



HAL
open science

Effet de l'hypoxie intermittente et de l'entraînement physique intensif sur la structure et la fonction du tissu musculaire chez le rat.

Zeinab El Dirani

► To cite this version:

Zeinab El Dirani. Effet de l'hypoxie intermittente et de l'entraînement physique intensif sur la structure et la fonction du tissu musculaire chez le rat.. Médecine humaine et pathologie. Université Grenoble Alpes; Université Libanaise, 2018. Français. NNT : 2018GREAV067 . tel-02121318

HAL Id: tel-02121318

<https://theses.hal.science/tel-02121318>

Submitted on 6 May 2019

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

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



**Communauté
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes**

THÈSE

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE LA COMMUNAUTE UNIVERSITE
GRENOBLE ALPES**

**préparée dans le cadre d'une cotutelle *entre la
Communauté Université Grenoble Alpes et
l'Université Libanaise.***

Spécialité : **Physiologie-PhysioPathologie-Pharmacologie**

Arrêté ministériel : le 6 janvier 2005 – 25 mai 2016

Présentée par

Zeinab EL DIRANI

Thèse dirigée par **Pr. Gilles FAURY** et **Pr. Wissam JOUMAA**
codirigée par **Dr. Eric ESTÈVE** et **Dr. Ahmad DAHER**

préparée au sein des **Laboratoires : HP2-Hypoxie et
Physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires – Ecole
Doctorale de Chimie et Sciences du Vivants et des
laboratoires : Rammal Rammal- et ATAC-Approches
thérapeutiques anti-cancer – Ecole doctorale des Sciences et
Technologies.**

Effets de l'hypoxie intermittente et de l'entraînement physique intensif sur la structure et la fonction du tissu musculaire chez le rat

Thèse soutenue publiquement le **31 Octobre 2018**,
devant le jury composé de :

M. Sébastien BLAISE,

Maître de conférences, Université de Champagne-Ardenne Reims – France,
Rapporteur

M. Nassim FARES,

Professeur, Université Saint Joseph – Liban, Rapporteur

M. Walid HLEIHEL,

Professeur associé, Université Saint Esprit de Kaslik – Liban, Examinateur

M. François BOUCHER,

Professeur, Université Grenoble Alpes – France, Président du jury

M. Gilles FAURY,

Professeur, Université Grenoble Alpes – France, Directeur de thèse

M. Wissam JOUMAA

Professeur, Université Libanaise – Liban, Directeur de thèse



Remerciements

Il me semble difficile de remercier tout le monde, c'est grâce à l'aide de nombreuses personnes que j'ai pu mener cette thèse à son terme.

Je voudrais tout à d'abord remercier Monsieur le Dr **Sébastien Blaise** et Monsieur le Pr **Nassim Fares**, qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de ma thèse.

De même, je remercie Monsieur le Pr **François Boucher** et Monsieur le Pr **Walid Hleihel**, qui ont accepté de me consacrer leur temps en examinant ce manuscrit ce travail.

Je tiens à remercier chaleureusement mon directeur de thèse Monsieur le Pr Gilles **Faury**, pour toute son aide. Je suis ravie d'avoir travaillé sous ta direction, car outre ton expérience scientifique et tes qualités pédagogiques exceptionnelles, tu as toujours été là pour me soutenir et me conseiller surtout durant la rédaction de cette thèse. C'est à tes côtés que j'ai compris ce que rigueur et précision voulaient dire...

Je remercie grandement mon co-directeur de thèse, Monsieur le Dr **Éric Estève**, pour son encadrement, tes conseils, tes qualités scientifiques et ton effort exceptionnel durant la rédaction. La réalisation de ce travail n'aurait pas été possible sans ta présence et la collaboration que tu as menée avec l'Université Libanaise.

Je voudrais remercier encore, mes encadrants à l'Université Libanaise : mon directeur Monsieur le Pr **Wissam Joumaa** et mon co-directeur : Monsieur le Dr **Ahmad Daher** pour leurs efforts et leurs participations scientifiques ainsi que le temps qu'ils ont consacré à ma recherche.

Je tiens à remercier l'Agence Universitaire de la Francophonie (**AUF**) et l'Association de Spécialisation et d'Orientation Scientifique (**ASSG**) à Beirut pour le financement que m'avez offert pour réaliser cette thèse.

Par ailleurs, je tiens également à adresser mes sincères remerciements à mes collègues au laboratoire HP2 particulièrement **Marielle**, **Jessica** et **Guillaume**. Je remercie encore toutes les personnes au laboratoire, surtout la directrice Pr **Diane Godin-Ribuot** : merci de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire, **Emeline** et **Sandrine** : merci beaucoup pour votre assistance et conseils.

Sans oublier les plus belles rencontres de ma vie à Grenoble : **Leydi**, **Abbigail** et **Samia**, je vous aime beaucoup.

Pour tous mes amis qui m'ont apporté leur soutien moral durant ces années, je vous remercie sincèrement, surtout : **Johnny**, **Zeinab (Emm Youssef)**, **Mohamad (coco)** et **Amani**.

À **Elissar**, tu es la sœur que la vie a oublié de me donner, ma meilleur amie c'est toi, toi sur qui j'ai toujours pu compter, qui est toujours présente quand je ne vais pas bien, qui me rend heureuse et réchauffe mon cœur.

Ali Chehab, depuis 2 ans, je t'ai promis de te mentionner dans les remerciements de ma thèse sans aucune raison, mais maintenant je te remercie pour plusieurs raisons dont essentiellement la pizza que tu m'as envoyée du Suède ! Je ne l'oublie jamais !

À ma chère maman **Houwaida**, mes chers frères **Mohamad Ali**, **Mohamad Hussein** et **Mustafa Fawaz**, aucune expression ne peut exprimer ma reconnaissance pour votre dévouement et vos sacrifices, vous êtes la raison derrière mon succès. Vous êtes la source d'énergie sans laquelle je n'ai pas pu continuer, surtout après la perte de papa.... Je vous aime beaucoup.

À mon amour, mon ami, mon père, mon frère, à la seule personne capable de me faire rire sans effort même dans les plus difficiles situations : je t'adore **Hassan**. Je suis impatiente d'avoir un bébé qui te rassemble **Habibi**.

Dédicaces

À mon père, **Issa El Dirani**, décédé le Samedi 14 Janvier 2017. Je n'arrive toujours pas à m'imaginer que tu es parti et que je me retrouve sans toi. J'ai toujours attendu ce jour, pour te rendre fier, pour te remercier, pour t'exprimer ma reconnaissance pour tes sacrifices....mais c'est la volonté de Dieu. Tu es une personne exceptionnelle, qui a lutté le cancer avec un sourire. Tu restes toujours ma source d'inspiration, tu n'es plus là où tu étais, mais tu es partout là où je suis.....

À toi **Papa**, à toute personne qui lutte contre le cancer, je dédie mon travail....

وَأَمَّا حَقُّ أَبِيكَ فَإِنَّ تَعْلَمَ أَنَّهُ أَصْلَكَ، وَأَنَّكَ لَوْلَاهُ لَمْ تَكُنْ،
فَمَهْمَا رَأَيْتَ فِي نَفْسِكَ مِمَّا يَعْجَبُكَ، فَاعْلَمْ أَنَّ أَبَاكَ أَصْلُ
النِّعْمَةِ عَلَيْكَ فِيهِ، فَاحْمَدِ اللَّهَ وَاشْكُرْهُ عَلَى قَدْرِ ذَلِكَ

الامام علي بن الحسين (ع)

Table des matières

Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	10
Liste des abréviations.....	11
Résumé.....	13
I. Contexte.....	15
II. Introduction.....	18
II.1. Le système musculaire	18
II.1.1. Le muscle strié squelettique.....	20
II.1.1.1. Description	20
II.1.1.2. Contraction et innervation.....	21
II.1.1.3. Fibres musculaires et structure.....	22
II.1.1.4. Les protéines contractiles.....	23
II.1.2. Le muscle strié cardiaque	25
II.1.2.1. Description	25
II.1.2.2. Contraction et innervation.....	26
II.1.2.3. Fibres musculaires et structure.....	27
II.1.2.4. Protéines contractiles.....	28
II.1.3. Le muscle lisse.....	29
II.1.3.1. Description	29
II.1.3.2. Contraction et innervation.....	30
II.1.3.2. Ultrastructure et fonctions.....	31
II.1.3.2. Protéines contractiles.....	32
II.2. Le système vasculaire	33
II.2.1. Généralités	33
II.2.2. Structure.....	34
II.2.2.1. L'intima.....	35
II.2.2.2. La média.....	36
II.2.2.3. L'adventice.....	37
II.2.3. Les composants artériels et veineux du système vasculaire	38
II.2.3.1. Les artères élastiques (ou conductrices).....	39
II.2.3.2. Les artères musculaires	40
II.2.3.3. Les artérioles	40
II.2.3.3. Les veines.....	41
II.2.4. Les cellules musculaires lisses.....	42
II.2.4.1. Histologie	42
II.2.4.2. Rôle des CMLV dans la structure et la fonction des vaisseaux	42
II.2.5. Différences entre la contraction des muscles lisses et muscles striés...	43
II.2.5.1. Couplage excitation-contraction dans les muscles lisses	44
II.2.5.2. Couplage excitation-contraction des muscles striés.....	46

II.2.5.2.1. Couplage excitation-contraction des muscles striés cardiaque.....	47
II.2.5.2.2. Couplage excitation-contraction des muscles striés squelettiques	49
II.2.5.3. Les protéines contractiles	51
II.2.5.3.1. La tropomyosine.....	51
II.2.5.3.1.1. Structure et fonctions.....	51
II.2.5.3.1.2. Isoformes	52
II.2.5.3.2. La Troponine	53
II.2.5.3.2.1. Isoformes	54
II.2.5.3.2.2. Structure et fonction	55
II.2.5.3.3. La calmoduline	56
II.2.5.3.3.1. Isoformes	56
II.2.5.3.3.2. Structure et fonctions.....	56
II.2.5.3.4. La Calponine	56
II.2.5.3.5. Le parvalbumine	57
II.2.6. Homéostasie du calcium dans les cellules musculaires lisses	58
II.2.6.1. Le calcium : déterminant de la contractilité des CMLV	58
II.2.6.2. Compartimentation du calcium	59
II.2.6.3. Rôle du Ca ²⁺ dans la contraction des CMLV	60
II.2.6.4. Rôle du Ca ²⁺ dans la relaxation des CMLV	61
II.2.6.5. Les canaux et les récepteurs sensibles au calcium	62
II.2.6.5.1. Les récepteurs et les canaux membranaires sensibles au calcium	64
II.2.6.5.1.1. Les récepteurs de la famille TRP	64
II.2.6.5.1.1.1. La sous-famille des TRPV	66
II.2.6.5.2. Les récepteurs intracellulaires sensibles au calcium	71
II.2.6.5.2.1. Les récepteurs sensibles à la ryanodine	72
II.2.6.5.2.1.1. Isoformes des RyR.....	72
II.2.6.5.2.1.2. Structure des RyR	73
II.2.6.5.2.1.3. Fonctions des RyR	74
II.2.6.5.2.1.4. Le rôle des RyR dans les muscles lisses	75
II.2.6.5.2.2. Les canaux IP3R	76
II.2.6.5.2.2.1. Isoformes des IP3R.....	76
II.2.6.5.2.2.2. Structure des IP3R	77
II.2.6.5.2.2.3. Fonction des IP3R.....	78
II.2.6.5.2.3. Les pompes SERCA	79
II.2.6.5.2.3.3. Isoformes de SERCA	80
II.2.6.5.2.3.4. Fonction des SERCA	81
II.2.6.5.2.3.5. Structure des SERCA.....	81
II.3. Plasticité musculaire dans les situations physiopathologiques.....	83
II.3.1. Santé publique et maladies cardiovasculaires, SAOS, obésité	83
II.3.1.1. Les maladies cardiovasculaires	87
II.3.1.2. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil.....	93
II.3.1.2.1. Prévalence et épidémiologie.....	94
II.3.1.2.1.1. Le sexe.....	94
II.3.1.2.1.2. L'âge.....	96
II.3.1.2.1.3. L'obésité	97
II.3.1.2.2. Physiopathologie du SAOS	97
II.3.1.2.2.1. La relation entre SAOS et l'hypertension	99
II.3.1.2.2.2. L'hypoxie	101
II.3.1.2.2.2.1. L'hypoxie continue	102
II.3.1.2.2.2.1. L'hypoxie intermittente.....	103
II.3.1.2.2.3. Association de l'HI du SAOS avec les pathologies cardiovasculaires	104
II.4. Entraînement physique intensif	105
II.4.1. Entraînement physique et hypertension (effet sur la pression artérielle	

et la fréquence cardiaque).....	106
II.4.2. Effet de l'entraînement physique sur la structure et la fonction vasculaire.....	107
II.4.3. Entraînement physique intensif contre modéré	111
III. Récapitulatif des problématiques ayant motivé la réalisation de ce travail et objectifs scientifiques.....	115
IV. Matériels et méthodes.....	118
IV.1. Modèle expérimental.....	118
IV.2. Les conditions de l'étude.....	118
IV.3. Suivi du poids.....	119
IV.4. Exposition à l'hypoxie intermittente.....	119
IV.4.1. Dispositif d'exposition.....	119
IV.4.2. Protocole d'exposition.....	120
IV.5. Programme d'entraînement physique intensif.....	121
IV.5.1. Choix du protocole d'entraînemeent.....	121
IV.5.2. Détails du protocole d'entraînement.....	122
IV.6. Mesure des paramètres physiologiques.....	123
IV.6.1. Technique de mesure <i>in-vivo</i> de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque.....	123
IV.6.2. Méthode de mesure de l'hématocrite.....	124
IV.7. Dissection.....	124
IV.7.1. Choix et prélèvement des muscles.....	125
IV.8. Technique d'étude ex-vivo de la réactivité vasculaire de l'aorte : Myographie de tension.....	128
IV.8.1. Description de la cuve expérimentale.....	128
IV.8.2. Protocole.....	129
IV.9. Technique d'étude de la signalisation calcique dans les cellules musculaires lisses vasculaires.....	132
IV.9.1. Culture primaire des cellules musculaires lisses vasculaires.....	132
IV.9.2. Mesure de la concentration du calcium cytosolique.....	133
IV.9.3. Exploitation des résultats.....	135
IV.10. Technique de PCR en temps réel (q-PCR).....	135
IV.10.1. Extraction des ARN totaux.....	136
IV.10.2. Evaluation quantitative et qualitative des ARN totaux extraits.....	137
IV.10.3. Transcription inverse.....	140
IV.10.4. PCR en temps réel.....	140
IV.11. Technique de Western blot.....	145
IV.11.1. Extraction des protéines.....	145
IV.11.2. Dosage protéique.....	146
IV.11.3. Migration sur gel de polyacrylamide et détection des protéines.....	147
IV.12. Etude du remodelage vasculaire par analyses histologiques.....	150
IV.12.1. Montage sur lames.....	150

IV.12.2. Coloration hématoxyline / éosine.....	150
IV.12.3. Déshydratation et montage.....	151
IV.12.4. Observation au Microscope.....	151
IV.13. Activite enzymatique de la citrate synthase (CS).....	151
IV.13.1. Principe.....	151
IV.13.2. Protocole.....	152
IV.14. Analyses statistiques.....	155
V. Résultats.....	156
V.1. Les paramètres physiologiques.....	156
V.1.1. Poids.....	156
V.1.2. Pression artérielle.....	159
V.1.3. Fréquence cardiaque.....	160
V.1.4. Hématocrite.....	161
V.1.5. Activité de la citrate synthase.....	162
V.2. Remodelage vasculaire.....	164
V.3. L'artériographie de tension.....	168
V.4. La signalisation calcique dans les CMLV.....	173
V.5. Real time PCR.....	175
V.5.1. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant aux canaux- récepteurs et pompes calciques des CMLV.....	177
V.5.2. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant aux protéines responsable du couplage excitation-contraction au niveau des CMLV.....	183
V.5.3. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant pour les canaux et les pompes calciques au niveau des muscles squelettiques.....	190
V.5.4. L'effet de l'HI et de l'EI sur les gènes codant pour les isoformes du complexe troponine-tropomyosine.....	197
V.6. Western Blot.....	204
Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression protéique des canaux- récepteurs sensibles au calcium dans les CMLV.....	204
VI. Analyses générales et perspectives.....	197
VI.1. Discussion générale.....	197
VI.2. Conclusions et perspectives.....	225
VII. Références bibliographiques.....	244

Liste des figures

Figure 1 : Coupes longitudinales des 3 types de muscles : (A et 1) squelettique, (B et 2) lisse et (C et 3) cardiaque.....	19
Figure 2 : Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique et organisation de la triade responsable du couplage excitation-contraction.....	21
Figure 3 : Organisation des myofilaments d'actine et de myosine en formant les bandes A, I et les disques Z au niveau des fibres musculaires striées squelettiques.....	24
Figure 4 : Ultrastructure des myocytes cardiaques en coupe frontale, montrant les différentes structures impliquées dans le couplage excitation-contraction.....	28
Figure 5 : Image montrant l'organisation et l'innervation des cellules musculaires lisses.....	31
Figure 6 : Coupe transversale d'une artère montrant les 3 tuniques : intima, média et adventice.....	35
Figure 7 : Schéma montrant les différents composants des trois couches (intima, média, adventice) constituant les vaisseaux sanguins.....	38
Figure 8 : Présentation simplifiée du système cardiovasculaire avec les différents types des vaisseaux sanguins élastiques et musculaires.....	40
Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme de régulation dépendante de la myosine de la contraction-relaxation du muscle lisse.....	46
Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme de régulation du couplage excitation-contraction et relaxation du muscle strié cardiaque.....	48
Figure 11 : Les différentes étapes du couplage excitation- contraction dans les muscles striés squelettiques.....	50
Figure 12 : Image montrant la structure de la protéine tropomyosine reconstituée à partir d'une image issue de la cryo-microscopie électronique à 6,5 Å.....	52
Figure 13 : Schéma montrant le complexe de la troponine dans le muscle squelettique avec l'actine et la tropomyosine.....	55
Figure 14 : Compartimentation du signal Ca^{2+} dans la cellule musculaire.....	61

Figure 15 : Présentation schématique de la cellule musculaire lisse vasculaire, avec les récepteurs, les canaux et les pompes sensibles au calcium.....	64
Figure 16 : Identité structurelle de TRPV4.....	69
Figure 17 : Image montrant la structure de RyR1 reconstituée à partir d'une image issue de la cryo-microscopie électronique avec résolution à 9,6 Å.....	75
Figure 18 : La structure 3D du canal IP3R1 tétramérique déterminée par cryo-microscopie électronique.....	79
Figure 19 : Les domaines structuraux de la pompe Ca ²⁺ -ATPase du réticulum sarcoplasmique SERCA.....	83
Figure 20 : Carte mondiale montrant la distribution mondiale des 17,3 millions de morts dues aux maladies cardiovasculaires selon le rapport de l'organisation mondiale de la santé.....	85
Figure 21 : Répartition des causes de mortalité chez les hommes (A) et les femmes (B) en Europe.....	86
Figure 22 : Répartition des causes de mortalité (de tout âge, dans les deux sexes) au Liban tiré du rapport de l'organisation mondiale de santé en 2014.....	87
Figure 23 : Graphique montrant la prévalence des apnées obstructives du sommeil dans les différents MCV.....	90
Figure 24 : Diagramme représentant les liens pathophysiologiques entre les apnées obstructives du sommeil et les MCV.....	92
Figure 25 : Figure montrant l'état des voies aériennes supérieures durant le sommeil dans le cas de la respiration normale et dans le cas du SAOS.....	93
Figure 26 : Tableau résumant les différentes estimations de prévalence des apnées obstructives du sommeil faibles à sévères, mesurées par plusieurs chercheurs (1993-2015) en fonction du sexe.....	95
Figure 27 : Graphique montrant la moyenne de l'AHI croissante des apnées du sommeil en fonction de l'âge chez l'homme et la femme.....	96
Figure 28 : Graphique montrant la physiopathologie et les effets du syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur le système cardiovasculaire.....	98
Figure 29 : Graphique représentant le risque relatif de la mortalité toutes causes confondues chez 4 différentes catégories de participants à l'étude en fonction de leur degré d'activité physique.....	106

Figure 30 : Les stimuli hémodynamiques durant l'exercice physique et leurs effets sur le remodelage vasculaire et la dilatation endothélium-dépendante activée par le flux sanguin.....	108
Figure 31 : Schéma représentant les effets de l'exercice physique sur les mécanismes cellulaires et moléculaires endothéliaux impliqués dans la régulation de l'activité de eNOS et dans la synthèse du NO.....	110
Figure 32 : Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente pour rats/souris de l'animalerie du laboratoire HP2.....	120
Figure 33 : (A) Image montrant une cage en plexiglas dans lequel les rats sont exposés à l'HI avec les flèches montrant les mouvements de l'air intérieur. (B) : Schéma représentatif des cycles d'hypoxie intermittente en termes de pourcentage d'oxygène de l'air présent dans les cages en fonction du temps.....	121
Figure 34 : Prises de vue du dispositif d'entraînement sur tapis roulant.....	122
Figure 35 : Schéma et tableau représentatifs du protocole de course (entraînement intensif) suivi par les rats sur tapis roulant, faisant état des vitesses croissantes au cours du temps pendant chaque période de 24 minutes de course.....	123
Figure 36 : Schémas montrant les différentes artères prélevées des rats.....	126
Figure 37 : Figure montrant les trois muscles squelettiques (soléaire, gastrocnémien et plantaire) prélevés de la patte inférieure des rats.....	127
Figure 38 : Représentation schématique du montage utilisé pour étudier la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte thoracique descendante de rat.....	129
Figure 39 : Figure montrant les phases de mesure de l'activité enzymatique de la citrate synthase avant et après l'ajout de l'oxaloacétate.....	154
Figure 40 : Variation relative du poids des rats durant les 21 jours d'exposition à l'hypoxie intermittente	158
Figure 41 : Les pressions artérielles des 4 groupes étudiés de rats	159
Figure 42 : Fréquence cardiaque des 4 groupes de rats étudiés.....	160
Figure 43 : Hématocrite des 4 groupes de rats étudiés.....	162
Figure 44 : Activité de la citrate synthase (CS) mesurée dans les 4 groupes de rats étudiés.....	163

Figure 45-I : Mesure de l'épaisseur de l'intima-média sur des coupes histologiques de 8 µm d'épaisseur d'artères des 4 groupes de rats étudiés.....	166
Figure 45-II : Les images obtenues après la coloration des coupes histologiques par l'hématoxyline / éosine extraites des 4 groupes de rats étudiés.....	167
Figure 46 : Courbes représentant les réponses cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés.....	170
Figure 47 : Courbes représentant les réponses cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés.....	171
Figure 48 : Courbes cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés.....	172
Figure 49 : Amplitude de la réponse calcique des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) à 10 mM de caféine, sans pré-incubation (A), pré-incubées avec 10 µM de dantrolène (B) ou pré-incubées avec 10 µM xestospongine (C).....	175
Figure 50 : Variations de l'expression de 8 gènes codant pour les récepteurs, canaux et pompes du calcium (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Itpr1 et Itpr3) dans le tissu vasculaire de l'aorte thoracique extraites des 4 groupes de rats.....	180
Figure 51 : Graphique montrant la variation d'expression de 8 gènes codant pour les récepteurs, canaux et pompes de calcium (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itpr1) dans le tissu vasculaire de l'aorte abdominale extraites des quatre groupes de rats.....	181
Figure 52 : Graphique montrant la variation d'expression de 8 gènes récepteurs de calcium, canaux et pompes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Itpr3) dans le tissu vasculaire des artères mésentériques extraites des quatre groupes de rats.....	182
Figure 53 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans l'aorte thoracique extraite des quatre groupes de rats étudiés.....	187
Figure 54 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans l'aorte abdominale extraite des quatre groupes de rats étudiés.....	188
Figure 55 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans les artères mésentériques extraites des quatre groupes de rats étudiés.....	189
Figure 56 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Itpr3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle gastrocnémien extrait des 4 groupes de rats.....	194

