation of ion channels in pulmonary arterial hypertension*. *Curr Pharm Des*, 2007. **13**(24): p. 2443-55.
178. Sun, H., et al., *Chronic hypoxia-induced upregulation of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel in pulmonary arterial myocytes: a mechanism contributing to enhanced vasoreactivity*. *J Physiol*, 2012. **590**(Pt 15): p. 3507-21.
179. Forrest, A.S., et al., *Increased TMEM16A-encoded calcium-activated chloride channel activity is associated with pulmonary hypertension*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2012. **303**(12): p. C1229-43.
180. Guibert, C., R. Marthan, and J.P. Savineau, *Oscillatory Cl⁻ current induced by angiotensin II in rat pulmonary arterial myocytes: Ca²⁺ dependence and physiological implication*. *Cell Calcium*, 1997. **21**(6): p. 421-9.
181. Wan, J., et al., *Chronic hypoxia selectively enhances L- and T-type voltage-dependent Ca²⁺ channel activity in pulmonary artery by upregulating Cav1.2 and Cav3.2*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2013. **305**(2): p. L154-64.
182. Rodman, D.M., et al., *The low-voltage-activated calcium channel CAV3.1 controls proliferation of human pulmonary artery myocytes*. *Chest*, 2005. **128**(6 Suppl): p. 581S-582S.
183. Pluteanu, F. and L.L. Cribbs, *Regulation and function of Cav3.1 T-type calcium channels in IGF-I-stimulated pulmonary artery smooth muscle cells*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011. **300**(3): p. C517-25.
184. Rich, S. and B.H. Brundage, *High-dose calcium channel-blocking therapy for primary pulmonary hypertension: evidence for long-term reduction in pulmonary arterial pressure and regression of right ventricular hypertrophy*. *Circulation*, 1987. **76**(1): p. 135-41.
185. Rich, S., E. Kaufmann, and P.S. Levy, *The effect of high doses of calcium-channel blockers on survival in primary pulmonary hypertension*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(2): p. 76-81.
186. Bowman, C.L., et al., *Mechanosensitive ion channels and the peptide inhibitor GsMTx-4: history, properties, mechanisms and pharmacology*. *Toxicon*, 2007. **49**(2): p. 249-70.

187. Piao, L., W.K. Ho, and Y.E. Earm, *Actin filaments regulate the stretch sensitivity of large-conductance, Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary artery smooth muscle cells*. Pflugers Arch, 2003. **446**(5): p. 523-8.
188. Spassova, M.A., et al., *A common mechanism underlies stretch activation and receptor activation of TRPC6 channels*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16586-91.
189. Wan, X., P. Juranka, and C.E. Morris, *Activation of mechanosensitive currents in traumatized membrane*. Am J Physiol, 1999. **276**(2 Pt 1): p. C318-27.
190. Wilson, E., K. Sudhir, and H.E. Ives, *Mechanical strain of rat vascular smooth muscle cells is sensed by specific extracellular matrix/integrin interactions*. J Clin Invest, 1995. **96**(5): p. 2364-72.
191. Guibert, C., T. Ducret, and J.P. Savineau, *Voltage-independent calcium influx in smooth muscle*. Prog Biophys Mol Biol, 2008. **98**(1): p. 10-23.
192. Coste, B., et al., *Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels*. Science, 2010. **330**(6000): p. 55-60.
193. Volkers, L., Y. Mechoukhi, and B. Coste, *Piezo channels: from structure to function*. Pflugers Arch, 2015. **467**(1): p. 95-9.
194. Coste, B., et al., *Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels*. Nature, 2012. **483**(7388): p. 176-81.
195. Plant, T.D., *TRPs in mechanosensing and volume regulation*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **223**: p. 743-66.
196. Cosens, D.J. and A. Manning, *Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant*. Nature, 1969. **224**(5216): p. 285-7.
197. Christensen, A.P. and D.P. Corey, *TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation?* Nat Rev Neurosci, 2007. **8**(7): p. 510-21.
198. Ramsey, I.S., M. Delling, and D.E. Clapham, *An introduction to TRP channels*. Annu Rev Physiol, 2006. **68**: p. 619-47.
199. Flockerzi, V., *An introduction on TRP channels*. Handb Exp Pharmacol, 2007(179): p. 1-19.
200. Pedersen, S.F., G. Owsianik, and B. Nilius, *TRP channels: an overview*. Cell Calcium, 2005. **38**(3-4): p. 233-52.
201. Mio, K., et al., *The TRPC3 channel has a large internal chamber surrounded by signal sensing antennas*. J Mol Biol, 2007. **367**(2): p. 373-83.
202. Barrera, N.P., et al., *AFM imaging reveals the tetrameric structure of the TRPC1 channel*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **358**(4): p. 1086-90.
203. Venkatachalam, K. and C. Montell, *TRP channels*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 387-417.
204. Huang, C.L., *The transient receptor potential superfamily of ion channels*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(7): p. 1690-9.
205. Firth, A.L., C.V. Remillard, and J.X. Yuan, *TRP channels in hypertension*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1772**(8): p. 895-906.
206. Pedersen, S.F. and B. Nilius, *Transient receptor potential channels in mechanosensing and cell volume regulation*. Methods Enzymol, 2007. **428**: p. 183-207.
207. Guibert, C., T. Ducret, and J.P. Savineau, *Expression and physiological roles of TRP channels in smooth muscle cells*. Adv Exp Med Biol, 2011. **704**: p. 687-706.
208. Zhu, Z., et al., *TRP channels and their implications in metabolic diseases*. Pflugers Arch, 2011. **461**(2): p. 211-23.
209. Drew, L.J., J.N. Wood, and P. Cesare, *Distinct mechanosensitive properties of capsaicin-sensitive and -insensitive sensory neurons*. J Neurosci, 2002. **22**(12): p. RC228.
210. Muraki, K., et al., *TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes*. Circ Res, 2003. **93**(9): p. 829-38.
211. Maroto, R., et al., *TRPC1 forms the stretch-activated cation channel in vertebrate cells*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(2): p. 179-85.
212. Kuipers, A.J., J. Middelbeek, and F.N. van Leeuwen, *Mechanoregulation of cytoskeletal dynamics by TRP channels*. Eur J Cell Biol, 2012. **91**(11-12): p. 834-46.
213. Eijkelkamp, N., K. Quick, and J.N. Wood, *Transient receptor potential channels and mechanosensation*. Annu Rev Neurosci, 2013. **36**: p. 519-46.