Figure 57 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle plantaire extrait des 4 groupes de rats.....	195
Figure 58 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle soléaire extrait des 4 groupes de rats.....	196
Figure 59 : Variation de l'expression de 6 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle gastrocnémien des 4 groupes de rats.....	201
Figure 60 : Variation de l'expression de 6 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle plantaire des 4 groupes de rats.....	202
Figure 61 : Variation de l'expression de 5 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle soléaire des 4 groupes de rats.....	203
Figure 62 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans l'aorte thoracique des différents groupes de rats étudiés.....	205
Figure 63 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans l'aorte abdominale de différents groupes de rats étudiés.....	206
Figure 64 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans les artères mésentériques de différents groupes de rats étudiés.....	208
Figure 65 : Représentation schématique résumant les effets observés de l'hypoxie intermittente chronique et de l'entraînement physique intensif sur les réponses moléculaires, cellulaires et systémiques des rats Wistar (flèche rouge : effet de l'HI, flèche vert : effet de l'EI).....	241

Liste des tableaux

Tableau 1 : Amorces sens et anti-sens des gènes de références utilisés en PCR en temps réel.....	142
Tableau 2 : Les amorces sens et anti-sens des gènes d'intérêt étudiés en PCR en temps réel.....	143
Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot, leurs références, leurs dilutions, les tampons de dilution et l'espèce qui a servi pour leur fabrication.....	149
Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western Blot, leurs dilutions et les tampons dans lesquels ils sont dilués.....	149

Liste des abréviations

HI : hypoxie intermittente chronique

SAOS : syndrome d'apnée obstructive du sommeil

EI : entraînement physique intensif

N : rats sédentaires en normoxie

NIT : rats sédentaires en normoxie soumis à l'EI

IH : groupe de rats sédentaires soumis à l'HI

IHIT : groupe de rats en HI et soumis à l'EI

CMLV : cellules musculaires lisses vasculaires

PO₂ : pression partielle en O₂

RS : réticulum sarcoplasmique

CMLV : cellule musculaire lisse vasculaire

REL : réticulum endoplasmique lisse

MLCK : kinase de la chaîne légère de myosine

MLCP : la phosphatase de la chaîne légère de myosine

TnC : troponine-C

TnI : troponine-I

TnT : troponine-T

SERCA : réticulum sarco-endoplasmique calcium-ATPase

DHPR : récepteur sensible aux dihydropyridines

RyR : récepteur sensible à la ryanodine

IP3R : récepteur sensible à 1, 4,5- inositol trisphosphate

TRPV4 : membre 4 de la famille vanilloïde des récepteurs à potentiel transitoire

Tpm : tropomyosine

Tntt : troponine

Calm : calmoduline

PA : pression artérielle

FC : fréquence cardiaque

IM : intima-média

ACh : acétylcholine

PE : phényléphrine

ET-1 : endothéline -1

WB : western blot

Q-PCR : PCR en temps réel

Résumé

L'hypoxie intermittente chronique (HI), constitue le symptôme majeur du syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS), une maladie chronique caractérisée par des interruptions de respiration durant le sommeil. L'HI est impliquée dans le développement de nombreuses maladies cardiovasculaires (ex : l'hypertension, l'infarctus du myocarde) et musculaires (ex : le remodelage et la dysfonction musculaire). En revanche, l'entraînement physique intensif (EI) est connu pour ses effets bénéfiques dans la prévention et le traitement des complications du système musculaire.

Un certain nombre de ces complications sont liées à la contraction musculaire et, comme la voie de signalisation de calcium est l'élément clé dans la mise en place et la régulation de la contraction musculaire, nous avons réalisé cette étude dans le but de comprendre l'effet de l'HI sur la signalisation calcique et le remodelage musculaire, ainsi que pour tester la capacité de l'EI à compenser les effets indésirables de l'HI.

Les expériences sont conduites sur des rats Wistar mâles arbitrairement assignés à 4 groupes : N (rats sédentaires en normoxie), NIT (rats sédentaires en normoxie soumis à l'EI), IH (groupe de rats sédentaires soumis à l'HI) et IHIT (groupe de rats en HI et soumis à l'EI). Nous avons évalué les changements induits par l'HI et l'EI à l'échelle physiologique, cellulaire et moléculaire sur différents types de vaisseaux (élastiques et musculaires) et 3 types de muscles squelettiques.

Nos résultats montrent que l'HI induit une augmentation de la pression artérielle (PA), de la fréquence cardiaque (FC), de l'épaisseur de l'intima-média (IM) et une forte entrée de calcium cytosolique dans les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). De son côté, l'EI s'oppose à l'effet de l'HI en diminuant la PA et la FC des rats. De plus, l'EI s'est montré capable de limiter l'épaississement IM induit par l'HI au niveau de l'artère carotide.

En fonction du tissu, nous avons obtenu un effet significatif de l'HI et de l'EI sur l'expression des récepteurs impliqués dans la signalisation calcique à l'échelle de l'ARNm et à l'échelle protéique. Cet effet tissu-dépendant est également observé au niveau de l'expression des ARNm des gènes codants aux protéines effectrices dans la contraction.

En résumé, l'EI s'est révélé capable de compenser les effets de l'HI chez les rats et de prévenir les complications cardiovasculaires, le remodelage et la dysfonction musculaire qui y sont associés. Ainsi, ces résultats nous laissent suggérer que l'EI pourrait représenter une stratégie préventive très prometteuse pour limiter ces complications liés à l'HI chez les patients souffrant du SAOS.

Mots clés : hypoxie intermittente, entraînement physique intensif, syndrome d'apnées obstructive du sommeil, contraction musculaire, signalisation calcique, remodelage vasculaire.

I. Contexte

Dans le corps humain, la masse musculaire représente 35 % chez l'homme, et 28 % chez la femme. Le tissu musculaire est constitué de cellules différenciées spécialisées dans la contraction, les fibres musculaires. Ces fibres sont capables de produire des forces grâce à leurs propriétés d'excitabilité et de contractilité (Berridge BR. et coll., 2013).

Toutes les fibres musculaires contiennent des fibres contractiles appelées myofibrilles, composées d'actine et de myosine. L'interaction entre ces deux composants est à l'origine des propriétés fonctionnelles des muscles (Brenner B. et coll., 1987).

Le tissu musculaire, comme tout tissu de notre organisme, est sensible aux changements environnementaux. L'hypoxie, qui se définit par une diminution de la pression partielle en O₂ (PO₂), est l'un de ces changements observés dans différentes situations environnementales (hypoxie due à l'altitude), physiologiques (hypoxie due à l'exercice physique), ou parfois pathologiques (hypoxie durant l'insuffisance cardiaque, respiratoire ou bien suite à une ischémie).

Quelle que soit l'origine de l'hypoxie, elle est traduite au niveau cellulaire par une faible disponibilité en oxygène, qui est nécessaire au moins pour la respiration cellulaire, ce qui implique une réponse dans l'ensemble des systèmes de l'organisme pour s'adapter à ce manque d'oxygène. Parmi les systèmes les plus touchés par l'hypoxie, on trouve le système musculaire (cardiovasculaire et squelettique), le système hématologique, et le système nerveux (Michiels C., 2004) (Lipp A. et coll., 2010).

La réponse primaire de l'organisme à l'hypoxie se traduit par une perte importante de la masse corporelle chez l'Homme (Hoppeler H. et coll., 1990) aussi bien que chez l'animal (Bigard X. et coll., 2000) (Daneshrad Z. et coll., 2000). Ceci est dû à la perte de l'appétit et une baisse de la prise alimentaire, qui à son tour induit une perte de graisse et de la masse musculaire. Si l'hypoxie persiste suffisamment, elle peut stimuler d'autres réponses au niveau de l'organisme qui suivent la perte du poids. Ces réponses peuvent aller de l'inflammation, jusqu'aux anomalies nerveux et cardiovasculaires, et aboutir même à la mort cellulaire.

Il existe plusieurs types d'hypoxie (continue, intermittente, chronique, hypobarique et normobarique) et nous nous intéressons dans notre étude particulièrement à l'hypoxie intermittente chronique (HI) et ses effets sur deux systèmes musculaires : le système

cardiovasculaire (muscle cardiaque et muscle lisse vasculaire) et le système musculaire squelettique dans le cadre du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS). Le SAOS, est une maladie chronique caractérisée par des fermetures répétitives des voies aériennes supérieures durant le sommeil, qui provoquent une HI (Dempsey JA. et coll., 2010), qui est la conséquence majeure de ce syndrome. L'HI est connue pour être responsable des complications cardiovasculaires du SAOS, dont l'hypertension artérielle, les maladies vasculaires périphériques, les accidents vasculaires cérébraux et la mort subite d'origine cardiaque (Iturriaga R. et coll., 2017) (Michiels C., 2004) (Hoyos CM. et coll., 2017) (Beaudin AE. et coll., 2017) (Kanagy NL., 2009) (Trzepizur W. et coll., 2017).

Le seul traitement du SAOS est l'application d'un air inspiré sous pression positive continue (PPC), qui consiste en un modèle de support ventilatoire (ou respiration assistée) permettant de traiter certains troubles respiratoires (Freedman N., 2017) (Dibra MN. et coll., 2017). Cependant, la PPC n'est pas tolérée par tous les patients et il est donc nécessaire de proposer des méthodes alternatives pour traiter le SAOS et ses conséquences sur le système cardiovasculaire et squelettique.

Par ailleurs, l'entraînement physique intensif (EI) est connu d'une part pour ces effets bénéfiques sur le système musculaire cardiovasculaire (Recchioni R. et coll., 2017) (Leggio M. et coll., 2017) (Swedish Council on Health Technology Assessment, 2007) (Kachur S. et coll., 2017) et sur les muscles squelettiques d'autre part (Ziaaldini MM. et coll., 2017) (Adams V. et coll., 2017) (Pattanakuhar S. et coll., 2017) (De Andrade FMD. et Pedrosa RP., 2016), nous l'avons donc proposé comme une méthode préventive et/ou curative des complications musculaires cardiovasculaires et squelettiques induites par l'HI.

Dans ce qui suit, la première partie de l'introduction est ainsi consacrée pour présenter les systèmes musculaires : cardiovasculaire et squelettique, leur physiologie et fonctionnement. Nous avons mis l'accent particulièrement sur la contraction, une des plus importantes fonctions de ces systèmes, en comparant les mécanismes d'excitation-contraction entre les différents tissus musculaires (lisse, strié cardiaque et strié squelettique). Et comme la voie de signalisation calcique joue un rôle clé dans le phénomène de contraction, nous l'avons représenté en détails, ainsi que les récepteurs, canaux et pompes calciques qui sont responsables de la gestion du calcium dans les cellules.

La deuxième partie de l'introduction est consacrée à la description du système cardiovasculaire et musculaire squelettique dans les cas pathologiques. Particulièrement dans le cas du SAOS, qui est une maladie chronique qui touche des personnes de tout âge et de deux sexes et dont la prévalence est en croissance continue. Le SAOS est ensuite décrit : les causes, les conséquences, la prévalence, les facteurs de risque et la pathophysiologie. L'hypoxie intermittente, la complication majeure liée au SAOS, est ainsi détaillée : ses conséquences et son association à des maladies cardiovasculaires (dont particulières, l'hypertension, le remodelage et la dysfonction vasculaire) et squelettiques. Finalement, nous avons représenté l'entraînement physique intensif, ses bienfaits et ses différents types comme un moyen de prévention et de traitement des complications cardiovasculaires et squelettiques.

II. Introduction

II.1. Le système musculaire

Le système musculaire regroupe un ensemble de muscles et d'organes dont les tissus sont constitués de fibres capables de se raccourcir, donc de produire un mouvement, en se contractant. Le raccourcissement du tissu musculaire se produit essentiellement, en réponse à un stimulus, grâce à deux propriétés qui le caractérisent : la contractilité et l'excitabilité (Rizzo DC., 2015).

Les fonctions du tissu musculaire, qui dépendent principalement de l'organe où il se trouve, sont les suivants : la production des mouvements du corps, la stabilisation des articulations, le maintien de la posture, la circulation des substances dans l'organisme, la régulation du volume des organes et la production de chaleur (Berridge BR. et coll., 2013).

Un tissu musculaire possède cinq propriétés majeures qui caractérisent son fonctionnement : l'excitabilité, l'élasticité, l'extensibilité, la plasticité et la contractilité. Nous nous intéresserons dans notre étude à la dernière caractéristique fonctionnelle, la contractilité, qui désigne la faculté du muscle de se contracter suite à un stimulus.

Cet intérêt vient du fait que la contractilité musculaire joue un rôle essentiel dans divers processus physiologiques allant de la locomotion animale à la fonction cardiovasculaire (Jin JP. et coll., 2012) (Tonge DP. et coll., 2013) (Laing NG. et Nowak KJ., 2005). De même, une dysfonction de cette contractilité est observée dans plusieurs situations pathologiques telles que les myopathies et l'insuffisance cardiaque (Biolo G. et coll., 2014) (Montén C. et coll., 2015).

Notre organisme regroupe deux types de fibres musculaires, les fibres musculaires lisses et les fibres musculaires striées. Ces dernières sont divisées en muscles striés cardiaques et muscles striés squelettiques. Ces muscles striés, comme leur nom l'indique, sont formés par des fibres alignées parallèlement les unes aux autres qui forment des faisceaux facilement visibles au microscope et séparés transversalement : ceci donne à ces muscles l'aspect de striation. Les muscles lisses, quant à eux, n'apparaissent pas striés et les fibres les constituants ne possèdent pas cette organisation en rayures (Fig. 1).

Nous allons donc présenter dans ce qui suit, les 3 différents types musculaires, pour décrire de manière générale les différences dans leurs structures, leurs innervations et leurs fonctions. Nous

porterons ensuite notre attention principalement sur le muscle lisse vasculaire sur lequel nous avons réalisé la majorité de notre travail, dans le but d'étudier les effets de l'HI et de l'EI sur ce tissu de l'échelle de l'organe à l'échelle moléculaire. Ensuite nous nous concentrerons sur le mécanisme du couplage excitation-contraction, particulièrement au niveau des muscles lisses vasculaires et des muscles striés squelettiques.

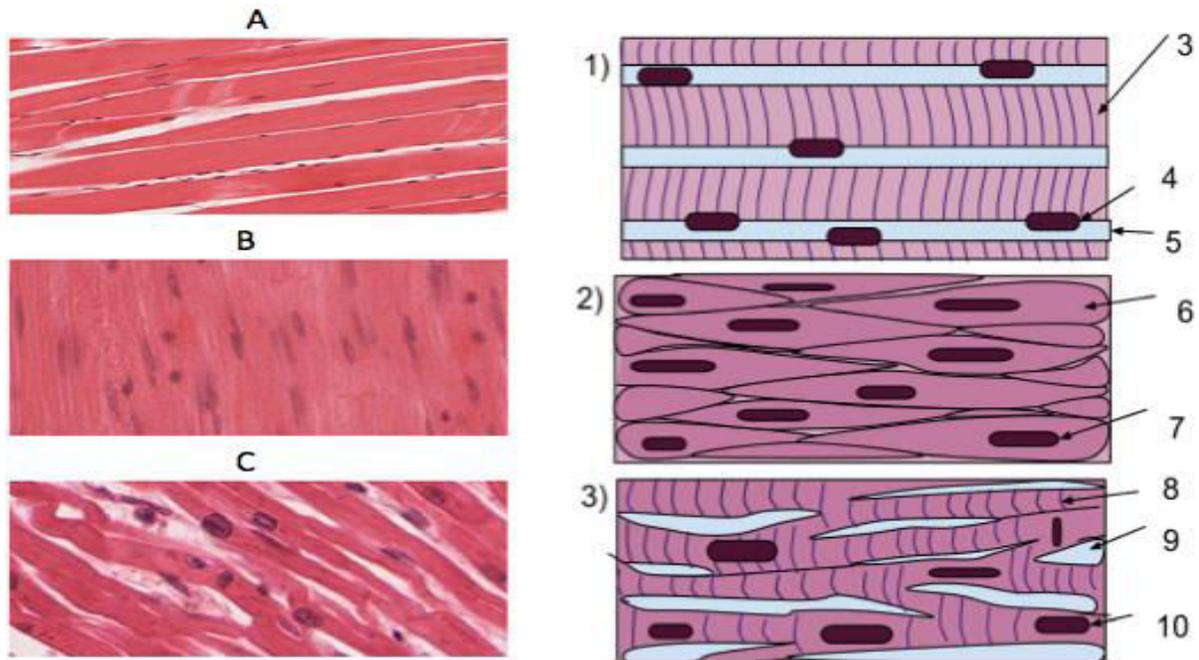


Figure 1 : Coupes longitudinales des 3 types de muscles : (A et 1) squelettique, (B et 2) lisse et (C et 3) cardiaque (Pratt R., 2012). 1) Les cellules musculaires squelettiques sont de longues cellules tubulaires constituées de stries (3) et de noyaux multiples (4). Les noyaux sont ancrés à la membrane cellulaire (5) ce qui induit une localisation sous-membranaire. Les muscles squelettiques sont à l'origine des mouvements volontaires du corps. 2) Les cellules musculaires lisses sont en forme de fuseau (6) : chaque cellule possède un seul noyau (7). Contrairement au muscle squelettique, il n'y a pas de stries visibles. Le muscle lisse agit involontairement et a pour rôle d'assurer le mouvement des substances dans les lumières de différents organes. Ils se trouvent principalement dans les parois des vaisseaux sanguins, des voies aériennes et du tube digestif. 3) Les cellules musculaires cardiaques (localisées principalement dans la paroi du cœur) présentent des espaces de séparation les unes par rapport aux autres et sont reliées entre-elles grâce à des jonctions (9). Les cellules possèdent des stries (8), et chaque cellule possède un seul noyau (10). La fonction principale dite involontaire est la circulation du sang dans tout l'organisme (Rizzo DC., 2015).

II.1.1. Le muscle strié squelettique

II.1.1.1. Description

Le muscle squelettique est un muscle strié qui se solidarise avec le squelette par l'intermédiaire du tendon, permettant ainsi pendant sa contraction le mouvement du squelette et des membres dans une ou plusieurs directions bien définies.

L'observation des coupes longitudinales d'un muscle squelettique, sous microscope photonique, révèle un tissu avec des striations transversales et longitudinales (Lieber R., 2002). Les fibres constituant ce muscle sont des cellules plurinucléées polygonales avec des noyaux se localisant à la périphérie en association avec la membrane du réticulum sarcoplasmique (Fig. 1) (Frontera WR. et Ochala J., 2015).

La fibre musculaire striée squelettique est fonctionnellement considérée comme une cellule géante : 1-5 cm de longueur et 10-100 μm de diamètre. Elle résulte de la fusion de hypoblastes qui forment ainsi un vrai syncytium (Fig. 2) (Macintosh B. et coll., 2006) (Rizzo DC., 2015) (Lodish H. et coll., 2000).

Comme tous les autres tissus, les muscles striés squelettiques sont vascularisés par un réseau de capillaires indispensable à l'oxygénation et à l'alimentation des tissus par les nutriments. Ce réseau prend la forme de mailles rectangulaires qui entourent les fibres musculaires (Korthuis RJ., 2011).

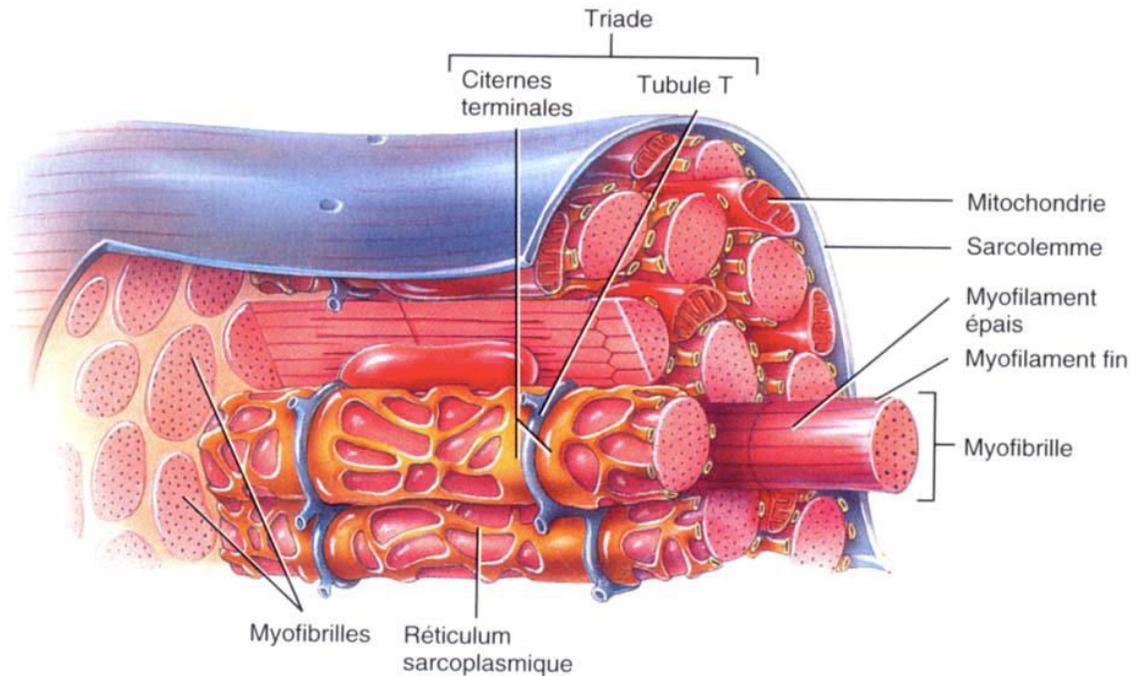


Figure 2 : Ultrastructure de la fibre musculaire squelettique et organisation de la triade responsable du couplage excitation-contraction (Tortora G. et Grabowski SR., 2001).

II.1.1.2. Contraction et innervation

La contraction du muscle strié squelettique est volontaire. Pour cela, ce muscle est innervé par les neurones moteurs du système nerveux somatique dont les corps cellulaires sont situés dans la moelle épinière. Un neurone et les fibres musculaires qu'il innerve forment des complexes nommés unités motrices. L'intensité de la contraction du muscle squelettique dépend du nombre d'unités motrices activées (Beam KG. et Franzini-Amstrong C., 1997) (Frontera WR. et coll., 2015) (Rebbeck RT. et coll., 2014).

II.1.1.3. Fibres musculaires et structure

Chaque cellule musculaire striée squelettique est entourée d'une membrane basale qui la sépare de l'endomysium, qui est une couche de tissu conjonctif lâche enveloppant chacune des fibres d'un muscle. Le sarcolemme, qui désigne la membrane plasmique des cellules musculaires, contient des fines invaginations formant les tubules transverses ou tubules T (Macintosh B. et coll., 2006) (Lieber R., 2002) (Korthuis RJ., 2011).

Les tubules T assurent la propagation des potentiels d'action musculaires vers l'intérieur de la cellule, en direction de l'appareil contractile, du fait de leur pénétration au plus profond de la fibre. Ces tubules sont connectés au réticulum sarcoplasmique (RS), qui est particulièrement développé et entoure les myofibrilles.

Le couplage excitation-contraction, un mécanisme commun à tous les types de muscles, correspond à l'ensemble des phénomènes ayant lieu depuis la stimulation d'une cellule musculaire jusqu'à la production d'une force correspondante à la contraction. Au niveau des muscles squelettiques, ce couplage se fait grâce à une structure nommée triade, formée par l'association des citernes terminales du RS (le lieu de stockage du calcium) avec les tubules T qui sont enserrés de part et d'autre par ces citernes (Beam KG. et Franzini-Armstrong C., 1997) (Korthuis RJ., 2011).

Le RS des fibres musculaires squelettiques est divisé en deux parties : la partie longitudinale et les citernes terminales. Les citernes terminales, localisées à côté des tubules T, portent dans leurs membranes des canaux-récepteurs sensibles à la ryanodine. Ces derniers induisent une libération massive du calcium dans le cytosol lors de l'arrivée du potentiel d'action au niveau de la triade. La deuxième partie du RS, moins développée, contient les pompes calciques ATP ases qui ramènent le calcium depuis le cytosol vers le RS (Wang S. et coll., 1998) (Irving M., 2017).

Les fibres musculaires squelettiques individuelles sont classées selon leur apparence histologique, la rapidité de leur contraction et leur capacité à résister à la fatigue (Korthuis RJ., 2011) (Andersen P. et Kroese AJ., 1978). Les fibres à contraction lente, autrement nommées fibre de type I, sont généralement minces, investies par un réseau capillaire plus dense, et sont de couleur rouge en raison de la présence d'une quantité importante de myoglobine, une protéine liant l'oxygène (Okumachi E. et coll., 2015). Ces fibres de type I résistent à la fatigue, utilisent essentiellement le métabolisme oxydatif comme source d'énergie, et présentent donc un nombre élevé de mitochondries et une teneur importante en enzymes oxydatives, avec de faibles niveaux de glycogène et une faible activité enzymatique glycolytique (Boron WF. et Boulpaep EL., 2009) (Gao K. et coll., 2017).

D'autre part, les fibres à contraction rapide, autrement nommée fibres de type II, diffèrent entre elles en ce qui concerne la fatigabilité. Les fibres de type Iia partagent certaines caractéristiques avec les fibres à contraction lente en étant résistantes à la fatigue, dépendantes du métabolisme

oxydatif et contenant de la myoglobine (elles sont donc rouges) (Armstrong RB., 1996) (Boron WF. et Boulpaep EL., 2009) (Novák P. et coll., 2010).

Cependant, et contrairement aux cellules à contraction lente de type I, les fibres musculaires de type IIa contiennent du glycogène en quantité abondante et plus de mitochondries (Boron WF. et Boulpaep EL., 2009) (Armstrong RB., 1996). Ces caractéristiques distinctives assurent une génération d'ATP adéquate pour compenser le taux accéléré d'hydrolyse de l'ATP dans ces fibres à contraction rapide (Novák P. et coll., 2010).

Un autre type de fibre à contraction rapide, les fibres de type IIb, utilisent essentiellement de l'énergie stockée dans le glycogène et la phosphocréatine car elles contiennent moins de mitochondries et ont une faible teneur en myoglobine (muscles dits blancs). En outre, les fibres de type IIb contiennent une faible quantité d'enzymes oxydatives et sont investies par un réseau capillaire moins dense (Boron WF. et Boulpaep EL., 2009), ce qui les rend par conséquent plus fatigables.

II.1.1.4. Les protéines contractiles

Les fibres musculaires squelettiques contiennent deux types de filaments. Les myofilaments fins d'actine et les myofilaments épais de myosine. Lors de l'observation microscopique, ces myofilaments forment des bandes en alternance : les bandes A (anisotropique) sombres, du fait qu'elles sont constituées des deux types de myofilaments, et les bandes I (isotropique) claires, constituées uniquement d'un seul type de myofilament : les myofilaments fins d'actine. Les unités de contraction (les sarcomères) sont délimitées par les disques Z (Fig. 3), le point d'ancrage des myofilaments d'actine sur les myofilaments de myosine (Frontera WR. et Ochala J., 2015) (Dube DK. et coll., 2014).

Fibres musculaires

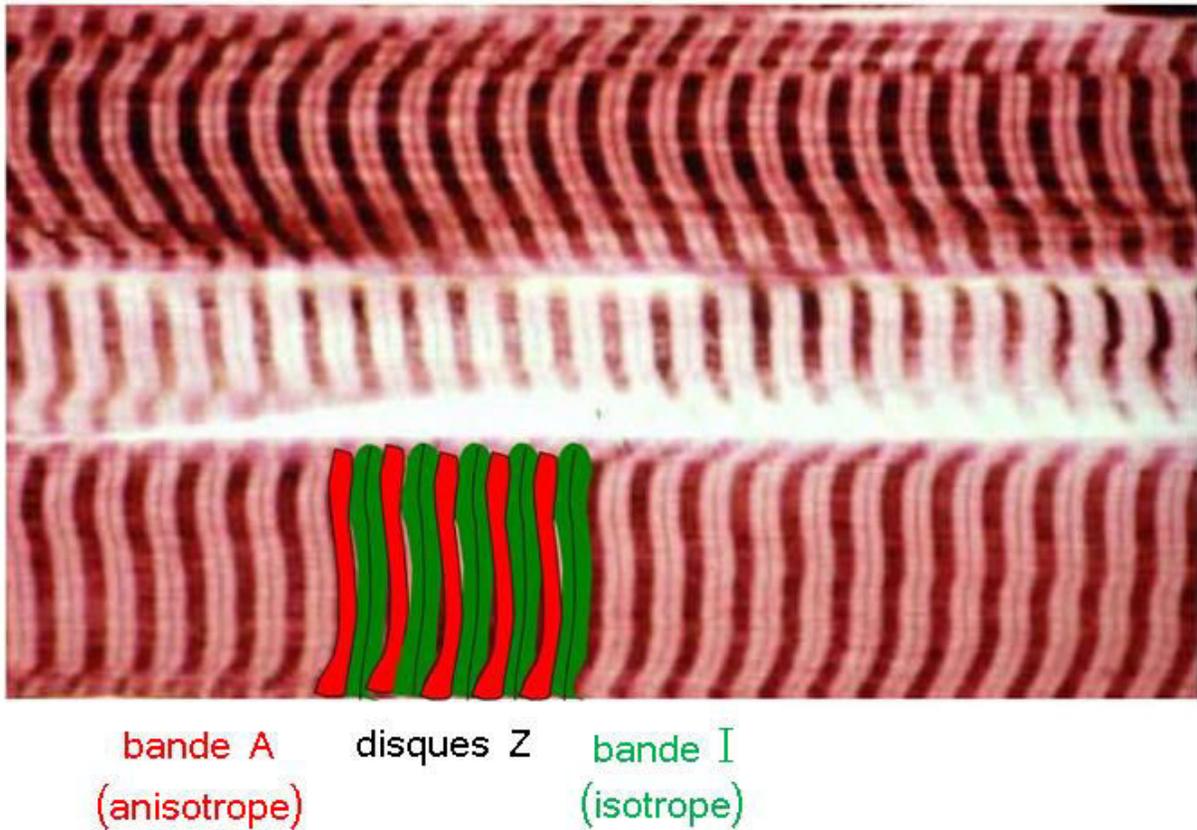


Figure 3 : Organisation des myofilaments d'actine et de myosine en formant les bandes A, I et les disques Z au niveau des fibres musculaires striées squelettiques (Krans JL., 2010).

300 molécules de myosine sont rassemblées pour former un filament épais de myosine. La myosine, quant à elle, est une protéine composée de deux parties : la tête et la queue. En plus du site de liaison à l'actine, la tête comporte un site catalytique d'hydrolyse de l'ATP, une molécule qui fournit l'énergie nécessaire au basculement des têtes de myosine et donc à la contraction musculaire (Polster A. et coll., 2016) (Rebbeck RT. et coll., 2014) (Irving M., 2017).

Les myofilaments fins sont constitués de molécules d'actine qui s'accolent par deux pour former de longues doubles hélices. Sur l'actine, il existe un complexe protéique régulateur capital pour le mécanisme de contraction, le complexe troponine-tropomyosine. Je détaillerai la structure et

les fonctions de ce dernier ultérieurement dans le chapitre excitation-contraction (Stokes K., 2006) (Rebbeck RT. et coll., 2014) (Frontera WR. et Ochala J., 2015).

La contraction des muscles squelettiques est réalisée par le glissement des filaments de myosine et d'actine les uns par rapport aux autres, ce qui conduit au raccourcissement des fibres musculaires (Dulhunty AF. et coll., 2017). Ceci fait suite à une propagation d'un potentiel d'action, qui induit une ouverture des canaux calciques du RS. Il est à noter que le potentiel d'action se propage de la plaque motrice jusqu'à la terminaison axonale, au niveau des jonctions synaptiques des synapses électriques qui se forment entre les nerfs moteurs et les fibres musculaires. Ces synapses assurent la conversion du potentiel d'action déclenché par les nerfs (présynaptiques) en un signal dans les fibres musculaires (postsynaptiques). Le calcium du RS est alors libéré, ce qui permet sa fixation sur la troponine. Cette fixation induit un changement de conformation de la tropomyosine, qui à son tour libère le site de fixation des têtes de myosine sur le myofilament d'actine. Ensuite, chaque molécule d'actine fixe une tête de myosine, et le glissement des myofilaments aura lieu avec dépense d'énergie (Frontera WR. et Ochala J., 2015) (Dulhunty AF. et coll., 2017).

En complément de ces protéines, les myofibrilles contiennent également des protéines de structure qui maintiennent l'alignement et l'extensibilité des myofibrilles (Henderson CA. et coll., 2017), comme la titine (Greaser ML. et Pleitner JM., 2014), encore connue sous le nom de nébuline (Rebbeck RT. et coll., 2014) (Dube DK. et coll., 2014).

II.1.2. Le muscle strié cardiaque

II.1.2.1 Description

Le muscle cardiaque est un muscle à caractéristiques intermédiaires, c'est un muscle strié comme le muscle squelettique, mais à contraction involontaire comme les muscles lisses.

Le muscle cardiaque est constitué de myocytes, les cardiomyocytes, qui sont des cellules de forme cylindrique formant des bifurcations à leurs extrémités qui s'accolent aux extrémités des cellules adjacentes au niveau d'une structure nommée "disque intercalaire" (Kenhub, 2017).

Ces cellules s'organisent sous forme d'un réseau tridimensionnel au niveau du myocarde. Chaque cardiomyocyte possède un noyau allongé et positionné au centre de la cellule (Fig. 1). Le

sarcoplasme des cardiomyocytes contient des striations qui sont semblables à celles observées dans les muscles squelettiques (Fig. 1) (Katz AM. et Lorell BH., 2000) (Dube DK . et coll., 2014) (Henderson CA. et coll., 2017).

II.1.2.2. Contraction et innervation

A l'inverse du muscle strié squelettique, le muscle cardiaque, est innervé par le système nerveux autonome. Ceci induit une contraction des myocytes involontaire mais aussi rythmique et automatique. En outre, les cellules cardiaques sont mononuclées, un syncytium fonctionnel se forme via les jonctions communicantes permettant la communication des cellules entre elles.

Il existe deux types d'innervation du muscle cardiaque : intrinsèque et extrinsèque. L'innervation intrinsèque est responsable de l'automatisme cardiaque et indispensable à la régulation de la contraction du myocarde (Canale ED. et coll., 1986) (Huang WA. et coll., 2017). Cette innervation est réalisée par le tissu nodal, qui est formé de plusieurs amas de cardiomyocytes regroupés en fonction de leur topographie : les nœuds sino-auriculaires, les nœuds atrio-ventriculaires, le faisceau de His et le réseau de Purkinje (Maass K. et coll., 2015) (Fukuda K. et coll., 2015) (Haissaguerre M. et coll., 2016) (Slart RHJA. et coll., 2017).

Le mécanisme de régulation des battements cardiaques est commandé par le nœud sino-auriculaire, qui génère de manière rythmique des potentiels d'action -des impulsions- qui donneront le rythme du battement cardiaque. Ce dernier est un petit nœud de tissu peu visible qui se situe au niveau de la paroi postérieure de l'oreillette droite (Nathan R., 1986). Normalement, le démarrage des impulsions est initié dans ce nœud (Waller BF. et coll., 1993) (Hill MA., 2014). L'impulsion électrique produite est de faible fréquence (au repos \cong 72 fois/minute chez l'adulte), puis elle se propage le long des couches de tissus constituant les 2 oreillettes. Lors de son passage, cette activité électrique excite les fibres musculaires, ce qui induit la contraction des oreillettes qui éjectent le sang qu'elles contiennent dans les ventricules vides. L'impulsion arrive ensuite rapidement à un autre petit nœud de tissu spécialisé, situé entre les oreillettes et les ventricules : le nœud auriculo-ventriculaire (Katz AM. et Lorell BH., 2000) (Hill MA., 2014). Ce dernier provoque un retard de l'impulsion durant \approx 0,07 seconde, le temps exact qui est nécessaire pour l'achèvement de la contraction des oreillettes (Haissaguerre M. et coll., 2016). L'impulsion est ensuite transmise aux ventricules via le faisceau de His et le réseau

de Purkinje), ce qui déclenche leur contraction. Ainsi, le courant électrique traverse les ventricules en 0,06 seconde et déclenche la contraction de l'ensemble des cellules constituant les ventricules (Katz AM. et Lorell BH., 2000) (Hill MA., 2014) (Waller BF. et coll., 1993) (Nathan R., 1986) (Haissaguerre M. et coll., 2016).

II.1.2.3. Fibres musculaires et structure du muscle cardiaque

Au niveau du muscle cardiaque, nous distinguons essentiellement deux types de cellules : les cellules myocardiques (ou cardiomyocytes) et les cellules du tissu nodal.

Les cellules myocardiques, auriculaires et ventriculaires, sont des cellules musculaires striées de 30 μm de longueur avec une structure et une composition spécifiques. La membrane plasmique de ces cellules contient des canaux ioniques Na^+ et K^+ dépendants du voltage ; la contraction de ces cellules est déclenchée par l'entrée des ions Na^+ qui induisent une dépolarisation de leur membrane. Ceci génère des potentiels d'action qui se propagent d'une cellule à l'autre et induisent la contraction des cardiomyocytes (Olivetti G. et coll., 1994) (Bergmann O. et coll., 2009).

Les cellules myocardiques sont étroitement liées entre elles par les disques intercalaires, qui sont des disques de jonction reliant les cardiomyocytes les uns aux autres. Ces disques contiennent des desmosomes et des jonctions communicantes (Fig. 4). Les desmosomes assurent la cohérence cellulaire en liant les cardiomyocytes au niveau de ce disque alors que le transfert des potentiels d'action se fait au niveau des synapses électriques par l'intermédiaire des jonctions communicantes.

Les cellules du tissu nodal qui constituent 1% des cellules cardiaques, sont des cellules musculaires striées qui ont conservé plusieurs caractéristiques du tissu myocardique embryonnaire. Ces cellules sont noyées dans le tissu de myocarde, elles sont réparties de manière inégale en deux nœuds (ou amas), d'où le nom de tissu nodal. (Quaini F. et coll., 1994) (Olivetti G. et coll., 1994) (Delmas V. et coll., 2011).

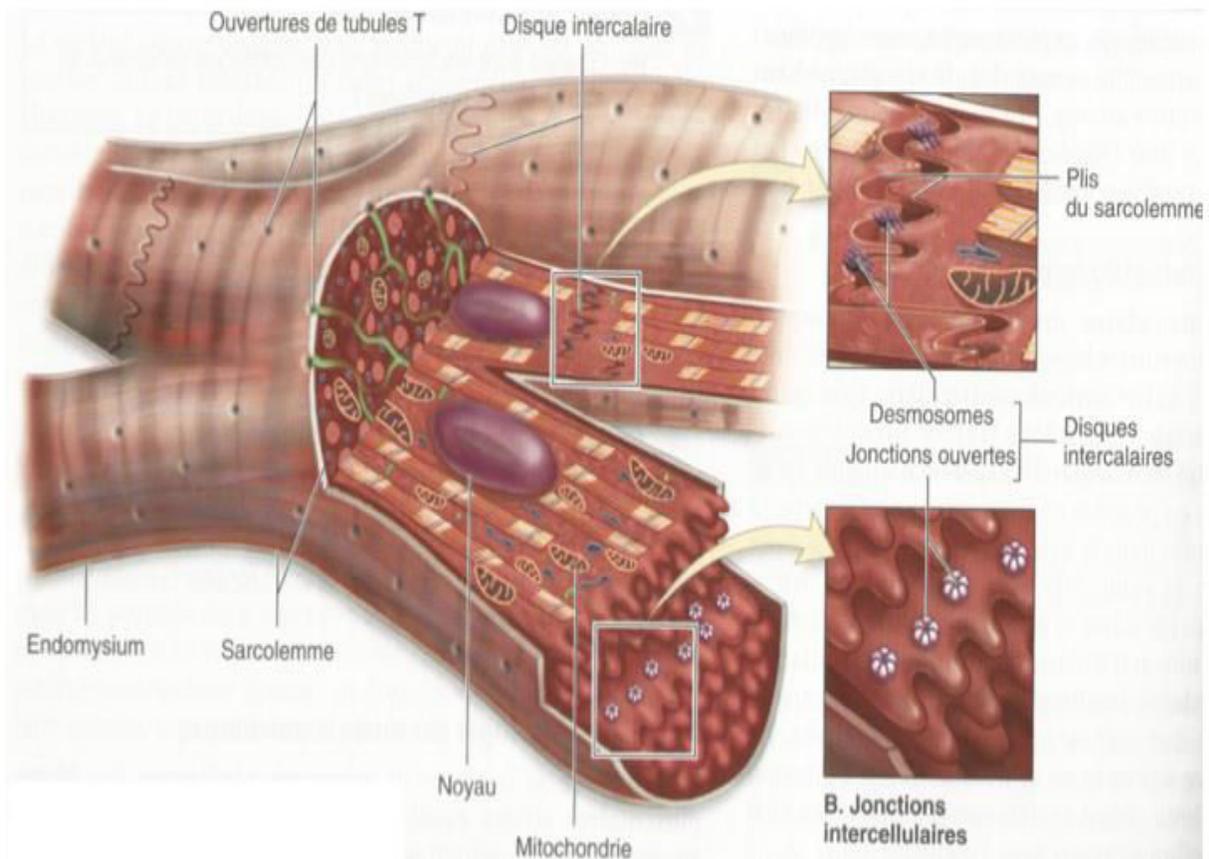


Figure 4 : Ultrastructure des myocytes cardiaques en coupe frontale, montrant les différentes structures impliquées dans le couplage excitation-contraction (Klabunde RE., 2013).

II.1.2.4. Les protéines contractiles

En systole, le potentiel d'action se propage par l'ouverture de canaux sodiques voltage-dépendants distribuant la dépolarisation aux tubules T, qui se dépolarisent et déclenchent une libération d'ions calcium du RS vers le cytosol de la fibre musculaire.

La contraction se développe lorsque le calcium se lie à la troponine C, ce qui permet l'interaction des chaînes actine-myosine. La relaxation se produit avec une réduction de la concentration du calcium cytosolique due à l'initiation du ré-pompage du calcium dans le réticulum sarcoplasmique par les pompes à calcium de la membrane du RS (Fabiato A. et Fabiato F., 1979) (Bers DM., 2002).

En outre, durant la diastole, des protéines transmembranaires de la membrane cytoplasmique participent à la restauration de l'homéostasie ionique intracellulaire des myocytes. Parmi ces protéines, nous citons : la pompe à sodium ($\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$), qui, et en utilisant l'énergie stockée sous forme d'ATP, permet l'échange des ions Na^+ provenant du milieu intracellulaire avec les ions K^+ provenant du milieu extracellulaire avec un rapport ($3 \text{ Na}^+/2 \text{ K}^+$). La pompe à calcium ($\text{Mg}^{2+}\text{-Ca}^{2+} \text{ ATPase}$), qui utilise encore l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP pour assurer l'échange des ions Mg^{2+} et Ca^{2+} du milieu intracellulaire au milieu extracellulaire selon un rapport ($1 \text{ Mg}^{2+}/1 \text{ Ca}^{2+}$). Et l'échangeur $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ qui permet aux ions Na^+ d'affluer selon leur gradient de concentration à travers la membrane plasmique en échange d'un contre transport des ions Ca^{2+} selon le rapport ($1 \text{ Mg}^{2+}/1 \text{ Ca}^{2+}$) (Klabunde RE., 2013) (Bers DM., 2002) (Eisner DA. et coll., 2017).

Plusieurs autres protéines sont impliquées dans la régulation du flux de calcium lors de la contraction/relaxation, ces protéines aussi bien que le mécanisme du couplage excitation-contraction des muscles cardiaques sera détaillé avec précision dans le chapitre excitation-contraction.

II.1.3. Le muscle lisse

II.1.3.1. Description

Les muscles lisses constituent des couches denses tapissant la paroi de nombreux organes et des vaisseaux sanguins. Ces couches sont constituées des fibres musculaires lisses, qui sont des cellules mononuclées fusiformes dont le noyau occupe une position centrale (Fig. 1) (Kao CY. et Carsten ME., 1997) (Kenhub, 2017).

Les cellules du muscle lisse ne présentent pas de stries transversales dans leur organisation, qui dépend de l'organe / tissu où elles se trouvent. Elles sont soit isolées dans le tissu conjonctif, soit regroupées sous forme de tunique musculaire (tube digestif, vaisseaux sanguins), ou regroupées en muscles (muscle érecteur du poil) (Berridge BR. et coll., 2013) (Van Vleet JF. et coll., 2002). En général, les fibres des tuniques musculaires lisses se regroupent en faisceaux pour former deux couches superposées : une couche d'orientation circonférentielle et une autre d'orientation longitudinale par rapport à l'axe de l'organe (Van Vleet JF. et coll., 2002) (Kenhub, 2017).

II.1.3.2. Contraction et innervation

Les muscles lisses sont sous le contrôle du système neurovégétatif autonome. Ils peuvent se contracter d'une façon rythmique avec des contractions et relaxations rapides, ou d'une façon tonique (graduée) avec une contraction lente et soutenue. Ainsi, il existe deux types de muscles lisses : le tissu musculaire lisse unitaire et le tissu musculaire lisse multi-unitaire. Le muscle lisse unitaire est constitué de cellules musculaires fonctionnellement reliées entre elles par des jonctions communicantes permettant de propager le signal électrique d'une cellule à l'autre, fonctionnant comme une seule et même unité appelé syncytium. En revanche, le muscle lisse multi-unitaire est constitué de cellules musculaires distinctes, séparées les unes des autres par de glycoprotéines et de collagène. Chaque cellule est innervée par une seule extrémité nerveuse, et peut se contracter indépendamment des autres cellules.

Un exemple des muscles lisses unitaires, les muscles viscéraux, qui sont constitués de cellules qui se contractent (en général) d'une façon rythmique en harmonie les unes avec les autres (Fig. 5). On constate un couplage électrique entre ces cellules musculaires lisses, grâce à la présence de jonctions communicantes (gap junctions). Par définition, le couplage électrique est un phénomène par lequel un signal est transmis électriquement entre deux cellules par l'intermédiaire d'une jonction communicante (Klabunde RE., 2013) (Itoh T. et coll., 1981) (Taggart MJ., 2001) (Du W. et coll., 2006).