214. Sharif-Naeini, R., et al., *TRP channels and mechanosensory transduction: insights into the arterial myogenic response*. Pflugers Arch, 2008. **456**(3): p. 529-40.
215. Shen, B., et al., *Plasma membrane mechanical stress activates TRPC5 channels*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122227.
216. Osol, G., I. Laher, and M. Kelley, *Myogenic tone is coupled to phospholipase C and G protein activation in small cerebral arteries*. Am J Physiol, 1993. **265**(1 Pt 2): p. H415-20.
217. Inoue, R., Z. Jian, and Y. Kawarabayashi, *Mechanosensitive TRP channels in cardiovascular pathophysiology*. Pharmacol Ther, 2009. **123**(3): p. 371-85.
218. Patel, A., et al., *Canonical TRP channels and mechanotransduction: from physiology to disease states*. Pflugers Arch, 2010. **460**(3): p. 571-81.
219. Numata, T., T. Shimizu, and Y. Okada, *TRPM7 is a stretch- and swelling-activated cation channel involved in volume regulation in human epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2007. **292**(1): p. C460-7.
220. Du, J., et al., *TRPV4, TRPC1, and TRPP2 assemble to form a flow-sensitive heteromeric channel*. FASEB J, 2014. **28**(11): p. 4677-85.
221. Becker, D., J. Bereiter-Hahn, and M. Jendrach, *Functional interaction of the cation channel transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) and actin in volume regulation*. Eur J Cell Biol, 2009. **88**(3): p. 141-52.
222. Ramadass, R., et al., *Spectrally and spatially resolved fluorescence lifetime imaging in living cells: TRPV4-microfilament interactions*. Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(1): p. 27-36.
223. Goswami, C., et al., *Importance of non-selective cation channel TRPV4 interaction with cytoskeleton and their reciprocal regulations in cultured cells*. PLoS One, 2010. **5**(7): p. e11654.
224. Shin, S.H., et al., *Phosphorylation on the Ser 824 residue of TRPV4 prefers to bind with F-actin than with microtubules to expand the cell surface area*. Cell Signal, 2012. **24**(3): p. 641-51.
225. Goswami, C., et al., *Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin*. J Neurochem, 2004. **91**(5): p. 1092-103.
226. Sardar, P., et al., *Conservation of tubulin-binding sequences in TRPV1 throughout evolution*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e31448.
227. Goswami, C. and T. Hucho, *Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton*. FEBS J, 2008. **275**(19): p. 4684-99.
228. Tang, Y., et al., *Association of mammalian trp4 and phospholipase C isozymes with a PDZ domain-containing protein, NHERF*. J Biol Chem, 2000. **275**(48): p. 37559-64.
229. Li, Q., et al., *Alpha-actinin associates with polycystin-2 and regulates its channel activity*. Hum Mol Genet, 2005. **14**(12): p. 1587-603.
230. Li, Q., et al., *Direct binding of alpha-actinin enhances TRPP3 channel activity*. J Neurochem, 2007. **103**(6): p. 2391-400.
231. Vandebrouck, A., et al., *Regulation of capacitative calcium entries by alpha1-syntrophin: association of TRPC1 with dystrophin complex and the PDZ domain of alpha1-syntrophin*. FASEB J, 2007. **21**(2): p. 608-17.
232. Cioffi, D.L., et al., *Activation of the endothelial store-operated ISOC Ca²⁺ channel requires interaction of protein 4.1 with TRPC4*. Circ Res, 2005. **97**(11): p. 1164-72.
233. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
234. House, S.J., et al., *The non-excitabile smooth muscle: calcium signaling and phenotypic switching during vascular disease*. Pflugers Arch, 2008. **456**(5): p. 769-85.
235. Moore, T.M., et al., *Store-operated calcium entry promotes shape change in pulmonary endothelial cells expressing Trp1*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. L574-82.
236. Han, P., et al., *Capsaicin causes protein synthesis inhibition and microtubule disassembly through TRPV1 activities both on the plasma membrane and intracellular membranes*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(10): p. 1635-45.
237. Waning, J., et al., *A novel function of capsaicin-sensitive TRPV1 channels: involvement in cell migration*. Cell Calcium, 2007. **42**(1): p. 17-25.