Les muscles de l'iris de l'œil, sont un exemple des muscles lisses multi-unitaires (Fig. 5), dont les cellules se contractent d'une façon graduée en réponse à une stimulation nerveuse. Contrairement aux muscles viscéraux, ces muscles sont capables de produire des mouvements fins car ils sont constitués des fibres musculaires indépendantes les unes des autres, et particulièrement riches en terminaisons nerveuses, dont chacune est à l'origine d'une unité motrice comportant un certain nombre de fibres musculaires. Dans ces muscles, les jonctions communicantes sont rares par rapport à celles des muscles lisses unitaires, et les dépolarisations sont spontanées et synchrones (Moreland RS., 1991) (Pollock JD. et Makaryus AN., 2017) (Du W. et coll., 2006).

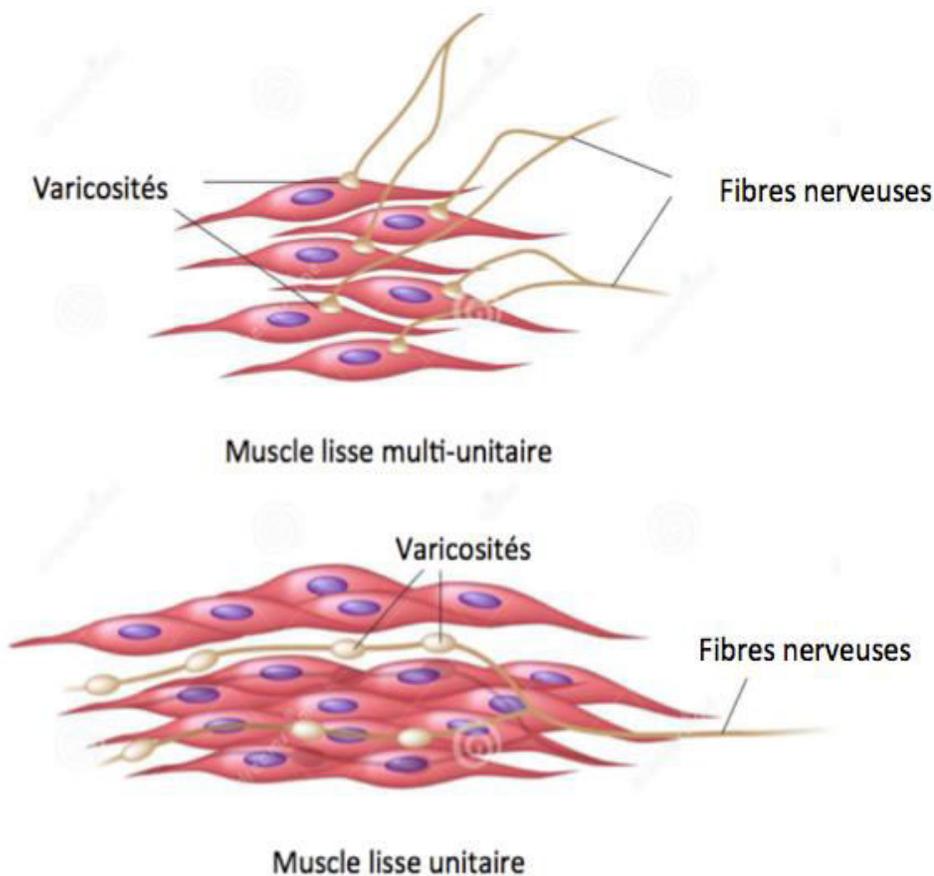


Figure 5 : Image montrant l'organisation et l'innervation des cellules musculaires lisses (Wang H. et coll., 2015).

II.1.3.3. Ultrastructure et fonctions

Les muscles lisses sont présents dans plusieurs organes du corps humain, ce qui leur permet de jouer un rôle primordial dans divers processus physiologiques. Nous trouvons les muscles lisses dans la trachée, l'intestin, les sphincters, la vessie, les bronches, l'estomac, le larynx, l'utérus et les vaisseaux sanguins. Ces organes sont généralement des organes creux viscéraux ou vasculaires ayant la capacité de se contracter pour s'adapter à leur contenu (par exemple le sang, l'urine, etc.,...) et le propulser plus en avant. Dans ces organes, le muscle lisse joue un rôle essentiel dans : la pression artérielle, le péristaltisme, l'expulsion du nouveau-né au cours de l'accouchement, la parturition, la miction (Fattoum A., 1997) (Webb RC., 2003). Les cellules musculaires lisses (CML) sont peu différenciées, fusiformes avec des extrémités pointues et parfois bifides. Elles sont orientées d'une manière parallèle les unes aux autres avec des tailles très variables en fonction de l'organe où elles se trouvent. Ainsi, les cellules musculaires lisses

de la paroi utérine sont 30 fois plus longues que celles des capillaires sanguins, mais toujours plus courtes que les cellules musculaires striées qui peuvent atteindre jusqu'à plusieurs centimètres de long. Les CML sont associées entre elles grâce à un tissu conjonctif constitué essentiellement de collagène et d'élastine (Webb RC., 2003) (Brozovich FV. et coll., 2016).

II.1.3.4 Les protéines contractiles

Entre les jonctions communicantes, le sarcolemme des CML est divisé en deux domaines distincts : le premier correspond à des plaques d'adhérence et le deuxième est appelé le domaine cavéolaire. Les plaques adhérentes (ou corps denses) sont des structures dynamiques responsables de la motilité cellulaire, d'où leur similarité avec les stries Z du sarcomère du muscle squelettique (Fattoum A., 1997) (Walsh MP., 1989). Ces plaques sont impliquées dans l'accrochage des filaments d'actine de chaque CML aux molécules de la matrice extracellulaire de la cellule adjacente. C'est à leur niveau que l'on trouve plusieurs protéines telles que la desmine : qui assure la stabilité structurale des CML lors de la contraction musculaire, l' α -actinine : une protéine de réticulation dont la fonction est lier deux myofilament d'actine entre eux, et les intégrines dont la fonction essentielle est l'attachement des CML à la matrice extracellulaire (Walsh MP., 1989) (Fattoum A., 1997).

Le deuxième domaine est le domaine cavéolaire qui, comme son nom l'indique, est riche en invaginations vésiculaires (ou cavéoles) et correspond aux zones localisées entre les plaques adhérentes (North AJ. et coll., 1994).

Plusieurs protéines sont trouvées dans ce domaine : des protéines constitutives dont la principale est la cavéoline, qui forme un enveloppe permanent de la membrane plasmique, et qui n'est libérée que lorsque cette dernière est détruite (Mabuchi K. et coll., 1996). Autres protéines fonctionnelles comme les récepteurs membranaires (e.g. les récepteurs à l'acétylcholine) et les canaux ioniques (les canaux calcium et les canaux potassium) sont également trouvées au niveau de ce domaine (Walsh MP., 1989) (Small JV. et coll., 1992).

Nous allons présenter, dans la suite de cette introduction bibliographique, le système vasculaire, ses constituants, leurs structures, leurs fonctions, pour finir par la présentation du mécanisme du couplage excitation-contraction, ainsi que les différents modes de fonctionnement des protéines contractiles qui nous permet de distinguer la contraction des muscles lisses vasculaires de celle des muscles squelettiques.

II.2. Le système vasculaire

II.2.1 Généralités

Le système vasculaire du corps humain est constitué d'un grand nombre de vaisseaux qui jouent un rôle essentiel dans la circulation du sang dans l'ensemble de l'organisme. C'est à travers ce vaste réseau de vaisseaux que la fonction cellulaire (croissance et développement de toutes les cellules de l'organisme), l'absorption des nutriments essentiels (tels que les vitamines et minéraux) et l'élimination des déchets cellulaires et métaboliques (l'homéostasie cellulaire) est maintenue.

Les vaisseaux présentent certaines homologues de structure et de composition cellulaire nécessaires pour accomplir leurs rôles physiologiques. Ainsi on trouve qu'ils contiennent des cellules endothéliales, des CMLV, des fibres élastiques et de collagène et des tissus conjonctifs. La distribution de tous ces composants, à l'exception des cellules endothéliales, est très variable selon les territoires vasculaires. Ainsi on trouve que la présence et l'organisation des fibres élastiques aussi bien que des CMLV changent selon la fonction des vaisseaux (les artères élastiques conduisent les grands volumes de sang à haute pression alors que les artères musculaires conduisent de faibles volumes de sang à plus faibles pressions). Tous les vaisseaux, quels que soient leurs diamètres, contiennent une seule couche de cellules endothéliales, qui sont en contact direct avec le sang circulant et ses constituants : cellules, hormones, métabolites, etc. ...). La structure de cette couche est toujours identique quel que soit le territoire vasculaire et sa fonction (artères élastiques ou musculaires) (Lacolley P. et coll., 2017) (Tucker WD. et coll., 2017).

La circulation sanguine est assurée par ce réseau de vaisseaux, qui avec le cœur constituent le système cardiovasculaire. Nous distinguons trois grandes catégories de vaisseaux sanguins : les artères, les veines, les capillaires. Les artères sont des vaisseaux sanguins de calibre large qui transportent le sang du cœur vers les tissus et les cellules de l'organisme. Les veines sont les vaisseaux qui ramènent le sang vers le cœur. Les capillaires sont des vaisseaux de très petits calibres qui relient les artères et les veines au niveau des tissus de l'organisme. Ils sont les seuls

vaisseaux au contact direct avec les cellules ce qui leur permettent d'assurer les échanges entre le sang et le liquide interstitiel baignant dans les cellules (Aggarwal S. et coll., 2011) (Klabunde RE., 2013).

II.2.2. Structure

Les vaisseaux sanguins forment un circuit fermé assurant la circulation du sang dans l'organisme. Ce circuit est le système vasculaire, partageant une organisation histologique qui sera ici brièvement présentée.

La paroi de la plupart des vaisseaux sanguins est constituée de trois couches -ou tuniques- histologiquement distinctes (Tennant M. et McGeachie JK., 1990) (Aggarwal S. et coll., 2011) (Tucker WD. et coll., 2017). Anatomiquement, depuis la lumière du vaisseau sanguin jusqu'à sa surface l'extérieure, ces régions sont appelées : intima, média et adventice (Fig. 6) (Hanke H. et coll., 1990) (Fukuda D. et Aikawa M., 2010). La variabilité des types cellulaires constituant chacune de ces couches, est déterminée dans des stades précoces du développement et elle est fondée sur la fonction physiologique que le vaisseau va avoir dans un organe ou dans un tissu (Proudfoot D. et coll., 2001) (Mulvany MJ. et Halpern W., 1967).

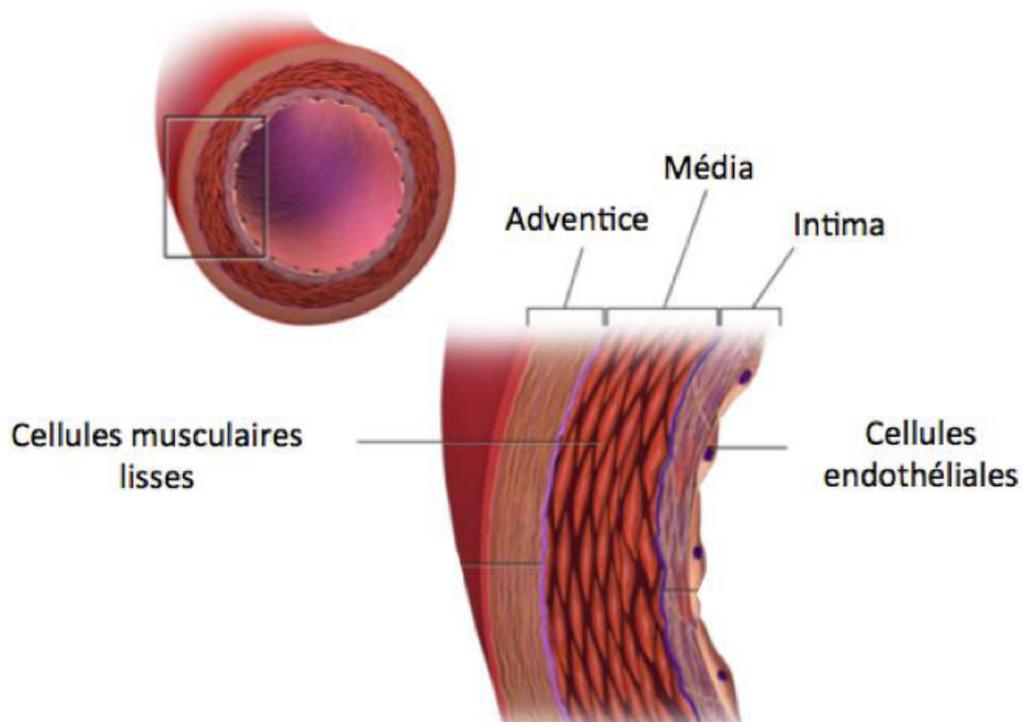


Figure 6 : Coupe transversale d'une artère montrant les 3 tuniques : intima, média et adventice (Blausen S. et coll., 2014).

II.2.2.1. L'intima

La tunique interne aussi nommée *intima*, est habituellement la couche la plus mince des constituants d'un vaisseau, elle se compose d'une seule couche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale (ou lame basale) (Fig. 6 et 7). En dessous de cette membrane, il existe une couche de tissu sous-endothélial, comportant de la matrice extracellulaire, éventuellement des CML ou -dans les capillaires- des péricytes, et terminée par une lame de fibres élastiques nommée limitante élastique interne, formant la limite entre l'intima et la média (Fig. 7) (Díaz-Flores L. et coll., 2009) (Bergers G. et coll., 2005). Les péricytes sont des cellules mésenchymateuses qui entourent les cellules de l'endothélium (Sims DE., 1986) (Proudfoot D. et coll., 2001). Ce sont des cellules souches multipotentes qui sont capables de se différencier en plusieurs types de cellules, tels que les fibroblastes, les ostéoblastes et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) (Hirschi KK. et D'Amore PA., 1996) (Fukuda D. et Aikawa M., 2010) (Proudfoot D. et coll., 2001).

Intégrés dans la membrane basale, les péricytes communiquent directement avec les cellules endothéliales des petits vaisseaux sanguins, par contact physique et une signalisation paracrine. Ceci leur permet de stabiliser et de contrôler la maturation des cellules endothéliales. Ils présentent également une capacité de contraction ; ceci suggère que ces cellules contiennent des protéines contractiles, actine et myosine (Kelley C. et coll., 1987) (Bergers G. et coll., 2005) (Ahmed TA. et El –Badri N., 2017).

La fonction la plus évidente des cellules endothéliales, est de contenir le sang à l'intérieur des vaisseaux sanguins en l'empêchant de fuir hors du vaisseau ; le contact direct de ces cellules avec le sang suggère un rôle critique de leur part dans tous les aspects de l'homéostasie tissulaire - autorisant les échanges métaboliques et gazeux entre le sang et les tissus (Michiels C., 2003) (Lijnen HR. et coll., 2007). Les cellules endothéliales régulent le tonus vasculaire par une interaction avec les composants du système nerveux périphérique et sont impliquées dans la thromolyse et les processus de coagulation. En effet, la cellule endothéliale exprime au niveau de sa membrane une molécule, la thrombomoduline, qui inhibe la formation de thrombine (Rajendran P. et coll., 2013). De plus, elle synthétise et libère dans le plasma des facteurs de coagulation et de la prostacycline (PGI₂) qui est à la fois un inhibiteur puissant de l'agrégation plaquettaire, un vasodilatateur et un agent anti-thrombotique (Ando J. et Kamiya A., 1993). Les cellules endothéliales ont une perméabilité sélective aux molécules circulantes afin de contrôler leur accès aux CMLV, ce qui leur permet donc de contrôler la fonction de ces dernières (Rizzo V., 1995) (Ando J. et Kamiya A., 1993) (Rajendran P. et coll., 2013). En outre, elles constituent une barrière ayant pour fonction d'éviter le déclenchement d'une réponse inflammatoire en évitant la pénétration des médiateurs moléculaires et cellulaires de l'inflammation dans la paroi des vaisseaux, tels que : l'histamine, les cytokines et les chimiokines (Pate M. et coll., 2010).

II.2.2.2. La média

La média aussi nommée *tunica media*, constitue la couche moyenne de la paroi des vaisseaux, elle est généralement la couche la plus épaisse dans les artères (Fig. 6 et 7).

Le média est composée de CMLV arrangées sous forme circonférentielle, enchâssées dans un tissu conjonctif composé de fibres élastiques, composées principalement d'élastine, et de collagène. Ces couches cellulaires et de fibres élastiques ont tendance à être plus organisées dans les grosses artères, où une alternance de couches de cellules et de lames élastiques est observée

(Dartsch PC. et coll., 1990). Une dernière couche vient compléter l'organisation de cette partie du vaisseau sanguin, c'est la lame élastique externe (ou limitante élastique externe), formant la limite entre le média et l'adventice, qui fournit un support de la couche média, particulièrement au niveau des artères musculaires, en récompensant le manque des fibres élastiques (Proudfoot D. et coll., 2001) (Hanke H. et coll., 1990).

La contraction et la relaxation des muscles lisses contrôlent le diamètre de la lumière des vaisseaux. Ainsi, la contraction des CMLV induit une vasoconstriction, ce qui diminue l'écoulement sanguin et fait augmenter la pression sanguine en réduisant la lumière des artères.

De la même manière, le relâchement des CMLV induit une vasodilatation, ce qui augmente l'écoulement du sang et abaisse la pression sanguine (Mulvany MJ. et Halpern W., 1967) (Dartsch PC. et coll., 1990) (Proudfoot D. et coll., 2001).

II.2.2.3. L'adventice

La couche externe, aussi nommée *tunica externa* (ou tunica adventitia ou adventice), est presque entièrement composée de tissu conjonctif riche en collagènes et de fibroblastes (Fig. 6 et 7). Des nerfs et des vaisseaux lymphatiques sont à la fois observés dans l'adventice des plus gros vaisseaux sanguins avec les *vasa vasorum* (Fig. 7) (Mulligan-Kehoe MJ. et Simons M., 2014) (Williams JK. et Heistad DD., 1996). Dans les gros vaisseaux sanguins, une simple diffusion des nutriments et de l'oxygène nécessaire aux cellules vasculaires à travers la paroi du vaisseau est limitée, du fait de son épaisseur. Les *vasa vasorum* se développent donc dans l'adventice (et parfois dans la partie la plus externe de la média), comme un réseau de petits vaisseaux sanguins à paroi fine qui fournissent les cellules des grosses artères et veines en nutriments et en oxygène (Tennant M. et McGeachie JK., 1990) (Ritman EL. et Lerman A., 2007) (Mulligan-Kehoe MJ. et Simons M., 2014).

Après description du système vasculaire et de sa structure, nous allons distinguer les différents types de vaisseaux sanguins en fonction de leur structure et fonctions.

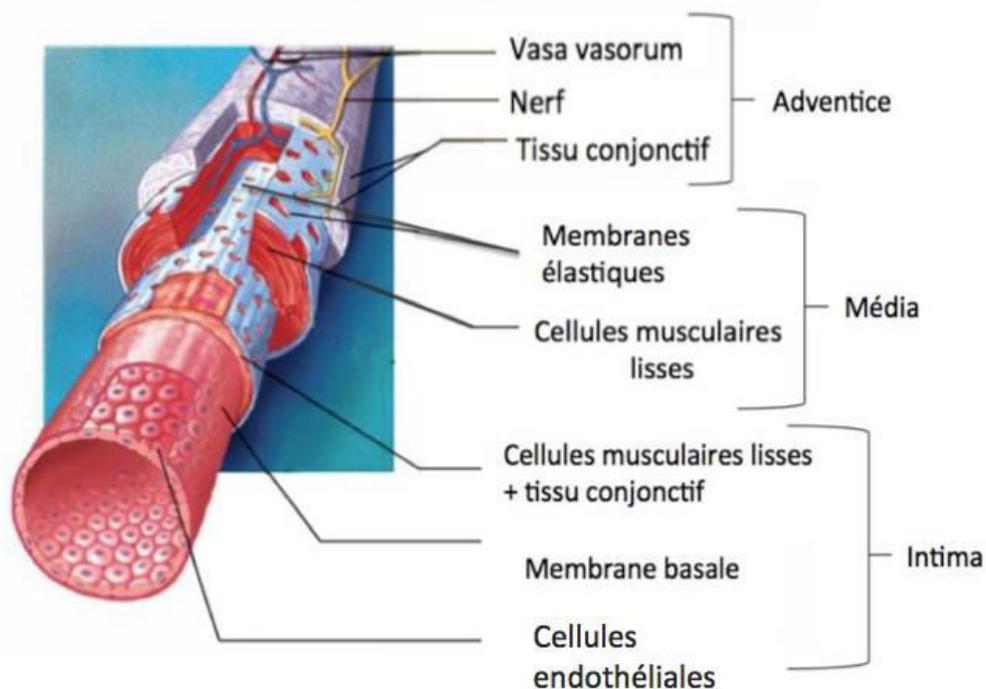


Figure 7 : Schéma montrant les différents composants des trois couches (intima, média, adventice) constituant les vaisseaux sanguins (Klabunde RE., 2013).

II.2.3. Les composants artériels et veineux du système vasculaire

La circulation sanguine se répartit entre deux circuits, tous les deux commençant et se terminant au niveau du cœur : la circulation pulmonaire et la circulation systémique. La circulation pulmonaire est celle qui débute du ventricule droit où l'artère pulmonaire ramène le sang désoxygéné provenant des différents organes aux poumons pour y être oxygéné. La circulation systémique, qui sera détaillée dans ce qui suit, est celle qui permet la distribution du sang oxygéné revenant des poumons vers les autres organes. Le sang oxygéné est ainsi éjecté du ventricule gauche du cœur dans un grand réseau d'artères. Les artères, selon leur fonction, leur localisation anatomique et leurs différences histologiques, peuvent être classées en deux différents types : les artères élastiques et les artères musculaires (Tennant M. et McGeachie JK., 1990).

II.2.3.1. Les artères élastiques (ou conductrices)

Les artères élastiques sont présentes près du cœur (Fig. 8). Elles sont donc associées au mouvement de grands volumes de sang. Elles amortissent la pression et le flux pulsatiles cardiaques, afin de limiter les variations de débit, de pression et les forces de cisaillement distales, et afin de permettre une irrigation plus régulière des organes (Faury G., 2001). La média de ce type d'artères, comme l'aorte par exemple, est riche en lames élastiques concentriques. Ce qui leur permet d'accumuler l'énergie de la pression systolique (pression forte) et en restituer en partie durant la phase diastolique (pression faible). Pour cela, les parois artérielles contiennent des réseaux de protéines élastiques adaptés à chaque situation (pression sanguine forte ou faible), qui confèrent aux artères une propriété d'élasticité non-linéaire (Faury G., 2001) (Leloup AJA. et coll., 2015).

Cette fonction de lissage de la pression et du flux sanguin par les artères élastiques est connue par l'effet Wind Kessel : elles atténuent effectivement les grandes oscillations du flux sanguin et assurent aux plus petits vaisseaux sanguins, localisés distant dans l'arbre vasculaire artériel, un flux sanguin plus doux et homogène (Lannoy M. et coll., 2014).