238. Lockwich, T., et al., *Stabilization of cortical actin induces internalization of transient receptor potential 3 (Trp3)-associated caveolar Ca²⁺ signaling complex and loss of Ca²⁺ influx without disruption of Trp3-inositol trisphosphate receptor association.* J Biol Chem, 2001. **276**(45): p. 42401-8.
239. Itagaki, K., et al., *Cytoskeletal reorganization internalizes multiple transient receptor potential channels and blocks calcium entry into human neutrophils.* J Immunol, 2004. **172**(1): p. 601-7.
240. Redondo, P.C., et al., *Dual role of tubulin-cytoskeleton in store-operated calcium entry in human platelets.* Cell Signal, 2007. **19**(10): p. 2147-54.
241. Galan, C., et al., *The cytoskeleton plays a modulatory role in the association between STIM1 and the Ca²⁺ channel subunits Orai1 and TRPC1.* Biochem Pharmacol, 2011. **82**(4): p. 400-10.
242. Goldenberg, N.M., et al., *TRPV4 Is Required for Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction.* Anesthesiology, 2015. **122**(6): p. 1338-48.
243. Wang, J., L.A. Shimoda, and J.T. Sylvester, *Capacitative calcium entry and TRPC channel proteins are expressed in rat distal pulmonary arterial smooth muscle.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(4): p. L848-58.
244. Yu, Y., et al., *PDGF stimulates pulmonary vascular smooth muscle cell proliferation by upregulating TRPC6 expression.* Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(2): p. C316-30.
245. Lin, M.J., et al., *Chronic hypoxia-induced upregulation of store-operated and receptor-operated Ca²⁺ channels in pulmonary arterial smooth muscle cells: a novel mechanism of hypoxic pulmonary hypertension.* Circ Res, 2004. **95**(5): p. 496-505.
246. Yu, Y., et al., *Enhanced expression of transient receptor potential channels in idiopathic pulmonary arterial hypertension.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(38): p. 13861-6.
247. Yu, Y., et al., *A functional single-nucleotide polymorphism in the TRPC6 gene promoter associated with idiopathic pulmonary arterial hypertension.* Circulation, 2009. **119**(17): p. 2313-22.
248. Yang, X.R., et al., *Functional expression of transient receptor potential melastatin- and vanilloid-related channels in pulmonary arterial and aortic smooth muscle.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2006. **290**(6): p. L1267-76.
249. Wang, Y.X., et al., *Functional expression of transient receptor potential vanilloid-related channels in chronically hypoxic human pulmonary arterial smooth muscle cells.* J Membr Biol, 2008. **223**(3): p. 151-9.
250. Yang, X.R., et al., *Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012. **302**(6): p. L555-68.
251. Peng, G., et al., *Expression of store-operated Ca²⁺ entry and transient receptor potential canonical and vanilloid-related proteins in rat distal pulmonary venous smooth muscle.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2010. **299**(5): p. L621-30.
252. Liu, X.R., et al., *Down-regulation of TRPM8 in pulmonary arteries of pulmonary hypertensive rats.* Cell Physiol Biochem, 2013. **31**(6): p. 892-904.
253. Kunichika, N., et al., *Overexpression of TRPC1 enhances pulmonary vasoconstriction induced by capacitative Ca²⁺ entry.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(5): p. L962-9.
254. Weissmann, N., et al., *Classical transient receptor potential channel 6 (TRPC6) is essential for hypoxic pulmonary vasoconstriction and alveolar gas exchange.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(50): p. 19093-8.
255. Sweeney, M., et al., *Inhibition of endogenous TRP1 decreases capacitative Ca²⁺ entry and attenuates pulmonary artery smooth muscle cell proliferation.* Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2002. **283**(1): p. L144-55.
256. Fernandez, R.A., et al., *Upregulated expression of STIM2, TRPC6, and Orai2 contributes to the transition of pulmonary arterial smooth muscle cells from a contractile to proliferative phenotype.* Am J Physiol Cell Physiol, 2015. **308**(8): p. C581-93.
257. Xia, Y., et al., *Classical transient receptor potential 1 and 6 contribute to hypoxic pulmonary hypertension through differential regulation of pulmonary vascular functions.* Hypertension, 2014. **63**(1): p. 173-80.