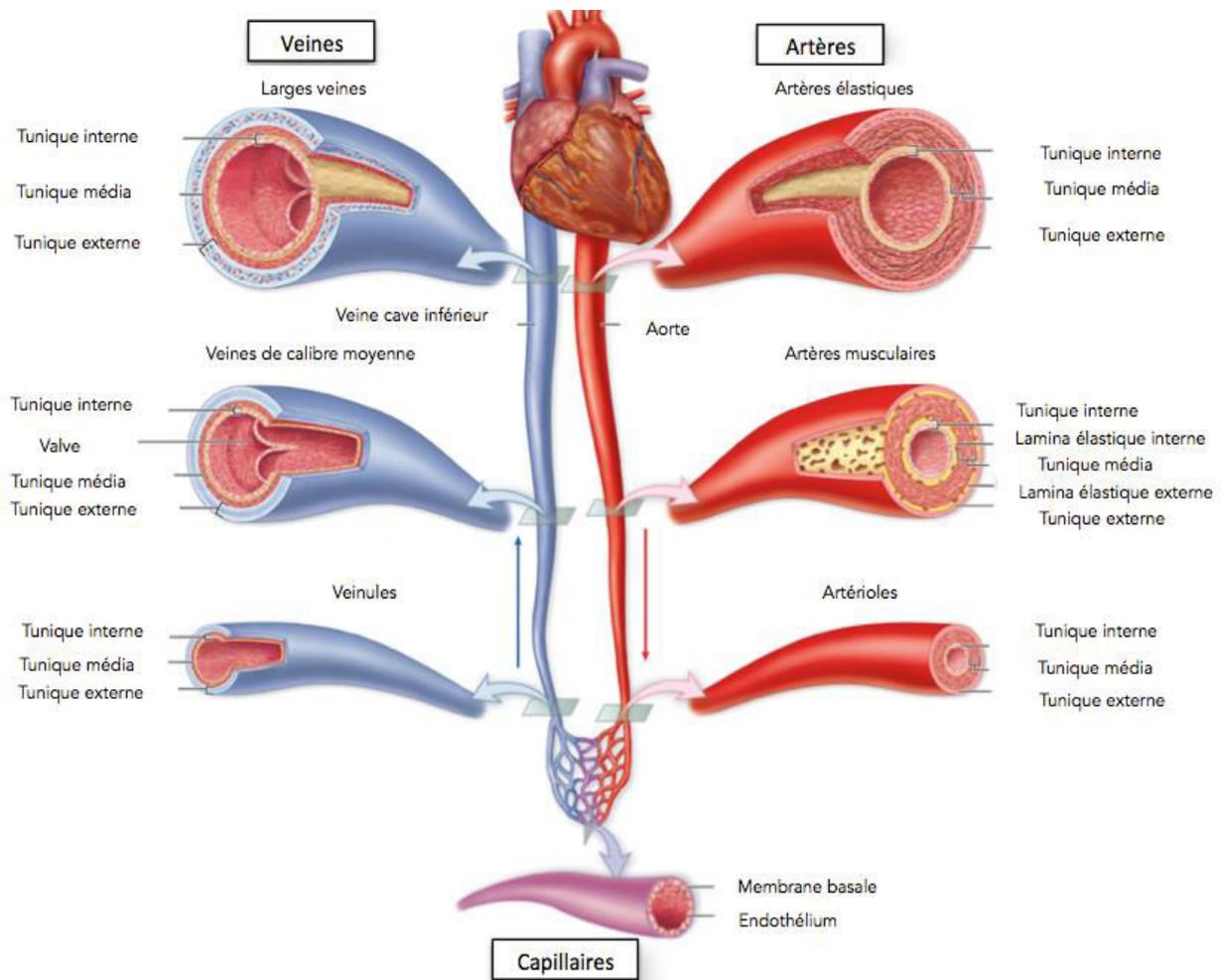


Figure 8 : Présentation simplifiée du système cardiovasculaire avec les différents types des vaisseaux sanguins élastiques et musculaires (Reisner HM., 2015).

II.2.3.2. Les artères musculaires

Généralement de moyen calibre, ces artères sont les ramifications des artères élastiques (Fig. 8). La plupart des artères musculaires sont des artères des membres et des viscères : leur intima est fine et l'épaisseur de leur média est dépendante de leur calibre. La fonction des artères musculaires est de répartir la distribution du sang vers les différents organes et tissus en fonction de l'évolution des besoins de chacun d'entre eux au cours du temps. Alors que les parois de ces artères sont principalement constituées de muscles lisses, des études histologiques montrent que ces artères contiennent aussi des fibres élastiques discontinues dans la média (Pugsley MK. et Tabrizchi R., 2000) (Leloup AJA. et coll., 2015).

II.2.3.2.1. Les artérioles

Les bifurcations successives des artères provoquent l'écoulement du sang dans les plus petits vaisseaux sanguins de l'arbre artériel. Ces bifurcations aboutissent aux artérioles, qui sont les branches artérielles les plus petites avec un très petit calibre (entre 50 et 300 μm). La paroi des artérioles est mince avec une limitante élastique interne très fine et discontinue, leur média ne comporte qu'une à trois couches de cellules musculaires lisses. La lumière restreinte des artérioles implique une réduction du flux sanguin, qui est nécessaire pour éviter l'endommagement des capillaires qui sont des vaisseaux fragiles et qui relie l'arbre artériel au système veineux (Cummings B., 2000).

Le réseau capillaire constitue le système de transition entre les deux systèmes vasculaires artériels et veineux (PubMed Health NCBI., 2017).

II.2.3.3. Les veines

Le retour du sang vers le cœur par le système veineux commence par son passage dans les veinules post-capillaires, qui fusionnent pour former de plus grandes veines. La transition d'un capillaire à une veine est marquée par la réapparition progressive des cellules musculaires lisses au niveau de la tunique média de la paroi vasculaire et une couche de collagène et de fibres élastiques au niveau de la tunique externe (l'adventice). La taille des veines varie entre 1 et 30 mm de diamètre chez l'Homme, et certaines veines telles que celles situées dans les membres inférieurs du corps contiennent des valves unidirectionnelles qui empêchent le reflux sanguin (Klabunde RE., 2013) (PubMed Health NCBI, 2017).

Par comparaison aux grosses veines, les petites veines et les veines moyennes possèdent une plus grande quantité de cellules musculaires lisses dans la média de leur paroi. A l'inverse, les grosses veines ont une plus importante quantité de tissu conjonctif dans leur média (Pappano AJ. et Gil Wier W., 2013).

Dans les parties précédentes, nous avons présenté le système vasculaire, ses constituants ainsi que les différents types de vaisseaux sanguins et leur structure. Nous allons maintenant nous intéresser au composant commun des différents types de vaisseaux : les cellules musculaires lisses vasculaires qui jouent un rôle majeur dans le maintien et la régulation du tonus musculaire.

II.2.4. Les cellules musculaires lisses

Les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV), jouent un rôle majeur dans la contraction des vaisseaux sanguins. La contraction de ces cellules est induite par des stimuli extérieurs comme la pression, le système nerveux, les molécules circulantes, et les molécules sécrétées par l'endothélium.

II.2.4.1. Histologie

Les CMLV sont des cellules en forme de fuseaux allongés avec une épaisseur de 3 à 10 μm et une longueur de 20 à 200 μm . Le noyau de ces cellules est situé au centre et prend une forme de cigare lors de la contraction. La chromatine est finement granulaire et le noyau contient 2-5 nucléoles (Kierszenbaum AL., 2006) (Coujard R. et coll., 1980). Le réticulum endoplasmique lisse (REL) se trouve à proximité de la face cytoplasmique de la membrane plasmique. La plupart des organites ont tendance à s'accumuler dans les régions cytoplasmiques autour des pôles du noyau. La membrane plasmique, le cytoplasme et le REL des cellules musculaires sont souvent appelés respectivement, sarcolemmes, sarcoplasme et réticulum sarcoplasmique (Brenner B. et coll., 1987) (Klabunde RE., 2013). Pendant la contraction, la force de traction générée par les cellules individuelles des muscles lisses est transférée vers le tissu conjonctif environnant par la gaine des fibres réticulaires. Ces fibres font partie d'une lame basale qui entoure les cellules musculaires de tous les types musculaires. Les CMLV peuvent rester en état de contraction pendant de longues périodes. La contraction est généralement lente et peut nécessiter quelques minutes pour se mettre en place (Pollack GH., 1995).

II.2.4.2. Rôle des CMLV dans la structure et la fonction des vaisseaux

Les CMLV entraînent directement la contraction de la paroi vasculaire et contrôlent donc la taille de la lumière des vaisseaux sanguins (Brozovich FV. et coll., 2016). Elles permettent le maintien d'une pression sanguine convenable dans les vaisseaux sanguins en contrôlant leur diamètre luminal, en se contractant et en se relâchant.

Les CMLV sont responsables, non seulement de la régulation du diamètre vasculaire à court terme, mais aussi de l'adaptation de ce diamètre à long terme, via le remodelage structural. En effet, une partie de ces cellules sera endommagée suite aux flux sanguins systoliques répétitifs, ce qui les rend susceptibles à subir l'apoptose après la réduction du débit sanguin. Ces CMLV apoptotiques libèrent de facteurs qui favorisent la prolifération, la migration, la synthèse de la matrice des CMLV et la prolifération des cellules endothéliales, ce qui entraîne la formation d'une nouvelle intima et la réparation des artères. Ces événements de signalisation peuvent remodeler la paroi du vaisseau pour leur donner une nouvelle taille après des changements durables du flux sanguin (Haixiang Y. et coll., 2011) (Webb RC., 2003).

Donc, la contractilité et le remodelage des vaisseaux sont régulés par les CMLV. Après avoir présenté les CMLV, leur histologie et leur rôle dans la structure et la fonction des vaisseaux, nous allons expliquer dans le chapitre suivant, le mécanisme du couplage excitation-contraction dans les muscles lisses et striés.

II.2.5. Différences entre la contraction des muscles lisses et des muscles striés

Le couplage excitation-contraction est, par définition, un mécanisme qui assure la conversion d'un signal électrique se propageant tout au long de la membrane plasmique d'une fibre musculaire en un événement mécanique qui se traduit par la contraction musculaire. Le réticulum sarcoplasmique (RS) joue un rôle essentiel dans ce phénomène en contrôlant l'homéostasie, le stockage, la libération, et la recapture du calcium intracellulaire, ce dernier étant responsable de la contraction et de la relaxation de la fibre musculaire (Pollack GH.,1995) (Squire JM., 2010).

Ce contrôle calcique implique un large spectre de récepteurs, canaux, et pompes à calcium au niveau de la membrane plasmique ainsi qu'au niveau du RS.

Comme déjà détaillé précédemment, la contraction musculaire exige l'activité de plusieurs protéines effectrices. Ces protéines diffèrent selon le type de fibre musculaire (Krans JL., 2010) (Brenner B. et coll., 1987). Ainsi au niveau du muscle strié squelettique, les protéines essentielles dans la contraction sont la myosine et l'actine qui produisent le mouvement. Cette contraction est déclenchée et régulée par le complexe tropomyosine-troponine. La tropomyosine est la protéine commune entre les muscles striés squelettiques et les muscles lisses, en revanche

la troponine est remplacée par la calmoduline dans le cas du muscle lisse (Rall JA., 2014) (Klabunde RE., 2013).

La fonction de ces protéines dans le couplage excitation-contraction sera expliquée dans les parties qui suivent, où nous détaillons les mécanismes de couplage excitation-contraction dans les différents types de fibres musculaires. Ainsi, nous décrirons les protéines impliquées dans ce phénomène à travers la présentation des récepteurs, canaux et pompes calciques impliquées dans l'homéostasie calcique indispensable pour la contraction musculaire.

II.2.5.1. Couplage excitation-contraction dans les muscles lisses

Comme dans tout autre tissu musculaire, le phénomène moléculaire de la contraction des muscles lisses dépend principalement de la présence de myosine, d'actine, et d'ATP. Cette contraction est déclenchée et régulée par le calcium. La libération massive du calcium sous sa forme ionique (Ca^{2+}) vers le cytosol et les fibres d'actine et de myosine a deux origines :

- 1- le calcium d'origine intracellulaire, provenant du réticulum sarcoplasmique (RS) via les canaux récepteurs calciques de la membrane du RE.
- 2- le calcium d'origine extracellulaire, provenant de l'espace extracellulaire via un flux au travers des canaux calciques voltage / ligand dépendants de la membrane plasmique (Klabunde RE., 2013).

La contraction du muscle lisse dépend de la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine. Cette phosphorylation est réalisée par une enzyme spécifique de 20 kDa, la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK), et la déphosphorylation de la chaîne légère de la myosine est réalisée par une autre enzyme spécifique, la phosphatase de la chaîne légère de myosine (MLCP) (Fig. 8) (Horowitz A. et coll., 1996) (Somlyo AP. et coll., 1994) (Fattoum A., 1997). La MLCK déclenche ainsi l'activité de la myosine-ATPase (Gao Y. et coll., 2001), une enzyme qui catalyse la réaction d'hydrolyse de l'ATP en ADP pour fournir l'énergie nécessaire à la contraction des chaînes actine-myosine (Murphy CT., 1999).

Le calcium, suite à une augmentation transitoire de sa concentration dans le cytosol, s'associe à la calmoduline (CaM) et l'active grâce à un site de liaison au calcium (Fig. 9) (calcium-binding protein) (Berridge BR. et coll., 2013). Cette liaison est à l'origine d'un complexe calcium-

calmoduline, qui active la MLCK en formant un complexe quaternaire actif $4 (Ca^{2+}-CaM-MLCK)$ (Fig. 9). La MLCK hydrolyse l'ATP et phosphoryle une des deux chaînes légères de chaque tête de myosine. Ceci dévoile le site de liaison de l'actine au niveau de la tête de myosine. La liaison actine-myosine induit la contraction des cellules musculaires lisses (Fig. 9) en induisant un glissement des myofilaments fins sur les myofilaments épais (Gao Y. et coll., 2001) (Fattoum A., 1997).

De la même manière, une autre protéine qui se lie à l'actine, la caldesmone, participe à la régulation de la contraction des muscles lisses en s'associant à des filaments fins d'actine. La caldesmone va se lier avec la calmoduline quand elle transporte les ions calcium (Christopher WJ. et coll., 1987) (Berridge BR. et coll., 2013). Dans une certaine mesure, la caldesmone et la calmoduline semblent mimer la fonction de la troponine dans les muscles squelettiques. Le re-pompage du Ca^{2+} par les pompes ATPases-calcium dépendantes, est à l'origine de l'inactivation de la MLCK et de l'activation de la MLCP. La MLCP déphosphoryle la chaîne légère de la myosine et induit la relaxation suite à une dissociation des ponts actine-myosine (Fig. 9) (Brenner B. et coll., 1987) (Webb RC., 2003) (Fattoum A., 1997). Comme dans les muscles striés, l'évènement déclenchant la contraction des muscles lisses est l'augmentation de la concentration calcique intracellulaire. Mais la contraction des muscles lisses est lente par rapport à celle observée dans les muscles striés (Guerrero-Hernández A. et coll., 2002). Une des raisons expliquant la réponse mécanique lente des muscles lisses, est le fait que l'activité de la myosine-ATPase est beaucoup plus faible dans les muscles lisses. Ceci peut être aussi lié à l'organisation de la CMLV où, au contraire des muscles squelettiques, l'absence des sarcomères semble ralentir la vitesse de glissement des filaments fins sur les filaments épais et donc le raccourcissement des myofilaments est plus lent. De même, la relaxation du muscle lisse est plus lente que celle du muscle squelettique. Ceci est dû au fait que le détecteur de Ca^{2+} dans les muscles lisses, la calmoduline (l'équivalent de la troponine dans les muscles squelettiques), ne fait pas partie des myofilaments comme c'est le cas de la troponine dans les muscles squelettiques. Ceci exige plus de temps pour que la dissociation des Ca^{2+} des complexes calcium-calmoduline soit accomplie, ce qui ralentit par conséquence l'élimination du calcium du milieu intracellulaire et maintient donc la contraction plus longtemps (Webb RC., 2003) (Guerrero-Hernández A. et coll., 2002).

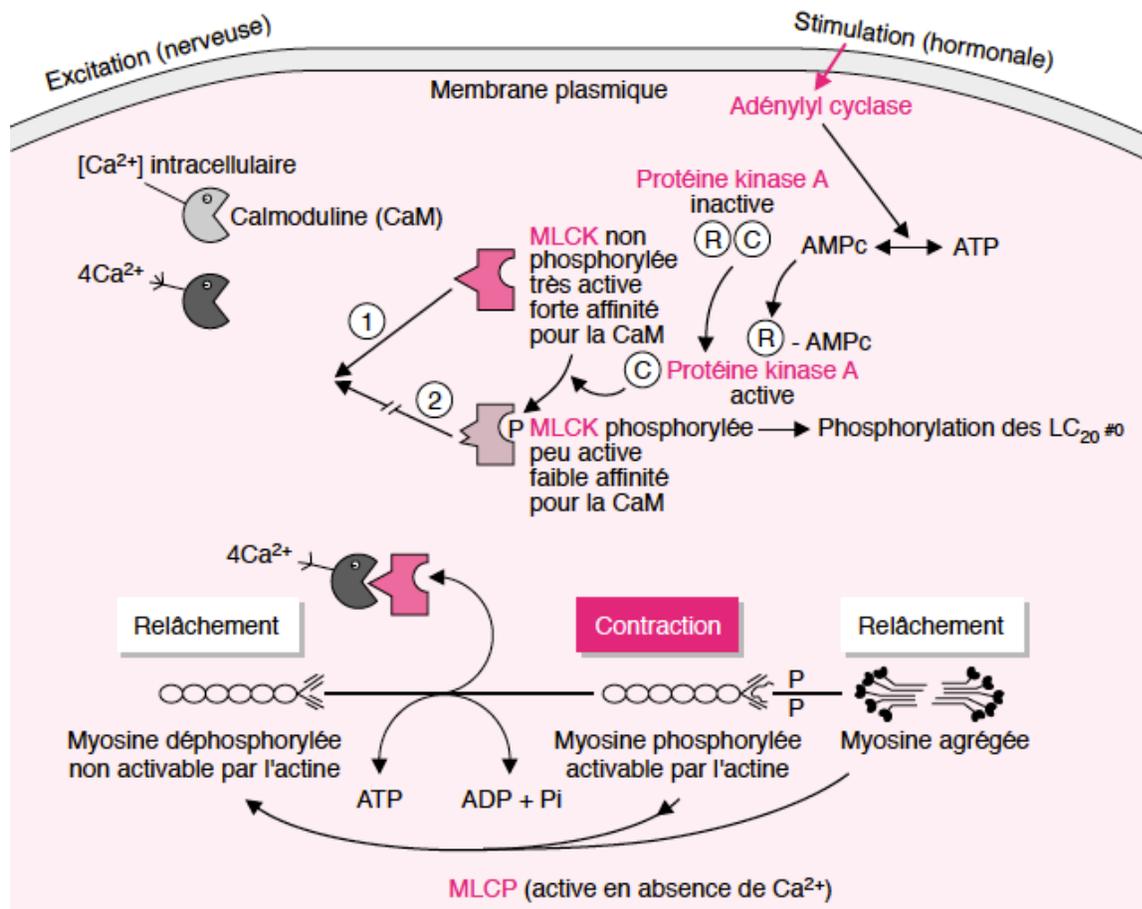


Figure 9 : Représentation schématique du mécanisme de régulation dépendante de la myosine de la contraction-relaxation du muscle lisse (Fattoum A., 1997).

II.2.5.2. Couplage excitation-contraction des muscles striés

Outre les canaux et les récepteurs sensibles au calcium, qui jouent un rôle crucial dans le phénomène de contraction musculaire, il existe plusieurs autres protéines effectrices et régulatrices de cette contraction qui, elles-aussi, ont une activité dépendante du calcium. Les grandes différences entre la contraction des muscles lisses et celle des muscles striés se font à travers cet ensemble de protéines (Julian FJ. et coll., 1978) (Squire JM., 2010).

II.2.5.2.1. Couplage excitation-contraction dans le muscle strié cardiaque

Comme dans les autres tissus musculaires, le calcium joue un rôle essentiel dans la contraction du muscle cardiaque. La dépolarisation de la membrane de la cellule musculaire cardiaque déclenche sa réponse contractile qui dure 1 fois et demie la durée du potentiel d'action.

Le rôle des ions calcium dans le couplage excitation-contraction du muscle cardiaque est similaire à son rôle dans le muscle squelettique. L'entrée du calcium extracellulaire, qui fait suite à l'activation des canaux sensibles aux dihydropyridines qui sont des canaux calciques voltage-dépendants de type L dans le système tubule T, est le déclencheur des phénomènes moléculaires de la contraction (Balke CW. et Goldman L., 2003) (Jeremy P. et coll., 2007).

Le couplage excitation-contraction des cellules musculaires cardiaques peut être résumé en 5 étapes : 1) Les potentiels d'action se déplacent tout au long du sarcolemme puis descendent dans le système du tubule transverse (tubule T) pour dépolariser la membrane cellulaire. 2) Les canaux calciques de la membrane plasmique dépendants du voltage de type L (sensibles aux dihydropyridines) s'ouvrent pour permettre l'entrée du calcium dans la cellule (Fig. 10) (Ferrier GR. Et Howlett SE., 2001) (Klabunde RE., 2013).

3) L'influx de calcium déclenche une libération subséquente dans le cytosol du calcium stocké dans le réticulum sarcoplasmique (RS) à travers les canaux-récepteurs calciques sensibles à la ryanodine (RyR) ce qui augmente la concentration de calcium intracellulaire (Fig. 10) depuis environ 10^{-7} M jusqu'à 10^{-5} M (Fabiato A. et Fabiato F., 1979) (Smith TW. et Morgan JP., 2017) (Klabunde RE., 2013).

4) Le calcium libre se lie à la troponine-C (TnC) qui fait partie du complexe régulateur attaché aux filaments fins. Lorsque le calcium se lie à la TnC, cela induit une modification conformationnelle du complexe, ce qui fait que la troponine-I (TnI) expose le site de fixation de la myosine-ATPase de la tête de myosine sur le myofilament d'actine. Cette liaison se traduit par une hydrolyse de l'ATP qui fournit de l'énergie pour qu'un changement conformationnel se produise dans le complexe actine-myosine. Le résultat de ces changements est un mouvement entre les têtes de myosine et l'actine, de sorte que les filaments d'actine et de myosine glissent les uns sur les autres, raccourcissant ainsi la longueur du sarcomère. Les cycles de mouvement se

produisent tant que le niveau de calcium cytosolique reste élevé (Bers DM., 2002) (Klabunde RE. et coll., 2013) (Eisner DA. et coll., 2017).

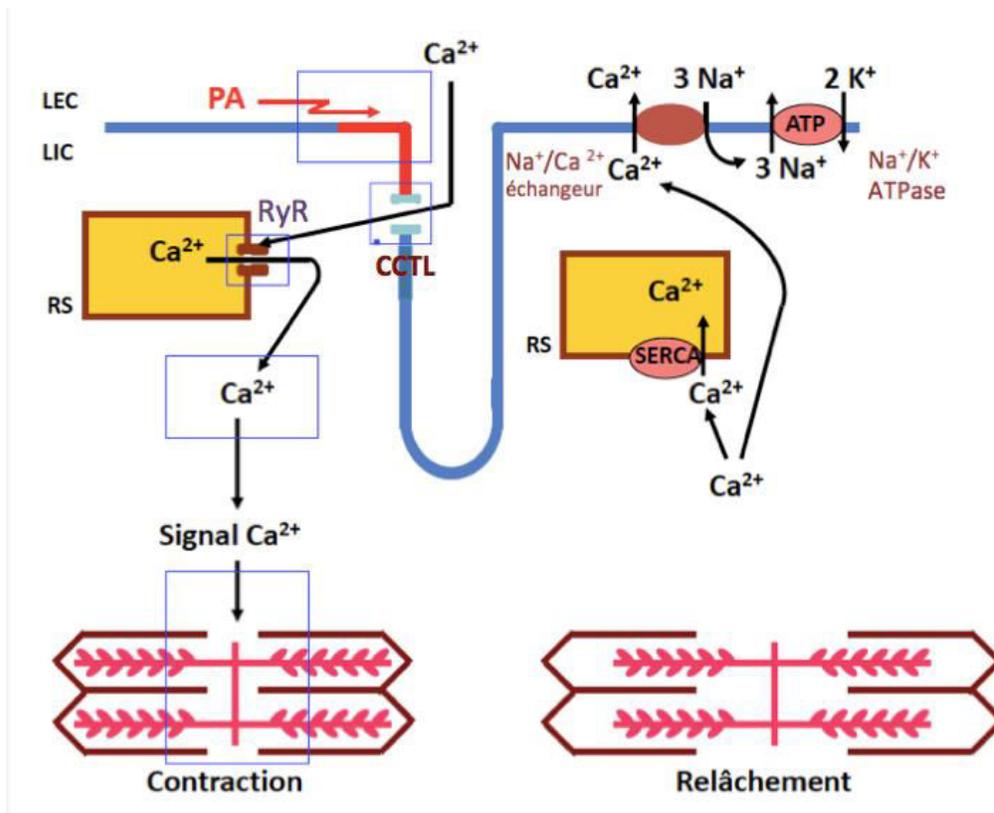


Figure 10 : Représentation schématique du mécanisme de régulation du couplage excitation-contraction et relaxation du muscle strié cardiaque. LEC : lumière extracellulaire, LIC : lumière intracellulaire, PA : potentiel d'action, RS : réticulum sarcoplasmique, RyR : récepteur sensible à la ryanodine, CCTL : canal calcique de type L, SERCA : pompe à calcium du réticulum sarco/endoplasmique ATPase-dépendante (Guyton A. et Hall J., 2005).

5) Par la suite, l'influx de calcium dans la cellule s'arrête suite à la fermeture des canaux calciques membranaires et le calcium est séquestré par le RS par l'action d'une pompe à calcium ATP-dépendante (SERCA, réticulum sarco-endoplasmique calcium-ATPase), abaissant ainsi la concentration du calcium cytosolique et dissociant le calcium de la TnC. Dans une mesure quantitativement plus faible, le calcium cytosolique est transporté hors de la cellule par un antiport d'échange sodium-calcium (Fig. 10). La libération du calcium lié à la TnC induit une modification conformationnelle du complexe de troponine conduisant, encore une fois, à l'inhibition de la TnI du site de liaison à l'actine. À la fin du cycle, une nouvelle molécule d'ATP

se lie à la tête de myosine, déplaçant l'ADP, ce qui induit la relaxation des sarcomères à travers le glissement en sens inverse des filaments d'actine et de myosine. La longueur initiale du sarcomère est alors restaurée (Bers DM., 2002) (Eisner DA. et coll., 2017) (Klabunde RE., 2013).

II.2.5.2.2. Couplage excitation-contraction dans les muscles striés squelettiques

Au niveau des muscles squelettiques, le couplage excitation-contraction est dépendant de l'acétylcholine qui, une fois fixée sur les récepteurs nicotiniques présents sur le sarcolemme, déclenche l'entrée du sodium dans la cellule musculaire, provoquant ainsi une dépolarisation puis un potentiel d'action. Ce potentiel se propage tout au long du sarcolemme jusqu'aux tubules transverses (tubules T) dans lesquels sont insérés les récepteurs aux dihydropyridines (DHPR) au niveau des triades. Le DHPR, qui est sensible à la variation du voltage provenant du potentiel d'action, change sa conformation et entraîne l'ouverture des canaux calciques du RS, surtout les RyR (Ursu D. et coll., 2001) (Irving M., 2017). Ceci induit une augmentation transitoire de la concentration du calcium libre dans la cellule. Le Ca^{2+} se fixe alors sur la troponine C, qui est un complexe de protéines sensibilisant les cellules musculaires striées au calcium (Hitchcock SE., 1975) (Ebashi S., 1972). Une fois activée par le calcium, la troponine change sa conformation et provoque le glissement de la tropomyosine sur le filament d'actine (Potter JD., 1982). Il est à noter que la tropomyosine est une protéine de régulation de la contraction des cellules musculaires qui stabilise le microfilament d'actine sur lequel elle est localisée (Gunning P. et coll., 2008). Le glissement de la tropomyosine libère le site de fixation de la myosine sur le filament fin d'actine. L'interaction entre la myosine et l'actine forme les ponts d'union acto-myosine, mais le glissement de ces filaments requière de l'énergie qui provient de l'hydrolyse de l'ATP en ADP grâce à l'enzyme myosine-ATPase (Fig. 11). La libération d'une molécule d'ADP induit une rotation de la tête de myosine, qui exerce une force sur le filament d'actine lié et le déplace, ce qui rapprochent les stries Z et induit le raccourcissement de la longueur du sarcomère (Irving M., 2017). La force produite à ce moment par le sarcomère dépend du nombre des ponts formés entre l'actine et la myosine. Par la suite, une molécule d'ATP se fixe sur la tête de myosine et provoque son détachement de l'actine (Fig. 11). La tête de myosine est ensuite

redressée en position de haute énergie suite à l'hydrolyse de l'ATP et le cycle d'attachement-détachement se répète tant que la concentration intracellulaire du calcium reste élevée (Fig. 11) (Squire JM., 2010) (El-Saleh SC. et coll., 1986). Une dissociation du complexe calcium-troponine C s'effectue suite à la diminution de la concentration des ions calcium dans le cytosol; ainsi la tropomyosine reprend sa position de départ par un changement de conformation du complexe troponine-tropomyosine. Ceci dissimule les sites de liaison du filament d'actine à la myosine et induit la relaxation des cellules musculaires squelettiques (Irving M., 2017) (Farah CS. et Reinach FC., 1995).

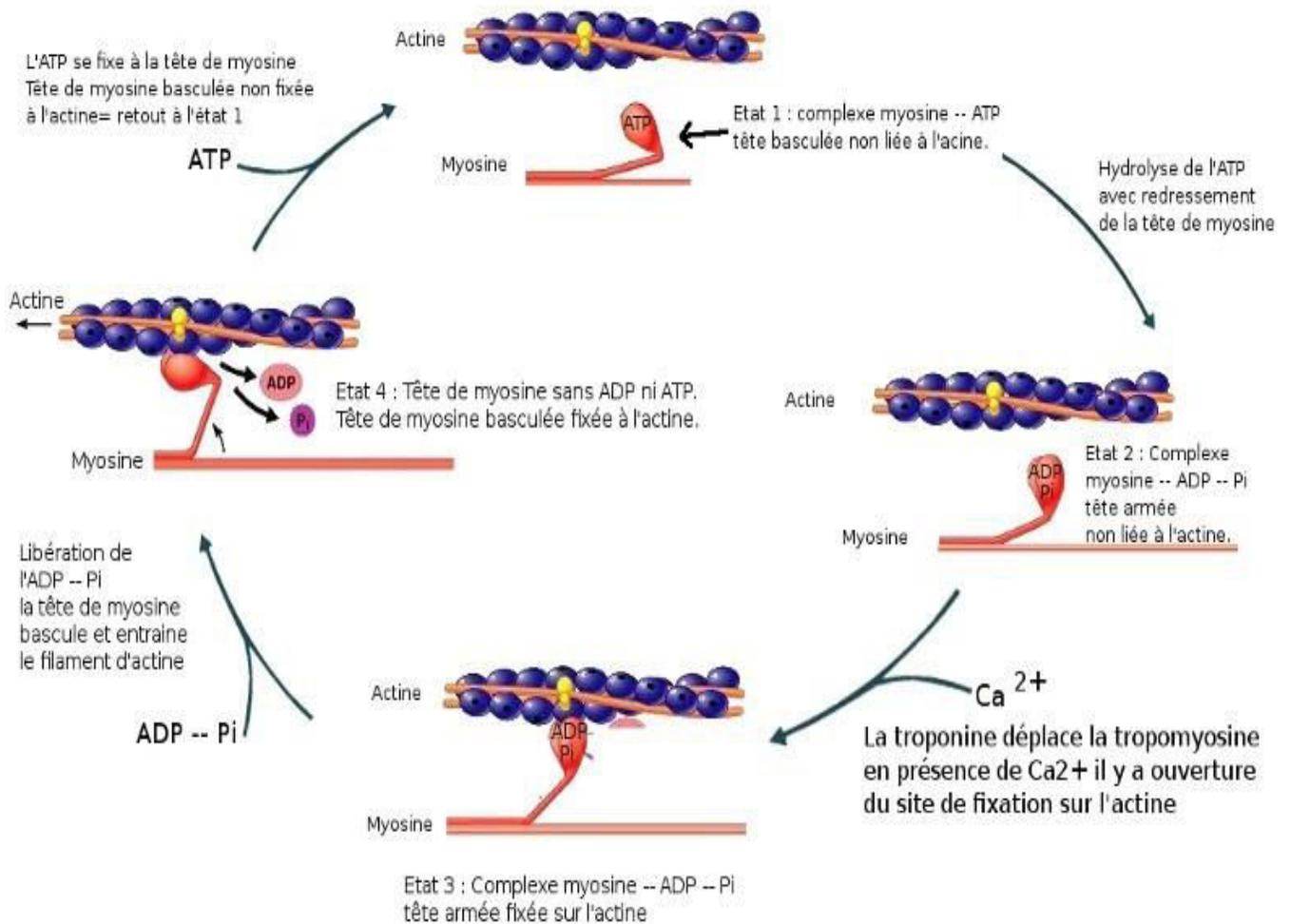


Figure 11 : Les différentes étapes du couplage excitation- contraction dans les muscles striés squelettiques (Biodis, 2015).

II.2.5.3. Les protéines contractiles

Après avoir expliqué le mécanisme du couplage excitation-contraction dans les trois types de muscles, nous allons maintenant aborder en détail les effecteurs principaux de la régulation de ce couplage au niveau du muscle lisse et du muscle strié squelettique.

II.2.5.3.1. La tropomyosine

La tropomyosine (Tpm) est une protéine ubiquitaire, associée à l'actine polymérisée. Très conservée au cours de l'évolution, elle est présente dans tous les eucaryotes, de la levure à l'Homme. Elle joue des rôles critiques dans la régulation de la fonction des filaments d'actine dans les cellules musculaires mais aussi non-musculaires (Gunning P. et coll., 2008). La Tpm a été découverte en 1940 comme composant du filament d'actine des muscles striés (Baikley K., 1946). Dans les cellules musculaires striées, elle est associée à la troponine et représente 4 % du poids sec d'un muscle (Gunning PW. et coll., 2015).

II.2.5.3.1.1. Structure et fonctions

La tropomyosine est une protéine fibreuse dimérique allongée logée dans le canal du microfilament d'actine (Fig. 12 A). Dans les muscles, la Tpm a une structure ressemblant à une bobine enroulée dimérique (composée d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité bêta) hélicoïdale sur toute leur longueur, ce qui lui permet de s'enrouler autour de l'actine (Fig. 12 B) pour stabiliser sa structure et d'interagir avec d'autres protéines de liaison (Gunning PW. et coll., 2015). Les molécules de Tpm se lient entre elles selon un schéma de tête à queue et sont positionnées sur les côtés des microfilaments (F-actine), ainsi chaque molécule interagit avec six ou sept monomères d'actine (Geeves MA. et coll., 2015).

Dans les muscles striés, la Tpm est toujours retrouvée en présence de troponine pour permettre la régulation de la contraction des muscles, en bloquant ou en permettant la liaison de la myosine à ses sites de liaison au niveau de l'actine (Kalyva A. et coll., 2012).

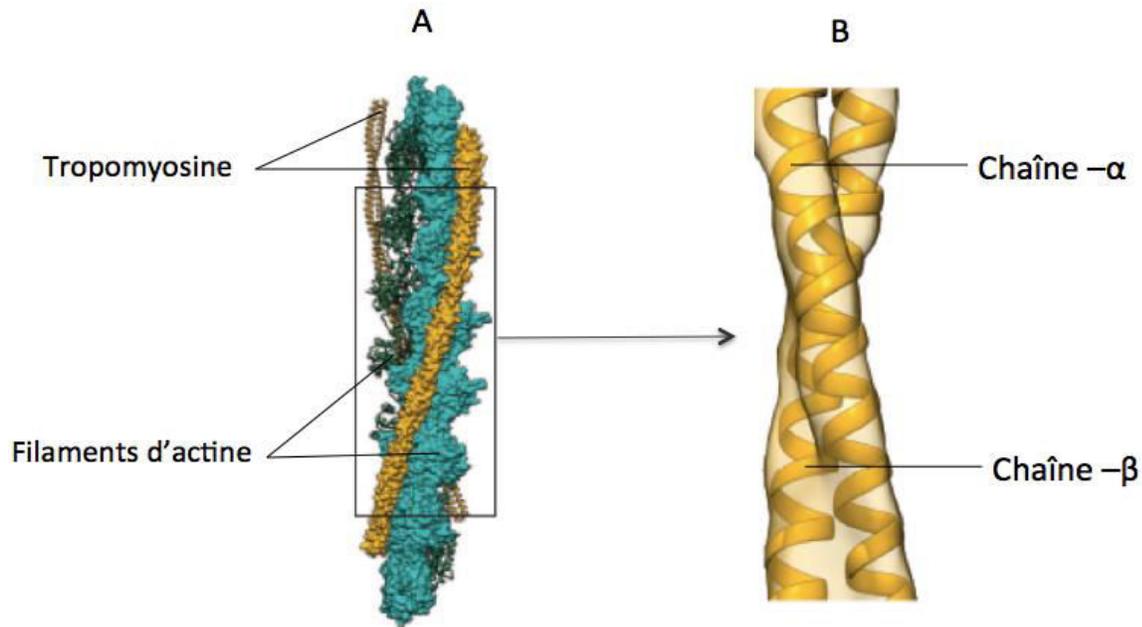


Figure 12 : Image montrant la structure de la protéine tropomyosine reconstituée à partir d'une image issue de la cryo-microscopie électronique à 6,5 Å. A) La tropomyosine (en jaune) entoure les filaments d'actine (en vert et cyan). B) Vue plus rapprochée montrant les deux sous-unités qui constituent la protéine tropomyosine (les chaînes α et β) (Von der Ecken J. et coll., 2014).

II.2.5.3.1.2. Isoformes

Chez l'être humain, comme chez les autres mammifères, quatre gènes assurent la synthèse des isoformes de la tropomyosine : TPM1, TPM2, TPM3, TPM4 (Schevzov G. et coll., 2005). Plus de 40 différentes variantes d'ARNm de Tpm sont obtenues suite à l'épissage alternatif des ARN issus de ces 4 gènes (Vindin H. et Gunning P., 2013) (Geeves MA. et coll., 2015) (Wang CLA. et Coluccio LM., 2010). Chaque isoforme de cette protéine possède une affinité différente pour l'actine ainsi que pour les autres molécules qui lui sont liées, comme la cofiline (qui est une protéine sous forme filamentaire qui déstabilise l'actine) et la calmoduline pour former un complexe de régulation du couplage excitation-contraction (Hilbert L. et coll., 2013) (Maytum R. et coll., 2001).

Les cellules cardiaques du lapin, du cochon d'inde, du rat et du chien contiennent presque exclusivement l'isoforme α de la Tpm ; alors que dans le myocarde des bovins, du cochon et du mouton, l'isoforme β de la Tpm est également exprimée et représente 15 à 20% de la totalité des isoformes Tpm (Marston S. et coll., 2013) (Peng Y. et coll., 2013).

La Tpm a été également identifiée comme un composant des cellules non-musculaires (Cohen I. et Cohin C., 1972) (Lazarides EJ., 1975). En fait, 18 parmi les 40 isoformes de Tpm des mammifères sont exprimées dans des cellules non-musculaires (Gunning P. et coll., 2008). Le rôle généralement accepté de la Tpm dans les cellules non-musculaires est de stabiliser les filaments d'actine ; cependant, des molécules de Tpm ont également été identifiées dans des lamellipodes de cellules migrantes où l'on pense que l'actine est hautement dynamique, remettant en cause le rôle de ces Tpm dans des cellules non-contractiles (Wang CLA. et Coluccio LM., 2010).

Au niveau des muscles du système cardiovasculaire, les isoformes de Tpm sont associées à des maladies cardiaques, ainsi qu'à des dysfonctions et des risques cardiovasculaires. Ainsi une diminution de l'expression des isoformes de Tpm au niveau des muscles cardiaques fœtaux est associée à une insuffisance cardiaque (Marston SB. et coll., 2013). De même, l'élimination de la phosphorylation du résidu Ser-238 des tropomyosines induit une dysfonction et augmente la rigidité du muscle cardiaque, ceci étant démontré chez les souris et chez l'Homme (Schulz EM. et coll., 2013). En outre, au niveau de la membrane des CMLV des vaisseaux sanguins, une altération de l'expression des isoformes de Tpm (dérivant des deux gènes TPM1 et TPM3), est associée à la survenue de l'hypertension (Dunn SA. et coll., 2003) (Kishi T. et coll., 2013) (Kishi . et coll T., 2015).

II.2.5.3.2. La Troponine

Une autre protéine en interaction avec la tropomyosine était ensuite mise en évidence au niveau des muscles striés : la troponine (Tn).

Les isoformes de la troponine sont des protéines exprimées essentiellement au niveau des muscles striés, où elles interviennent dans la régulation de leur contraction. Elles se trouvent associées à l'actine et à la tropomyosine (Fig. 13). Nous distinguons la cTn pour la troponine des muscles cardiaques, et la sTn pour les muscles squelettiques. Malgré le fait que la cTn et la sTn accomplissent la même fonction, elles diffèrent par leurs interactions entre leurs propres sous-unités (Tn) ainsi que celles avec l'actine et la tropomyosine (Yang Z. et coll., 2009) (Wei B et Jin JP., 2016).

II.2.5.3.2.1. Isoformes

La troponine est une protéine hétérotrimérique qui interagit fortement ensemble : la troponine C, la troponine I et la troponine T.

La troponine C (TnC) : la sous-unité responsable de la liaison avec le calcium. La forme cardiaque et la forme squelettique de la troponine TnC sont fortement similaires. Chez l'Homme, la TnC est exprimée par deux gènes : TNNC1 qui code pour les TnC des muscles squelettiques lents et du muscle cardiaque et TNNC2 qui code pour le TnC des muscles squelettiques rapides (Katrukha IA., 2013) (Bakker AJ. et coll., 2017) (Fig. 13).

La troponine I (TnI) : la sous-unité inhibitrice du complexe de troponine dans le myofilament d'actine du muscle strié joue un rôle central dans la régulation de la fixation du calcium à la TnC durant la contraction et de la relaxation (Fig. 13).

La TnI déclenche la relaxation musculaire en inhibant la liaison entre la myosine et l'actine. Chez les vertébrés, nous distinguons 3 isoformes de la sous-unité TnI, codées par trois gènes homologues qui sont exprimés en fonction du type de muscle et du stade de développement : TNN1 pour la TnI des muscles squelettiques lents, TNN2 pour la TnI des muscles squelettiques rapides, et TNN3 pour la TnI cardiaque (Jin JJ. et JJian-Ping S., 2016) (Zoltani CK., 2014).

La troponine T (TnT) : la sous-unité responsable de la liaison avec la tropomyosine. Il existe jusqu'à 12 isoformes de la TnT dans les muscles squelettiques et 4 isoformes cardiaques (Wei B et Jin JP., 2016). Comme la TnI, la TnT est exprimée par 3 gènes homologues qui codent pour des isoformes tissu-spécifique : la TNNT1 codant pour la TnT des muscles squelettiques lents, la TNNT2 codant la TnT du muscle cardiaque et la TNNT3 qui code pour le TnT du muscle squelettique rapide (Zoltani CK., 2014) (Wei B et Jin JP., 2016). Les troponines cardiaques (TnTc) et (TnTc) sont les seuls isoformes qui ont un intérêt concret dans le diagnostic de l'infarctus du myocarde. Ainsi, une concentration élevée de TnTc est fortement liée à une augmentation du risque de mortalité cardiovasculaire (Lefèvre G., 2004) (Delaval K., 2011) (Fig. 13).

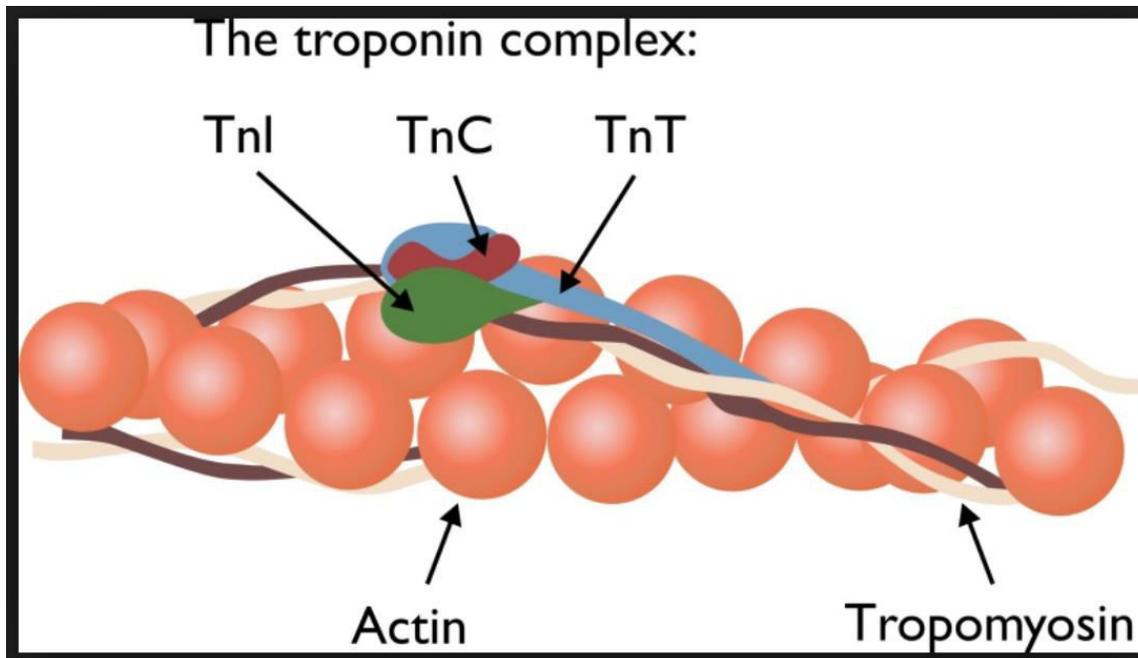


Figure 13 : Schéma montrant le complexe de la troponine dans le muscle squelettique avec l'actine et la tropomyosine (Smith C., 2016).

II.2.5.3.2.2. Structure et fonction

La troponine est une protéine myofibrillaire, non-globulaire qui en solution adopte une structure allongée (Larue C. et coll., 1998). Le poids moléculaire des sous-unités de la troponine est de 18 kDa, 37 kDa et 24 kDa, respectivement pour la TnC, la TnT et la TnI (Ferrieres G. et coll., 1998).