258. Malczyk, M., et al., *Classical transient receptor potential channel 1 in hypoxia-induced pulmonary hypertension*. Am J Respir Crit Care Med, 2013. **188**(12): p. 1451-9.
259. He, Y., et al., *Transient receptor potential melastatin 7 ion channels regulate magnesium homeostasis in vascular smooth muscle cells: role of angiotensin II*. Circ Res, 2005. **96**(2): p. 207-15.
260. Caterina, M.J., et al., *Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor*. Science, 2000. **288**(5464): p. 306-13.
261. Davis, J.B., et al., *Vanilloid receptor-1 is essential for inflammatory thermal hyperalgesia*. Nature, 2000. **405**(6783): p. 183-7.
262. Fernandes, E.S., M.A. Fernandes, and J.E. Keeble, *The functions of TRPA1 and TRPV1: moving away from sensory nerves*. Br J Pharmacol, 2012. **166**(2): p. 510-21.
263. Caterina, M.J., et al., *The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway*. Nature, 1997. **389**(6653): p. 816-24.
264. Liao, M., et al., *Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy*. Nature, 2013. **504**(7478): p. 107-12.
265. Smith, G.D., et al., *TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 186-90.
266. Sadofsky, L.R., et al., *Unique Responses are Observed in Transient Receptor Potential Ankyrin 1 and Vanilloid 1 (TRPA1 and TRPV1) Co-Expressing Cells*. Cells, 2014. **3**(2): p. 616-26.
267. Tominaga, M. and T. Tominaga, *Structure and function of TRPV1*. Pflugers Arch, 2005. **451**(1): p. 143-50.
268. Phelps, C.B., et al., *Insights into the roles of conserved and divergent residues in the ankyrin repeats of TRPV ion channels*. Channels (Austin), 2007. **1**(3): p. 148-51.
269. Moiseenkova-Bell, V.Y., et al., *Structure of TRPV1 channel revealed by electron cryomicroscopy*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(21): p. 7451-5.
270. Bevan, S., T. Quallo, and D.A. Andersson, *Trpv1*. Handb Exp Pharmacol, 2014. **222**: p. 207-45.
271. Wen, H., et al., *20-Hydroxyeicosatetraenoic acid (20-HETE) is a novel activator of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) channel*. J Biol Chem, 2012. **287**(17): p. 13868-76.
272. Voets, T., et al., *The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels*. Nature, 2004. **430**(7001): p. 748-54.
273. Scotland, R.S., et al., *Vanilloid receptor TRPV1, sensory C-fibers, and vascular autoregulation: a novel mechanism involved in myogenic constriction*. Circ Res, 2004. **95**(10): p. 1027-34.
274. Ahern, G.P., et al., *Extracellular cations sensitize and gate capsaicin receptor TRPV1 modulating pain signaling*. J Neurosci, 2005. **25**(21): p. 5109-16.
275. Planells-Cases, R. and A. Ferrer-Montiel, *TRP Channel Trafficking*, in *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W.B. Liedtke and S. Heller, Editors. 2007: Boca Raton (FL).
276. Ristoiu, V., et al., *Hypoxia-induced sensitization of transient receptor potential vanilloid 1 involves activation of hypoxia-inducible factor-1 alpha and PKC*. Pain, 2011. **152**(4): p. 936-45.
277. Schaible, H.G., et al., *The role of proinflammatory cytokines in the generation and maintenance of joint pain*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1193**: p. 60-9.
278. Yang, X.R., et al., *Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **302**(6): p. L555-68.
279. Kim, K.S., et al., *Differential effects of acute hypoxia on the activation of TRPV1 by capsaicin and acidic pH*. J Physiol Sci, 2012. **62**(2): p. 93-103.
280. Liedtke, W., et al., *Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor*. Cell, 2000. **103**(3): p. 525-35.
281. Shigematsu, H., et al., *A 3.5-nm structure of rat TRPV4 cation channel revealed by Zernike phase-contrast cryoelectron microscopy*. J Biol Chem, 2010. **285**(15): p. 11210-8.
282. Everaerts, W., B. Nilius, and G. Owsianik, *The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: from structure to disease*. Prog Biophys Mol Biol, 2010. **103**(1): p. 2-17.
283. Sedgwick, S.G. and S.J. Smerdon, *The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(8): p. 311-6.