La troponine joue un rôle important lors du couplage excitation-contraction. Le mode de fonctionnement de ces 3 sous-unités peut être décrit brièvement : pendant l'excitation, les ions calcium se lient à la TnC, ils interagissent avec la tropomyosine pour démasquer les sites de liaison entre les filaments de myosine et d'actine, permettant ainsi l'ancrage du pont transversal (point de fixation de la tête de myosine sur le filament d'actine) et donc la contraction des myofibrilles (Galinska-Rakoczy A. et coll., 2008). La force de contraction est fonction de l'intensité du flux de calcium extracellulaire pénétrant dans les cellules myocardiques. La phosphorylation de la TnI inhibe la liaison au calcium de la TnC, qui bloque alors l'interaction de l'actine avec la myosine (Sheng JJ. et Jian-Ping Jin., 2016) (Zoltani CK., 2014).

II.2.5.3.3. La calmoduline

La calmoduline (CaM) est une protéine ubiquitaire considéré comme l'équivalent de la troponine dans les cellules musculaire lisses : elle est en effet capable de se lier aux ions Ca^{2+} présent dans le milieu intracellulaire pour réguler la contraction de ces cellules (Klee CB. et Vanaman TC., 1982).

II.2.5.3.3.1. Isoformes

La calmoduline est codée par 3 gènes : CALM1, CALM2 et CALM3. Chez l'Homme, ces 3 gènes possèdent des séquences nucléotidiques différentes mais ils codent tous les trois pour une protéine CaM complètement identique, constituée de 149 acides aminés (Boczek NJ. et coll., 2016).

II.2.5.3.3.2. Structure et fonctions

La calmoduline est une protéine de 149 acides aminés constituée de deux sous-unités globulaires (Hitoshi K. et coll., 1995) et sa structure a été fortement conservée au cours de l'évolution (Klee CB. et Vanaman TC., 1982).

La calmoduline est une protéine monomérique et globulaire, qui s'associe aux ions calcium. Elle est fortement acide du fait de sa teneur élevée (~ 35%) en résidus aspartate et glutamate. Elle possède 4 motifs en main EF, chacun étant capable de s'associer avec un atome de calcium. Un motif en main EF (en anglais, EF Hand) est un motif structural constitué de deux hélices α (la première hélice α est nommée E et la deuxième est nommée F) qui se lient à une boucle protéique constituée d'une douzaine d'acides aminés. Cette structure peut enserrer un ion Ca^{2+} (Zhou Z. et coll., 2006).

Ce domaine protéique ressemble à la forme d'une main dans laquelle l'ion Ca^{2+} se positionne au niveau de la paume ; les deux hélices α formant le pouce et l'index relevés.

Au niveau du muscle cardiaque, la calmoduline joue un rôle important dans le contrôle de son état contractile. Ainsi, la calmoduline associée au Ca^{2+} peut réguler la contraction des muscles lisses en agissant sur les canaux récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR) qui contrôlent le flux de Ca^{2+} à travers la membrane du réticulum sarcoplasmique (Dries E. et coll., 2016).

II.2.5.3.4. La calponine

La calponine est une protéine fortement associée à l'actine, elle se trouve largement distribuée dans les cellules musculaires lisses au niveau de la partie contractile ainsi qu'au niveau du cytosquelette. Ceci suggère qu'elle peut jouer un rôle structurel dans ces cellules (Green KJ. et Jonathan CRJ., 2005).

La calponine est une protéine analogue à la troponine. C'est un polypeptide de 34 kDa qui s'associe à l'actine, à la myosine, à la tropomyosine et aux protéines qui lient le calcium. Elle est impliquée dans la contraction des muscles lisses en régulant l'interaction entre les filaments d'actine et de myosine, inhibant ainsi l'activité enzymatique de la myosine-ATPase.

La molécule de calponine est constituée de quatre domaines : un à l'extrémité N-terminale, qui est le domaine d'homologie à calponine (= Calponin Homology : CH) et trois domaines répétitifs comprenant l'extrémité Ct, qui constituent des répétitions de type calponine-like (CLR). Le domaine CH constitué d'environ 100 résidus, trouvé dans la spectrine et la dystrophine, a été identifié pour la première fois dans la calponine, ce qui explique sa dénomination (Bramham J. et coll., 2002).

La calponine est exprimé essentiellement au niveau du tissu musculaire lisse. Elle intervient activement dans la régulation dépendante du calcium de la contraction des muscles lisses en régulant l'interaction actine/myosine (Vetterkind S et Morgan KG., 2012).

II.2.5.3.5. Le parvalbumine

Le parvalbumine est une protéine soluble de faible poids moléculaire (9-11 kDa), qui est caractérisée par sa forte affinité pour le calcium (Schwaller B. et coll., 2002). Elle joue un rôle régulateur du niveau et du trafic du calcium intracellulaire libre essentiel pour la contraction et la relaxation des fibres musculaires (Arif SH., 2009).

Le parvalbumine travaille en parallèle avec les pompes Ca^{2+} pour induire la relaxation musculaire. Ainsi, on trouve que durant la contraction, des ions Ca^{2+} font un échange avec les ions Mg^{2+} lié au parvalbumine. En revanche, durant la relaxation le Ca^{2+} sera séquestré dans le RS par les pompes (Ca-ATPase) et se lie au parvalbumine via un échange avec le Mg^{2+} de ce dernier.

Le parvalbumine est une protéine ubiquitaire exprimée chez les animaux sous deux isoformes différentes (α et β) mais très similaires structurellement (Collin T. et coll., 2005). Les parvalbumines de type β sont généralement des allergènes. Du point de vue structurel, les parvalbumines sont caractérisées par un motif de liaison au calcium, qui se retrouve aussi dans plusieurs autres protéines connues, sous le nom d'EF-hand. Ce motif comprend une boucle de 12 acides aminés flanquée de chaque côté par une extension de 12 résidus configurés en hélice α (Kirkcaldie MTK., 2012).

Le calcium jouant un rôle crucial dans le déroulement des évènements du couplage excitation-contraction dans les cellules musculaires lisses, les chapitres suivant vont décrire les mécanismes mis en œuvre pour réguler la signalisation calcique et maintenir l'homéostasie calcique dans les CMLV.

II.2.6. Homéostasie du calcium dans les cellules musculaires lisses

L'homéostasie est, par définition, la faculté que possède un organisme de maintenir les équilibres de son milieu intérieur de façon stable et indépendante des fluctuations du milieu extérieur. La régulation et le maintien de l'homéostasie du calcium sont indispensables à l'homéostasie de l'organisme dans son intégralité.

Le calcium joue un rôle majeur et intervient dans un grand nombre de fonctions cellulaires essentielles (Rasmussen H., 1986), telles que :

- a) La contraction de tous les types musculaires
- b) La croissance, la prolifération et l'apoptose
- c) Les processus métaboliques de la glycogénèse et de la gluconèse
- d) Les sécrétions exocrine, endocrine et neurocrine
- e) Le transport et la sécrétion des fluides (la sécrétion du suc pancréatique, des hormones, etc.) et des électrolytes

Une perturbation dans les systèmes utilisant le calcium comme molécule de signalisation est à l'origine du développement de plusieurs désordres comme l'hypertension, l'asthme bronchiale, les désordres de mobilité et de sécrétion intestinale, les endocrinopathies, le diabète, la perturbation de la croissance des cellules, les anomalies de coagulation liées à une dysfonction

des plaquettes, et même la perte de mémoire (Berchtold MW. et coll., 2000) (Berridge MJ., 2006) (Calpham DE. et coll., 2007). Cette liste n'est évidemment pas exhaustive, mais elle permet d'illustrer les nombreux problèmes que peut engendrer la dérégulation des concentrations intracellulaires de cet ion.

Au niveau des CMLV, la régulation du calcium est remarquable (Johny JP. et coll., 2017) car le calcium est le facteur clé dans le déclenchement de la contraction aussi bien que la relaxation des muscles lisses (Espinosa-Tanguma R. et coll., 2011).

II.2.6.1. Le calcium : déterminant de la contractilité des CMLV

Comme toutes autres cellules musculaires, les CMLV dépendent des mouvements du Ca^{2+} pour déclencher leur contraction. De même, la concentration intracellulaire de Ca^{2+} affecte également l'activité de plusieurs facteurs de transcription dépendants du Ca^{2+} , déterminant ainsi le phénotype contractile des CMLV. Ce dernier est défini comme un état différencié mature des CMLV qui se caractérise, au niveau ultrastructural, par l'organisation des filaments contractiles en filaments fins d'actine et filaments épais de myosine. Au niveau biochimique, l'état différencié des CMLV se caractérise par l'expression des protéines contractiles (actine, myosine, caldesmone, calmoduline, etc.), des protéines du cytosquelette (tropomyosine, actine, etc.), aussi bien que des protéines matricielles (e.g. collagène, élastine) qui leur permettent d'accomplir leur fonction de base qui est la contraction (Brozovich FV. et coll., 2016) (Hill-Eubanks DC. et coll., 2013).

Pour gérer les différentes fonctions dépendantes du Ca^{2+} et en réponse à différents stimuli, les CMLV utilisent une diversité de canaux Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique (RS) et de la membrane plasmique pour produire un grand répertoire de signaux Ca^{2+} , qui diffèrent selon leur distribution spatiale et temporelle (Amberg GC. et coll., 2013). À l'état basal, la concentration des ions calcium libres dans le cytosol des CMLV est généralement 10000 fois inférieure à la concentration du calcium du milieu extracellulaire. Elle est d'ordre de $0.1 \mu\text{M}$ au niveau cytosolique alors qu'elle est d'ordre de $1-2 \text{mM}$ à l'extérieur de la cellule (Rasmussen H., 1986) (Bolton TB. et coll., 1979). Après activation des CMLV, l'influx de Ca^{2+} provenant du RS et du milieu extracellulaire fait augmenter la concentration du

Ca^{2+} du cytosol jusqu'à 1-10 μM (Caramelo C. et coll., 1990). Le réticulum sarcoplasmique constitue la source essentielle du calcium intracellulaire (Bolton TB. et coll., 1979) (Baro I. et coll., 1995) (Bolton TB. et coll., 1984). À l'extérieur de la cellule, le calcium se trouve sous deux formes; soit sous forme d'ions Ca^{2+} libre, soit lié aux différents composants de la membrane plasmique, facilitant ainsi son entrée dans la cellule (Orallo F., 1996) (Berridge MJ., 2006).

II.2.6.2. Compartimentation du calcium

Il a été récemment évoqué par Billaud et ses collaborateurs (Billaud M. et coll., 2014), que le mode d'entrée du calcium dans le milieu intracellulaire dépend de la manière dont les organites (mitochondries et RS), les canaux et les pompes à Ca^{2+} sont organisés au sein de la cellule. Ceci est fondé sur le concept de compartimentation du Ca^{2+} . La compartimentation signifie qu'il y a des augmentations locales du calcium autres que les augmentations globales qui activent toutes les voies de signalisations dépendantes de calcium (Fig. 14). Ces augmentations locales sont capables d'activer l'appareil contractile, sans influencer les autres voies de signalisation dépendantes du calcium. Pour activer les processus dépendants du Ca^{2+} , un flux de Ca^{2+} important est requis pour atteindre une concentration élevée de calcium, mais le Ca^{2+} diffuse lentement à travers le cytoplasme (Berridge MJ., 2006), ce qui amène les CMLV à organiser leur organites d'une façon à limiter l'espace de diffusion (comme le montre la Fig. 14) en localisant le RS à proximité de la membrane plasmique. Ceci accentue l'effet des changements locaux dans la concentration de Ca^{2+} ; et aboutit par conséquent à la compartimentation et la régulation des signaux Ca^{2+} internes (Poburko D. et coll., 2004) (Brozovich FV. et coll., 2016).

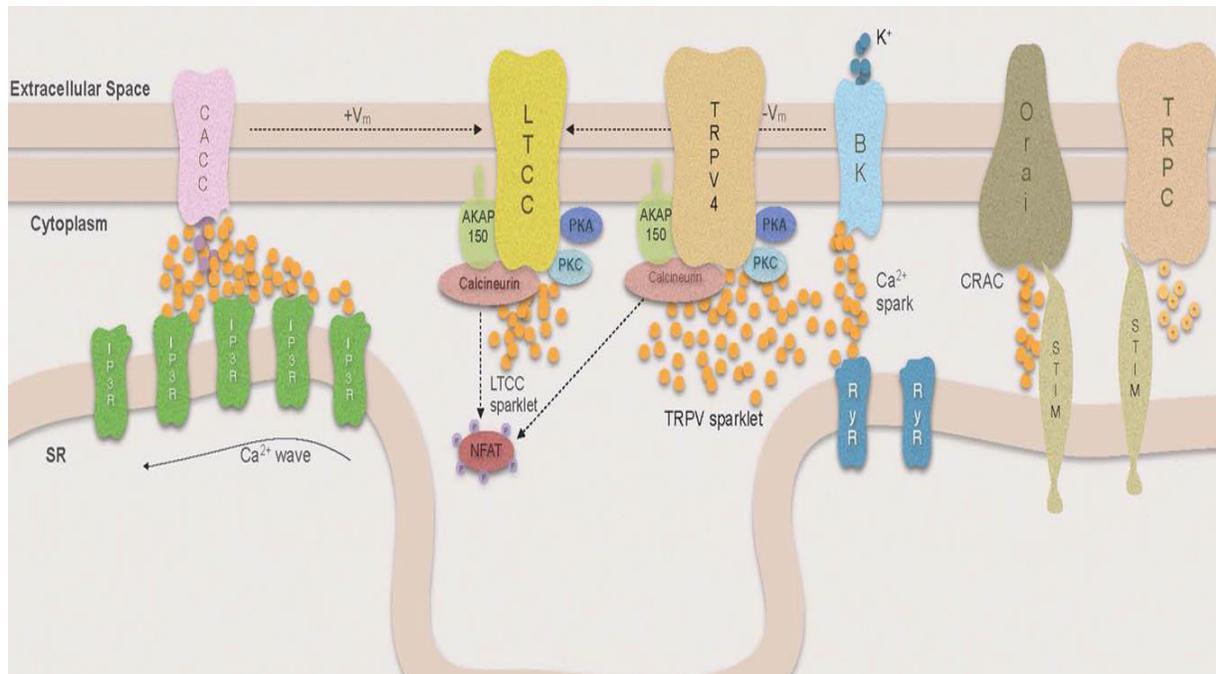


Figure 14 : Compartimentation du signal Ca^{2+} dans la cellule musculaire. TLCC : canal calcique de type L, TRPV4 : membre 4 de la sous-famille des vanilloïdes des canaux cationiques à potentiels récepteurs transitoires, BK : canal potassique activé par le calcium, Orai : (isoforme protéique 1) du canal de libération de calcium activé par la réserve calcique, TRPC : canal cationique à potentiel récepteur transitoire de la sous-famille canonique, STIM : protéine capteur du calcium spécialisée de la signalisation électrique dans le réticulum sarcoplasmique, RyR : récepteur sensible à la ryanodine, IP3R : récepteur sensible à l'inositol 1,4,5 trisphosphate (Brozovich FV. et coll., 2016).

II.2.6.3. Rôle du Ca^{2+} dans la contraction des CMLV

La contraction est le phénomène par lequel la cellule musculaire passe de son état relâché à son état contracté en diminuant sa longueur. Le facteur limitant dans ce phénomène est la concentration calcique intracellulaire. Ainsi, quand la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique est supérieure à $1 \mu\text{M}$, la CMLV se contracte, alors que cette même cellule reste dans un état relâché quand la concentration calcique est inférieure à cette valeur. (Johny JP. et coll., 2017) (Lipskaia L. et coll., 2012). Le calcium, indispensable à la contraction des CLMV, peut provenir des organites intracellulaires et du milieu extracellulaire. Ces deux sources de calcium dépendent du mode d'initiation de la contraction musculaire. Ainsi l'augmentation du calcium intracellulaire des CMLV peut avoir lieu suite à deux différents types d'initiation de la contraction musculaire :

i) une initiation électromécanique ; qui est le résultat d'une modification du potentiel d'action de la membrane, permettant ainsi l'entrée du calcium extracellulaire suite à l'ouverture des canaux calciques dépendants du voltage. Dans ce mode d'initiation, deux types de canaux ioniques interviennent dans la modulation du potentiel de membrane dans les CMLV : des canaux K^+ et des canaux Cl^- , tous deux dépendant du Ca^{2+} . Ainsi une augmentation de la concentration du Ca^{2+} induit une activation de ces canaux, conduisant à une sortie des ions Cl^- à travers les canaux chlore- Ca^{2+} dépendant et une dépolarisation de la membrane plasmique. En revanche, la sortie des K^+ des canaux potassiques dépendants du Ca^{2+} provoque une hyperpolarisation qui résulte en une diminution du tonus vasculaire (Berridge MJ., 2006) (Brozovich FV. et coll., 2016), ii) une initiation pharmaco-mécanique, suite à la liaison d'un agoniste à un récepteur spécifique, ce qui fait augmenter par conséquence le taux du calcium cytosolique par la libération des ions Ca^{2+} des réservoirs intracellulaires. Plusieurs mécanismes sont proposés pour cette initiation pharmaco-mécanique : le plus important consiste en une activation de la cascade des phosphatidylinositol, qui provoque l'augmentation de la concentration d'IP3, qui après liaison à son récepteur, provoque une libération du Ca^{2+} du RS (Baro I. et coll., 1995) (Berridge MJ., 2006) (Brozovich FV. et coll., 2016).

II.2.6.4. Rôle du Ca^{2+} dans la relaxation des CMLV

La relaxation des muscles lisses n'est pas un phénomène passif comme cela était classiquement avancé, il s'agit plutôt d'un processus bien contrôlé et actif. La relaxation des CMLV se produit soit par l'élimination du stimulus contractile, soit par l'action directe d'une substance qui provoque l'inhibition du mécanisme contractile (par exemple le facteur natriurétique auriculaire, une hormone synthétisée par l'oreillette droite du cœur et qui possède une activité vasodilatatrice) (Webb RC., 2003). Quelle que soit sa cause, la relaxation des muscles lisses nécessite une diminution de la concentration du Ca^{2+} intracellulaire (Horowitz A. et coll., 1996) (Carvajal JA. et coll., 2000) (Consigny PM., 1991) et une augmentation de l'activité de la phosphatase de la MLC (pour Myosin Light Chain), qui est un enzyme qui déphosphoryle la chaîne légère régulatrice de la myosine (Somlyo AP. et coll., 1999).

Une diminution de la concentration intracellulaire du Ca^{2+} déclenche la relaxation des cellules

musculaires lisses. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans l'élimination du Ca^{2+} cytosolique et impliquent le réticulum sarcoplasmique et la membrane plasmique. L'absorption de Ca^{2+} dans le réticulum sarcoplasmique dépend de l'hydrolyse de l'ATP par une pompe portant une enzyme dépendante du magnésium : la Ca^{2+} -ATPase du RS (SERCA) qui, une fois phosphorylée, lie deux ions Ca^{2+} , qui sont ensuite déplacés vers le côté luminal du RS et libérés. Le Mg^{2+} est nécessaire pour l'activité de cette enzyme; il se lie au site catalytique de l'ATPase pour enclencher la réaction. Les protéines de fixation au Ca^{2+} du RS du muscle lisse, telles que la calsequestrine et la calréticuline contribuent également à la diminution des taux intracellulaires de Ca^{2+} (Webb RC., 2003) (Woodrum DA. et Brophy CM., 2001) (Mitchell BM. et coll., 2003) (Solaro RJ., 2000).

De même, les échangeurs $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, localisés au niveau de la membrane plasmique des cellules musculaires lisses aident à la diminution de la concentration du calcium intracellulaire et permettent l'expulsion du Ca^{2+} de la cellule contre son gradient de concentration, en l'échangeant avec Na^+ sans consommer d'énergie (Webb RC., 2003).

II.2.6.5. Les canaux et les récepteurs sensibles au calcium

Au niveau du RS des CMLV, des protéines comme la Ca^{2+} -ATPase-sarco-endoplasmique (SERCA), le récepteur de l'inositol-1, 4,5-triphosphate (IP3R) et le récepteur sensible à la ryanodine (RyR), régulent les mouvements du calcium à l'intérieur de la CMLV. Ceci permet de contrôler les différentes fonctions dépendantes du calcium, telles que la prolifération et la contraction musculaire (Johny JP. et coll., 2017) (Lipskaia L. et coll., 2005).

En effet, la suppression de l'activité de l'IP3R induit une réduction de la prolifération des CMLV cérébrales (Wilkerson MK. et coll., 2006). En outre, l'absence de RyR et de SERCA au niveau du RS des CMLV, empêche ces dernières de se contracter (Vallot O. et coll., 2000).

Ces protéines jouent donc un rôle majeur dans les fonctions physiologiques des CMLV et les changements de leurs expressions peuvent être à l'origine de plusieurs pathologies et dysfonctions associées aux CMLV (Lipskaia J. et coll., 2005) (Johny JP. et coll., 2017) (Simard JM. et coll., 2007) (Dahan D. et coll., 2012) (Laitinen PJ. et coll., 2001). Ces pathologies et dysfonction cardiovasculaires induits par chaque protéine seront détaillées dans ce qui suit.

L'étude de ces protéines peut être la clé pour expliquer les dysfonctions, le remodelage musculaire et les complications cardiovasculaires. En même temps, elles constituent une cible potentielle pour le traitement de ces complications. Nous détaillerons donc dans ce qui suit les principales familles de récepteurs – canaux ainsi que des pompes sensibles au calcium de la membrane plasmique et du RS des CMLV (Fig. 15).