284. Gaudet, R., *A primer on ankyrin repeat function in TRP channels and beyond*. Mol Biosyst, 2008. **4**(5): p. 372-9.
285. Arniges, M., et al., *Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking*. J Biol Chem, 2006. **281**(3): p. 1580-6.
286. Garcia-Elias, A., et al., *IP3 receptor binds to and sensitizes TRPV4 channel to osmotic stimuli via a calmodulin-binding site*. J Biol Chem, 2008. **283**(46): p. 31284-8.
287. Voets, T., et al., *Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33704-10.
288. Nilius, B., H. Watanabe, and J. Vriens, *The TRPV4 channel: structure-function relationship and promiscuous gating behaviour*. Pflugers Arch, 2003. **446**(3): p. 298-303.
289. Strotmann, R., et al., *OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(10): p. 695-702.
290. Plant, T.D. and R. Strotmann, *TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation*, in *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades*, W.B. Liedtke and S. Heller, Editors. 2007: Boca Raton (FL).
291. Gao, X., L. Wu, and R.G. O'Neil, *Temperature-modulated diversity of TRPV4 channel gating: activation by physical stresses and phorbol ester derivatives through protein kinase C-dependent and -independent pathways*. J Biol Chem, 2003. **278**(29): p. 27129-37.
292. Pokreisz, P., et al., *Cytochrome P450 epoxygenase gene function in hypoxic pulmonary vasoconstriction and pulmonary vascular remodeling*. Hypertension, 2006. **47**(4): p. 762-70.
293. Watanabe, H., et al., *Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels*. Nature, 2003. **424**(6947): p. 434-8.
294. Watanabe, H., et al., *Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca²⁺*. Cell Calcium, 2003. **33**(5-6): p. 489-95.
295. Grace, M.S., et al., *Transient receptor potential (TRP) channels in the airway: role in airway disease*. Br J Pharmacol, 2014. **171**(10): p. 2593-607.
296. Xia, Y., et al., *TRPV4 channel contributes to serotonin-induced pulmonary vasoconstriction and the enhanced vascular reactivity in chronic hypoxic pulmonary hypertension*. Am J Physiol Cell Physiol, 2013. **305**(7): p. C704-15.
297. Ducret, T., et al., *Serotonin-induced activation of TRPV4-like current in rat intrapulmonary arterial smooth muscle cells*. Cell Calcium, 2008. **43**(4): p. 315-23.
298. Butenko, O., et al., *The increased activity of TRPV4 channel in the astrocytes of the adult rat hippocampus after cerebral hypoxia/ischemia*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39959.
299. Gilbert, G., et al., *Stretch-induced Ca²⁺ signalling in vascular smooth muscle cells depends on Ca²⁺ store segregation*. Cardiovasc Res, 2014. **103**(2): p. 313-23.
300. Bonnet, S., et al., *Reversal of chronic hypoxia-induced alterations in pulmonary artery smooth muscle electromechanical coupling upon air breathing*. Cardiovasc Res, 2002. **53**(4): p. 1019-28.
301. Liedtke, W. and J.M. Friedman, *Abnormal osmotic regulation in trpv4^{-/-} mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(23): p. 13698-703.
302. Huang, C., et al., *Biological effects of cellular stretch on human dermal fibroblasts*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2013. **66**(12): p. e351-61.
303. Grynkiewicz, G., M. Poenie, and R.Y. Tsien, *A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties*. J Biol Chem, 1985. **260**(6): p. 3440-50.
304. Hamill, O.P., et al., *Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches*. Pflugers Arch, 1981. **391**(2): p. 85-100.
305. Hamill, O.P., *Twenty odd years of stretch-sensitive channels*. Pflugers Arch, 2006. **453**(3): p. 333-51.
306. Thodeti, C.K., et al., *TRPV4 channels mediate cyclic strain-induced endothelial cell reorientation through integrin-to-integrin signaling*. Circ Res, 2009. **104**(9): p. 1123-30.
307. Gerdes, J., et al., *Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation*. Int J Cancer, 1983. **31**(1): p. 13-20.
308. Wang, C., et al., *Inhibition of SOC/Ca²⁺/NFAT pathway is involved in the anti-proliferative effect of sildenafil on pulmonary artery smooth muscle cells*. Respir Res, 2009. **10**: p. 123.

309. Keseru, B., et al., *Epoxyeicosatrienoic acids and the soluble epoxide hydrolase are determinants of pulmonary artery pressure and the acute hypoxic pulmonary vasoconstrictor response*. FASEB J, 2008. **22**(12): p. 4306-15.
310. Kanzaki, M., et al., *Translocation of a calcium-permeable cation channel induced by insulin-like growth factor-I*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 165-70.
311. Parpaite, T., et al., *Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells*. Pflugers Arch, 2015.
312. Bierer, R., et al., *NFATc3 is required for chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in adult and neonatal mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2011. **301**(6): p. L872-80.
313. Masuyama, R., et al., *TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts*. Cell Metab, 2008. **8**(3): p. 257-65.
314. Masuyama, R., et al., *Calcium/calmodulin-signaling supports TRPV4 activation in osteoclasts and regulates bone mass*. J Bone Miner Res. **27**(8): p. 1708-21.
315. Dick, A.S., et al., *Cyclic stretch stimulates nitric oxide synthase-1-dependent peroxynitrite formation by neonatal rat pulmonary artery smooth muscle*. Free Radic Biol Med, 2013. **61**: p. 310-9.
316. Hipper, A. and G. Isenberg, *Cyclic mechanical strain decreases the DNA synthesis of vascular smooth muscle cells*. Pflugers Arch, 2000. **440**(1): p. 19-27.
317. Nagasawa, M. and I. Kojima, *Translocation of TRPV2 channel induced by focal administration of mechanical stress*. Physiol Rep, 2015. **3**(2).
318. Fiorio Pla, A., et al., *TRPV4 mediates tumor-derived endothelial cell migration via arachidonic acid-activated actin remodeling*. Oncogene, 2012. **31**(2): p. 200-12.
319. Chen, C.S., et al., *Geometric control of cell life and death*. Science, 1997. **276**(5317): p. 1425-8.
320. Matsumoto, T., et al., *Mechanical strain regulates endothelial cell patterning in vitro*. Tissue Eng, 2007. **13**(1): p. 207-17.
321. Ingber, D.E. and J. Folkman, *Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix*. J Cell Biol, 1989. **109**(1): p. 317-30.
322. Dike, L.E., et al., *Geometric control of switching between growth, apoptosis, and differentiation during angiogenesis using micropatterned substrates*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(8): p. 441-8.
323. Parsons, J.T., A.R. Horwitz, and M.A. Schwartz, *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(9): p. 633-43.
324. Smilenov, L.B., et al., *Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts*. Science, 1999. **286**(5442): p. 1172-4.
325. Wei, C., et al., *Calcium gradients underlying cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2012. **24**(2): p. 254-61.
326. Yang, S. and X.Y. Huang, *Ca²⁺ influx through L-type Ca²⁺ channels controls the trailing tail contraction in growth factor-induced fibroblast cell migration*. J Biol Chem, 2005. **280**(29): p. 27130-7.
327. Prevarskaya, N., R. Skryma, and Y. Shuba, *Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(8): p. 609-18.
328. Schwab, A., et al., *Role of ion channels and transporters in cell migration*. Physiol Rev, 2012. **92**(4): p. 1865-913.
329. Fabian, A., et al., *TRPC1 channels regulate directionality of migrating cells*. Pflugers Arch, 2008. **457**(2): p. 475-84.
330. Wei, C., et al., *Calcium flickers steer cell migration*. Nature, 2009. **457**(7231): p. 901-5.
331. Monet, M., et al., *Lysophospholipids stimulate prostate cancer cell migration via TRPV2 channel activation*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1793**(3): p. 528-39.
332. Suzuki, M., A. Hirao, and A. Mizuno, *Microtubule-associated [corrected] protein 7 increases the membrane expression of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)*. J Biol Chem, 2003. **278**(51): p. 51448-53.

333. Mrkonjic, S., et al., *TRPV4 participates in the establishment of trailing adhesions and directional persistence of migrating cells*. Pflugers Arch, 2015. **467**(10): p. 2107-19.
334. Su, L.T., et al., *TRPM7 regulates cell adhesion by controlling the calcium-dependent protease calpain*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 11260-70.
335. Naruse, K., T. Yamada, and M. Sokabe, *Involvement of SA channels in orienting response of cultured endothelial cells to cyclic stretch*. Am J Physiol, 1998. **274**(5 Pt 2): p. H1532-8.
336. Yang, M., et al., *Inhibition of TRPM7 Attenuates Rat Aortic Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Angiotensin II: Role of Genistein*. J Cardiovasc Pharmacol, 2015. **66**(1): p. 16-24.
337. Mochizuki, T., et al., *The TRPV4 cation channel mediates stretch-evoked Ca²⁺ influx and ATP release in primary urothelial cell cultures*. J Biol Chem, 2009. **284**(32): p. 21257-64.
338. Rath, G., et al., *Vascular hypoxic preconditioning relies on TRPV4-dependent calcium influx and proper intercellular gap junctions communication*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2012. **32**(9): p. 2241-9.
339. Vriens, J., G. Appendino, and B. Nilius, *Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels*. Mol Pharmacol, 2009. **75**(6): p. 1262-79.
340. Guibert, C., R. Marthan, and J.P. Savineau, *5-HT induces an arachidonic acid-sensitive calcium influx in rat small intrapulmonary artery*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **286**(6): p. L1228-36.
341. Goswami, C., et al., *Rapid disassembly of dynamic microtubules upon activation of the capsaicin receptor TRPV1*. J Neurochem, 2006. **96**(1): p. 254-66.
342. Zhao, L., et al., *Calcineurin/nuclear factor of activated T cells-coupled vanilloid transient receptor potential channel 4 ca²⁺ sparklets stimulate airway smooth muscle cell proliferation*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2014. **50**(6): p. 1064-75.
343. Billaud, M., et al., *Pannexin1 regulates alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction*. Circ Res, 2011. **109**(1): p. 80-5.
344. Paddenberg, R., et al., *Videomorphometric analysis of hypoxic pulmonary vasoconstriction of intra-pulmonary arteries using murine precision cut lung slices*. J Vis Exp, 2014(83): p. e50970.
345. Alvarez, D.F., et al., *Transient receptor potential vanilloid 4-mediated disruption of the alveolar septal barrier: a novel mechanism of acute lung injury*. Circ Res, 2006. **99**(9): p. 988-95.
346. Kerem, A., et al., *Lung endothelial dysfunction in congestive heart failure: role of impaired Ca²⁺ signaling and cytoskeletal reorganization*. Circ Res, 2010. **106**(6): p. 1103-16.
347. Zhang, D.X. and D.D. Gutterman, *Transient receptor potential channel activation and endothelium-dependent dilation in the systemic circulation*. J Cardiovasc Pharmacol, 2011. **57**(2): p. 133-9.
348. Jia, Y., et al., *Functional TRPV4 channels are expressed in human airway smooth muscle cells*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2004. **287**(2): p. L272-8.
349. Everaerts, W., et al., *Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(44): p. 19084-9.

ANNEXES

LISTE DES PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Travaux de thèse

Publication

- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, P. Robillard, J-F. Quignard, R. Marthan, J.P. Savineau, T. Ducret. *Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells*. [Pflügers Archiv. 2015 ; Epub ahead of print.](#)

Communications orales

- **T. Parpaite**, A. Courtois, J.F. Quignard, Philippe Gailly, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Mechanical stress and TRPV4 channels: influence of cellular environment during pulmonary hypertension establishment*. 26^{ème} colloque des canaux ioniques, septembre 2015, (Sète, France).
- **T. Parpaite**, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Mechanical stress and TRPV4 channels: Influence of cellular environment on pulmonary arterial smooth muscle cells*. Journée de la Structure Fédérative de Recherche TecSan, juin 2015, (Pessac, France)
- **T. Parpaite**, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Hypoxia, mechanical stress and TRPV4 channels: “ménage à trois” in pulmonary arterial smooth muscle cell*. Journée de l'école doctorale de Bordeaux, avril 2015, (Arcachon, France)
- **T. Parpaite**, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Mechanical stress and TRPV4 channels: influence of cellular environment on pulmonary arterial smooth muscle cells*. École franco-allemande de pneumologie, mars 2015, (Tegernsee, Allemagne)
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, J-P. Savineau, R. Marthan, T. Ducret. *Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in intrapulmonary arteries*. Journée de la Structure Fédérative de Recherche TecSan, juin 2014, (Pessac, France). (**Prix meilleure communication orale**)
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, J-P. Savineau, R. Marthan, T. Ducret. *Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in intrapulmonary arteries*. Journées de Recherche Respiratoire, octobre 2013, (Montpellier, France).

- **T. Parpaite**, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Influence of cellular environment on pulmonary arterial smooth muscle cells*. Congrès du Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire (GRRC), mars 2015, (Toulouse, France)
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, E. Delbrel, J. Gillibert-Duplantier, P. Robillard, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Influence of cellular environment on pulmonary arterial smooth muscle cells*. Journées de Recherche Respiratoire (J2R), octobre 2014, (Bordeaux, France).
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, E. Delbrel, J. Gillibert-Duplantier, P. Robillard, J.F. Quignard, A. Courtois, R. Marthan, J-P. Savineau, T. Ducret. *Influence of cellular environment on pulmonary arterial smooth muscle cells*. 25^{ème} colloque des canaux ioniques, septembre 2014, (île d'Oléron, France).
- Hontans N., **Parpaite T.**, Ducret T., Quignard J.F., Baudrimont I., Mornet S., Marthan R., Muller B., Savineau J.P., Courtois A. *Implication of Transient Receptor Potential Vanilloid-1 and - 4 channels in intracellular calcium signaling triggered by engineered nanoparticles*. 25^{ème} colloque des canaux ioniques, septembre 2014, (île d'Oléron, France).
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, J-P. Savineau, R. Marthan, T. Ducret. *Rôle de l'hypoxie sur les canaux TRPV1 and TRPV4 dans les artères intrapulmonaires*. Journées de la SFR Transbiomed, novembre 2013, (Pessac, France).
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, J-P. Savineau, R. Marthan, T. Ducret. *Rôle de l'hypoxie sur les canaux TRPV1 and TRPV4 dans les artères intrapulmonaires*. Journées de Recherche Respiratoire, octobre 2013, (Montpellier, France).
- **T. Parpaite**, G. Cardouat, M. Mauroux, J. Gillibert-Duplantier, J-P. Savineau, R. Marthan, T. Ducret. *Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in intrapulmonary arteries*. 24^{ème} colloque des canaux ioniques, septembre 2013, (île d'Oléron, France).

Travaux de Master 2

Ces travaux ont été réalisés dans le laboratoire de **Brant E. Isakson** au Robert M. Berne Cardiovascular Research Center à **Charlottesville, VA, aux États-Unis**.

Publications :

- Billaud M., Chiu YH., Lohman AW., **Parpaite T.**, Butcher JT., Mutchler SM., DeLalio L., Artamonov MV., Sandilos JK., Best AK., Somlyo AV., Thompson RJ., Le TH., Ravichandran KS., Bayliss DA., Isakson BE. *A molecular signature in the Pannexin 1 intracellular loop confers channel activation by the $\alpha 1$ adrenoreceptor in smooth muscle cells.* [Sci Signal. 2015 Feb 17;8\(364\).](#)
- Billaud M., Lohman AW., Straub AC., **Parpaite T.**, Johnstone SR., Isakson BE. *Characterization of the thoracodorsal artery: morphology and reactivity.* [Microcirculation. 2012;19\(4\):360-72.](#)

Communications affichées sous forme de poster

- Billaud M., **Parpaite T.**, Lohman AW., Chiu YH., Sandilos JK., Bayliss DA., Isakson BE. *Interaction between $\alpha 1D$ -adrenergic receptor and pannexin 1 can mediate vasoconstriction.* Joint Meeting of the British Microcirculation Society and the Microcirculatory Society 2012, (Oxford, UK).

ACTIVITÉS D'ENSEIGNEMENT

Au cours de ma thèse j'ai exercé la fonction de **moniteur à l'UFR des Sciences de la Vie et de la Santé à l'Université de Bordeaux** (2012-2015). J'ai réalisé un service de **64 heures équivalent TD/an**.

- Réalisation de travaux pratiques pour des étudiants de Licence 3^{ème} année et de Master 1^{ère} année.
- Réalisation de Travaux Dirigés pour des étudiants de Licence 2^{ème} année.

Au cours de ma Licence, j'ai été **responsable tutorat du Plan Réussir en Licence** (2009-2010).

- Organisation du planning des séances de tutorat pour les tuteurs et les étudiants.
- Réalisation de séances de tutorat pour des étudiants de 1^{ère} année de Licence.

Rôle de l'environnement cellulaire sur les canaux sensibles à l'étirement dans l'hypertension pulmonaire

Résumé : Au niveau de la circulation pulmonaire, une exposition prolongée à l'hypoxie est responsable du phénomène de **vasoconstriction hypoxique pulmonaire (VHP)** qui favorise les échanges gazeux. Lorsque cette VHP se généralise, elle conduit au développement d'une **hypertension pulmonaire de groupe 3 (HTP)**. Cette pathologie se caractérise par un remodelage vasculaire induisant une élévation progressive de la pression artérielle pulmonaire (> 25 mmHg au repos). Ceci conduit à une défaillance cardiaque droite et, à terme, à la mort. La VHP est responsable de l'étirement de la membrane des cellules musculaires lisses des artères pulmonaires (CMLAP) et peut ainsi activer des "Stretch-Activated Channels" tels que les **TRPV (Transient Receptor Potential Vanilloid)**. Il a précédemment été décrit que les canaux TRPV1 et TRPV4, impliqués dans la migration et la prolifération des cellules vasculaires pulmonaires, sont surexprimés et suractivés lors de l'HTP. Cependant, ces modifications peuvent être dues à un effet direct de l'hypoxie ou indirect, conséquence d'un étirement membranaire plus important induit par la VHP. Nous avons donc étudié la contribution respective des stress hypoxique et mécanique, observés en contexte d'HTP, en utilisant des conditionnements *in vitro* sur des CMLAP d'animaux sains (rats et souris). Nous avons montré que l'hypoxie (1 % O₂, 48 heures) induit une augmentation de la [Ca²⁺]_i couplée à une potentialisation de la migration induite par l'activation de TRPV1 et V4. De même, un étirement cyclique (20 %, 1 Hz, 24 heures) provoque une augmentation de la [Ca²⁺]_i et de la prolifération. Ces résultats montrent pour la première fois une action directe de **l'hypoxie et du stress mécanique (étirement cyclique) sur des CMLAP**.

Mots clés : canaux sensibles à l'étirement ; hypoxie ; stress mécanique ; TRPV

Implication of cellular environment on stretch-activated channels in pulmonary hypertension

Abstract: Hypoxia exposure induces **hypoxic pulmonary vasoconstriction (HPV)** allowing the efficiency of gas exchanges by increasing the intraluminal pressure. Prolonged hypoxia leads to **pulmonary hypertension of group 3 (PH)**, characterized by increased pulmonary pressure (> 25 mmHg), leading to right ventricular heart failure and ultimately death. HPV leads to stretch pulmonary artery smooth muscle cell (PASMC) membranes inside the vascular wall and thus can activate "Stretch-Activated-Channels" such as **TRPV channels (Transient Receptor Potential Vanilloid)**. It has been previously shown that TRPV1 and TRPV4 channels, implicated in PASMC migration and proliferation, are overexpressed and overactivated in PASMC in the context of PH. But whether this feature is directly caused by hypoxia alone or is a consequence of stretch induced by the HPV is a matter of debate. We thus investigated **the respective contribution of hypoxia and mechanical stresses** observed in the context of PH using *in vitro* conditionings on PASMC from healthy animals (rats and mice). We showed that hypoxia (1 % O₂, 48 hours) increases Ca²⁺ entry through TRPV4 channels as well as PASMC migration induced by TRPV1 and TRPV4 activation. Furthermore, cyclic stretch conditioning (20 %, 1 Hz, 24 hours) triggers Ca²⁺ increase and PASMC proliferation. This work shows for the first time the direct implication of both **hypoxia and mechanical stress (cyclic) stretch on PASMC**.

Keywords: hypoxia ; mechanical stress; stretch-activated channels ; TRPV