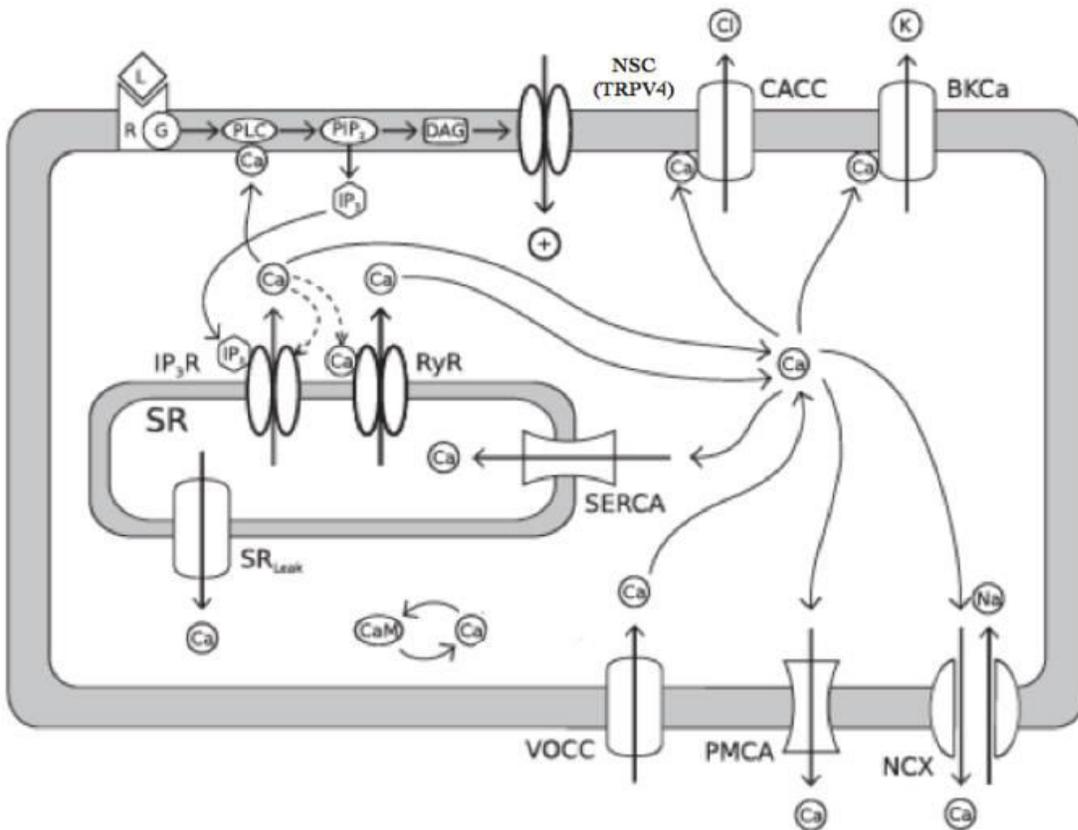


Figure 15 : Présentation schématique de la cellule musculaire lisse vasculaire, avec les récepteurs, les canaux et les pompes sensibles au calcium. Ca : ions calcium, Na : ions sodium, K : ions potassium, L : ligand, R : récepteur couplé à la protéine G, G : protéine G, PLC : enzyme phospholipase C, PIP₂ : phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, DAG : diacylglycérol, IP₃ : inositol 1,4,5-trisphosphate, IP₃R : récepteur sensible à l'IP₃, RyR : récepteur sensible à la ryanodine, SR : réticulum sarcoplasmique, SR_{Leak} : ensemble des événements de libération de calcium du RS (qui comprends les étincelles du Ca²⁺ et les ondes de Ca²⁺), SERCA : pompe à calcium (Ca²⁺-ATPase) du réticulum sarcoplasmique, CaM : calmoduline, VOCC : canaux calciques voltage-dépendants, PMCA : pompe à calcium (Ca²⁺-ATPase) de la membrane plasmique, NCX : échangeur sodium-calcium, NSC : canaux à cations non sélectifs, TRPV4 : membre 4 de la sous-famille des vanilloïdes des canaux cationiques à potentiels récepteurs transitoires, CACC : canaux chlorure dépendants du calcium, BKCa : canaux potassiques dépendants du calcium (Johny JP., 2017).

II.2.6.5.1. Les récepteurs et les canaux sensibles au calcium de la membrane plasmique

La membrane plasmique des CMLV contient une large variété de protéines qui sont des canaux-récepteurs, des échangeurs et des pompes ioniques contrôlant l'échange du calcium entre la cellule et le milieu extérieur. Parmi ces protéines, se trouvent des canaux calciques voltage-dépendants, tels que les VOCC (Voltage Operated Calcium Channel), ou calcium-dépendants, tels que les CACC (Calcium-Activated Chloride Channel) et les BKCa (Big Potassium Calcium-activated channel). De même, nous distinguons des échangeurs d'ions sodium-calcium (NCX), les pompes ATPase à calcium (PMCA) et les canaux à cations non sélectifs (NSC) (Johnny JP. et coll., 2017) (Simard JM. et coll., 2007). Une des familles des récepteurs-canaux à cations non-sélectifs de la membrane plasmique, est représentée par la famille des TRP, bien caractérisés dans le système vasculaire (Nilius B. et coll., 2011) et largement associés à des dysfonctions et complications dans le système musculaire cardiovasculaire (Simard JM. et coll., 2007) (Dahan D. et coll., 2012) et squelettique (Rock M. et coll J., 2008) (Gailly P., 2012) (Kruger J. et coll., 2008).

II.2.6.5.1.1. Les récepteurs de la famille TRP

Les canaux cationiques à potentiel de récepteur transitoire (TRP, pour Transient Receptor Potential) appartiennent à une famille de récepteurs-canaux sensibles aux stimuli mécaniques, thermiques et à certaines substances chimiques. Les canaux TRP, perméables aux cations, sont présents dans la plupart des types cellulaires chez les mammifères. L'archétype de ce canal a été découvert chez la drosophile (*Drosophila melanogaster*) où il joue un rôle dans la photo-transduction qui implique un signal calcique (Montell C. et Rubin GM., 1989) (Wes PD. et coll., 1995) (Zhu X. et coll., 1995). Cette superfamille de canaux reste conservée au cours de l'évolution des espèces (Vriens J. et coll., 2009). Cinquante membres de cette famille TRP ont été caractérisés dans différents organismes, tels que la levure, les vers, les insectes, les poissons ainsi que chez les mammifères (Nilius B. et coll., 2004).

Les canaux TRP sont des canaux cationiques homo- ou hétéro-tétramériques peu sélectifs (Schaefer M., 2005) (Venkatachalam K. et Montell C., 2007). Les canaux TRP possèdent une

structure semblable à celle des canaux potassiques sensibles au potentiel membranaire : chaque sous-unité TRP est constituée de six domaines transmembranaires avec un pore entre le cinquième et sixième de ces domaines.

La famille des canaux TRP chez les mammifères contient 28 canaux-récepteurs qui ont été bien identifiés. La régulation de l'activité de ces récepteurs peut être complexe, leurs propriétés sont par ailleurs hétérogènes. La classification de ces récepteurs-canaux chez les mammifères en 6 grandes sous-familles contenant 28 récepteurs-canaux a été établie en se fondant sur la séquence primaire en acides aminés plutôt que sur la sélectivité et l'affinité pour les ligands (Vriens J. et coll., 2009) (Vriens J. et coll., 2008) (Yin . et coll J., 2010) :

- 1- les TRPC pour « Canonical » : sous-famille de TRP regroupant 7 récepteurs,
- 2- les TRPM pour « Melastatin » : sous-famille de TRP regroupant 8 récepteurs,
- 3- les TRPV pour « Vanilloid » : sous-famille de TRP regroupant 6 récepteurs,
- 4- les TRPA pour « Ankyrin » : sous-famille de TRP regroupant 1 récepteur,
- 5- les TRPP pour « Polycystin » : sous-famille de TRP regroupant 3 récepteurs,
- 6- les TRPML pour « Mucolipin » : sous-famille de TRP regroupant 3 récepteurs.

Les recherches récentes se concentrent en particulier sur l'étude des trois premières sous - familles : les TRPC, les TRPM et les TRPV. Les autres familles de TRP, les TRPP, les TRPML et les TRPN, ne sont pas encore assez bien caractérisées, surtout en ce qui concerne leur expression et leurs fonctions au sein du système vasculaire (Venkatachalam K. et Montell C., 2007) (Zheng J., 2013) (Kaneko Y. et Szallasi A., 2014).

Les canaux TRP sont des «capteurs cellulaires» (Clapham DE., 2003) qui réagissent aux changements de voltage aussi bien que des changements dans l'environnement cellulaire, notamment la température, l'étirement, la pression, les molécules, l'oxydation/la réduction, l'osmolarité et le pH (Moran MM. et coll., 2011) (Nieto-Posadas A. et coll., 2011). Il est à noter qu'un certain nombre de canaux TRP sont également activés par des molécules issues de produits naturels, tels que des herbes, des épices, des venins, des toxines (Vriens J. et coll., 2008).

Les ions calcium (Ca^{2+}) et sodium (Na^+) sont les principaux cations traversant les TRP ; les ions magnésium (Mg^{2+}) participent également à ce flux mais dans une moindre mesure (Minke B., 2006) (Pedersen SF. et coll., 2005) (Zheng J., 2013).

Au niveau des CMLV, les canaux TRP participent à la régulation de la contractilité ainsi qu'à la prolifération des cellules. Ces mêmes canaux jouent un rôle dans la vasodilatation dépendante de

l'endothélium, la perméabilité des parois vasculaires et l'angiogenèse (Venkatachalam K. et Montell C., 2007) (Numata T. et coll., 2011). Une dérégulation des canaux TRP est associée à certaines pathologies vasculaires, y compris l'hypertension, l'œdème pulmonaire et l'inflammation neurogénique (Earley S. et Brayden JE., 2015). Au niveau des muscles squelettiques, les TRP semblent être impliqués dans diverses fonctions telles que : le développement musculaire, l'entrée du calcium dans la cellule, la réponse à l'étirement, la régulation du transport du glucose. Ils semblent être également impliqués dans des pathologies musculaires telles que la myopathie de Duchenne (Gailly P., 2012) (Kruger J. et coll., 2008).

II.2.6.5.1.1.1. La sous-famille des TRPV

La sous-famille des canaux TRPV contient 6 isoformes : TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPV5, et le TRPV6. Les récepteurs appartenant à cette famille sont activés par des molécules de la famille des vanilloïdes, qui sont des composés qui possèdent un groupe vanillyle dans leur structure. Les vanilloïdes comprennent : l'alcool vanillylique, la vanilline, l'acide vanillique, l'acétovanillon, l'acide vanillylmandélique, l'acide homovanillique, la capsaïcine (Messeguer A. et coll., 2006) (Carleson NR. et coll., 2017).

Les canaux TRPV 1 à 4, sont thermosensibles, et légèrement perméables aux ions Ca^{2+} avec un rapport de perméabilité par comparaison avec les ions Na^{+} de 1 : 10 (Nilius B. et coll., 2004). Par comparaison, les TRPV5 ET TRPV6 sont les seuls canaux de la famille TRP qui sont hautement sélectifs pour le Ca^{2+} , et ils sont fortement régulés par la concentration de Ca^{2+} intracellulaire (Nilius B. et coll., 2000) (Huynh KW. et coll., 2014).

Parmi les TRPV, l'isoforme TRPV4 est exprimé au niveau du muscle lisse et du muscle striés squelettique (Gailly P., 2012). De plus, les études montrent que le canal TRPV4 est associé à des pathologies du muscle lisse et du muscle squelettique. Ainsi, le TRPV4 est associé, d'une part, à une forme familiale de la brachyolmie, une dysplasie squelettique développementale (Rock MJ. et coll., 2008) et d'autre part au développement de l'hypertension pulmonaire (Dahan D. et coll., 2012).

II.2.6.5.1.1.1. Le récepteur TRPV4

Comme les autres récepteurs-canaux TRP appartenant à la sous-famille vanilloïde, les TRPV4 sont des canaux non-sélectifs perméables aux cations Ca^{2+} , Na^+ et Mg^{2+} .

a. Structure

Le canal TRPV4 était identifié dans les CMLV aussi bien que dans les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Yang XR. et coll., 2006) (Earley S. et Brayden JE., 2015). Le gène codant pour TRPV4 contient 15 exons et possèdent 5 variantes d'épissages qui codent 5 pour différentes isoformes connues dans les cellules des mammifères (Fig. 16) (Goldenberg NM. et coll., 2015). Ces 5 homologues TRPV4 des mammifères sont similaires et partagent un degré élevé d'identité de séquence (entre 95% et 98%). Le canal TRPV4 possède, comme tout autre canal TRP, 6 domaines transmembranaires (TM 1-6), et chaque monomère de TRPV4 est constitué de 871 acides aminés. Comme tout autre récepteur-canal TRP, le TRPV4 possède un pore perméable aux cations localisé entre les domaines transmembranaires TM5 et TM6 (Everaerts W. et coll., 2010). La protéine TRPV4 comprend six domaines de répétition ankyrine (ARD pour Ankyrin repeat domain) (Fig. 16) favorisant l'interaction entre le TRPV4 et d'autres protéines intracellulaires : cinq variants (isoformes A, B, C, D et E) de ce canal sont connus, parmi lesquelles deux seulement sont fonctionnels (A et D) (Vennekens R. et coll., 2008) (Nilius B. et coll., 2004) (Everaerts W. et coll., 2010).

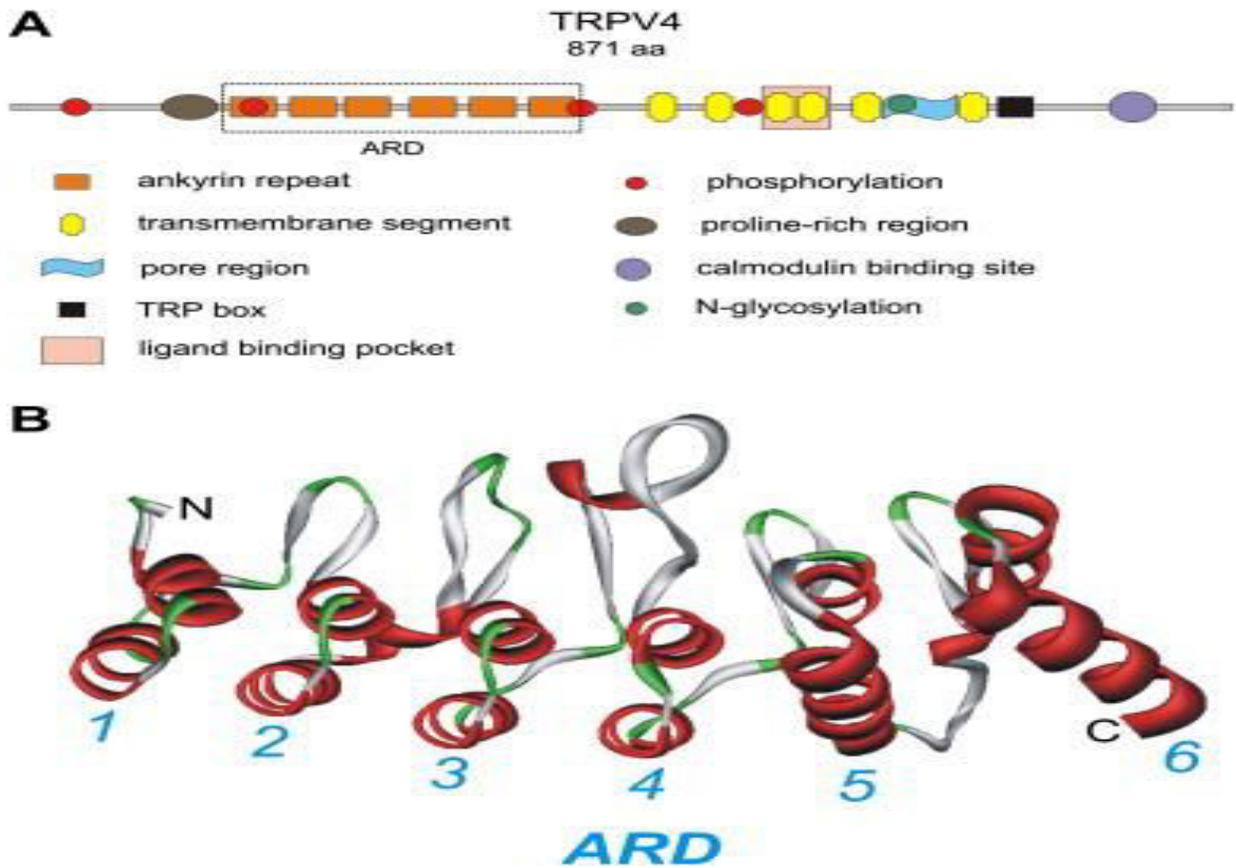


Figure 16 : Identité structurelle de TRPV4. A) Topologie structurelle prédite des domaines TRPV4. B) Modèle de ruban schématisé de la structure cristalline résolue des domaines de répétition ankyrine (ARD) du canal (Everaerts W. et coll., 2010).

b. Rôle physiologique

Les canaux TRPV4 sont beaucoup étudiés car ils sont largement exprimés dans le système cardiovasculaire, au niveau des cellules endothéliales, des fibroblastes cardiaques, des CMLV et des nerfs périvasculaires, ainsi que dans d'autres organes tels que les poumons, les reins, le cerveau, les glandes salivaires, la trachée, le foie, la rate et les testicules (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015) (Robbins N. et coll., 2013). La présence généralisée des canaux TRPV4 dans une variété de cellules du corps reflète l'importance de leurs fonctions physiologiques (Sonkusare SK. et coll., 2012), qui sont liées à leur capacité d'agir comme mécano-senseur, à leur implication dans l'osmo-régulation et à leur rôle fondamental dans le transport ionique (Pedersen SF. et coll., 2005) (Willette RN. et coll., 2008) (Zaninetti R. et coll., 2011).

Le déclenchement de la vasodilatation dépendante du flux sanguin est la fonction physiologique principale liée aux canaux TRPV4 (Bubolz AH. et coll., 2012). Ainsi, les canaux TRPV4,

exprimés au niveau des cellules endothéliales aussi bien qu'au niveau des CMLV des vaisseaux sanguins cette phrase n'a pas de verbe et pas de sens. Une fois que ces derniers sont soumis aux contraintes de cisaillement, les canaux TRPV4 stimulent la production du facteur Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor (EDHF) par les cellules endothéliales. Ce dernier est une substance qui, comme le monoxyde d'azote NO, stimule la vasodilatation endothélium - dépendante des vaisseaux en initiant l'hyperpolarisation et la relaxation des muscles lisses (O'Neil RG. et Heller S., 2005).

Les études sur des souris transgéniques déficientes en TRPV4, montrent que son absence induit une déficience de l'audition (Tabuchi K. et coll., 2005), une sensation de chaleur et de douleur altérée (Lee H. et coll., 2005) (Mizuno A. et coll., 2003) ou une susceptibilité accrue à l'obésité (O'Connor CJ., 2013). D'autres études montrent que les canaux TRPV4 sont exprimés dans les kératinocytes de la peau et peuvent être ainsi associés aux stimuli de la chaleur et de la douleur. Ceci revient au fait que le canal TRPV4 participe (avec le canal TRPV3) principalement à la transmission d'informations (de la température chaude ou de la douleur) des kératinocytes aux terminaisons nerveuses adjacentes grâce à la libération de l'ATP (Mandadi S. et coll., 2009) (Sokabe T. et coll., 2010).

L'activité du canal TRPV4 peut être déclenchée en réponse à des stimuli mécaniques et osmotiques, impliquant ce canal dans l'osmo-régulation, c'est à dire le maintien de l'équilibre hydrique dans le corps (Naumov DE. et coll., 2016). En effet, il existe de nombreux mécanismes effecteurs, hautement spécifiques du type cellulaire, régulant le volume de l'eau dans les cellules déclenchées par des transporteurs de calcium qui sont activés suite au gonflement de ces cellules (Cohen DM., 2007). Dans les cellules épithéliales des voies respiratoires humaines par exemple, la régulation du volume cellulaire après un stress hypotonique ou un gonflement, est associée avec des changements dans les concentrations de Ca^{2+} intracellulaire (Fernandez-Fernandez JM. et coll., 2002). Dans ce type de cellules, le mécanisme d'entrée du calcium (induisant ces changements de concentrations Ca^{2+}) dépend essentiellement du canal TRPV4, qui détecte les changements de la pression osmotique dans leur environnement cellulaire. Ainsi, dans le cas d'un stress hypotonique, le TRPV4 déclenche l'entrée du calcium extracellulaire dans ces cellules épithéliales par l'activation des canaux K^+ (Fernandez-Fernandez JM. et coll., 2002) (Arniges M. et coll., 2004).

Du fait de son rôle essentiel dans la gestion de l'entrée du calcium dans les cellules musculaires

lisses, le canal TRPV4 est associé à la physiologie et aux pathologies cardiovasculaires (Earley S. et coll., 2009) (Rath G. et coll., 2012) (Adapala RK. et coll., 2013) (Parpaite T. et coll., 2016) (Thorneloe KS. et coll., 2012). Concernant la physiologie du système cardiovasculaire, les canaux TRPV4 sont impliqués dans la vasodilatation induite par les contraintes de cisaillement (shear stress) pour maintenir le tonus musculaire, qui constitue la fonction physiologique principale des TRPV4 (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015). Plusieurs études ont été menées pour confirmer leur implication dans cette fonction, ainsi Bubolz et ses collaborateurs ont rapporté que le prétraitement des artérioles avec des antagonistes sélectifs du TRPV4 inhibe significativement la dilatation induite par l'écoulement sanguin dans les artérioles coronaires humain (Bubolz AH. et coll., 2012). D'autre part, chez l'animal, une étude a exploré le rôle fonctionnel des canaux TRPV4 dans la vasodilatation dépendante des contraintes de cisaillement au niveau de l'artère carotide du rat. Ces auteurs ont montré qu'une inhibition de l'activité du canal TRPV4 par un antagoniste supprime cette vasodilatation, ce qui suggère l'implication clé du canal TRPV4 dans la mise en place de cette vasodilatation (Köhler R. et coll., 2006). Ceci rend la dérégulation de l'expression ou de la fonction du canal TRPV4 responsable de troubles du tonus vasculaire, susceptibles d'induire des pathologies cardiovasculaires. Confirmant cette hypothèse, des études des mutations de gène TRPV4 ont montré que ces canaux sont impliqués dans le remodelage cardiaque (Adapala RK. et coll., 2013), dans l'hypertension pulmonaire (Parpaite T. et coll., 2016) (Yang XR. et coll., 2012).

Concernant l'hypertension pulmonaire, une étude montre que l'exposition des rats à l'hypoxie chronique provoque une augmentation de l'expression du cytochrome P450 (CYP450), une enzyme catalysant la production des acides époxy-eicosatriénoïques (EET), à partir de l'acide arachidonique dans les cellules musculaires lisses de l'artère pulmonaire. Les EET sont des activateurs majeurs des canaux TRPV4 (Earley S., 2011) (Garcia-Elias A. et coll., 2014) (Loot AE. et coll., 2008) (Watanabe H. et coll., 2003). Une telle augmentation de CYP450 fait augmenter la génération des EET, qui induit une suractivation des canaux TRPV4 (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015). Ceci induit à son tour une augmentation de Ca^{2+} entrant dans les CML pulmonaires et provoque ainsi une réponse accrue aux stimuli contractiles et induit par conséquent une hypertension pulmonaire (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015) (Parpaite T. et coll., 2016).

Concernant le remodelage cardiaque, une blessure ou un étirement mécanique au niveau du

cœur, conduit à une libération excessive de TGF- β , un facteur de croissance contrôlant plusieurs fonctions cellulaires dont la croissance, la prolifération et la différenciation. La voie de signalisation de TGF- β joue un rôle critique dans la différenciation des fibroblastes cardiaque des myoblastes (Hinz B. et Gabbiani G., 2010) (Adapala RK. et coll., 2013). Le TRPV4 est connu pour être associée à la fonction de TGF- β dans la régulation de cette différenciation suite à une infarction du myocarde (Cappelli H. et coll., 2014). Donc une augmentation de la libération de TGF- β suite à une blessure fait augmenter l'expression et l'activité des canaux TRPV4 (Hinz B. et Gabbiani G., 2010) (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015). Les canaux TRPV4 conduisent à une augmentation de l'influx de Ca^{2+} qui favorise la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et entraînent une fibrose cardiaque (remodelage cardiaque) (Cappelli H. et coll., 2014) (Adapala RK. et coll., 2013).

II.2.6.5.2. Les récepteurs sensibles au calcium des membranes intracellulaires

Le RS est responsable de la majeure partie de l'influx de calcium dans le cytosol (Baró I. et Eisner DA., 1995) (Bolton TB. et coll., 1984), provoquant les variations de concentration du calcium induites par certains agonistes sur les CMLV.

La fonction du RS permet la libération de calcium par les récepteurs de l'inositol -1,4,5-trisphosphate (IP3R) et les récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR) dans le cytosol ainsi que le retour du calcium dans la lumière de l'organite par les pompes Ca^{2+} -ATPases présentes dans sa membrane (SERCA) (Wray S. et Burdyga T., 2010).

L'altération des niveaux d'expression des protéines de transport du calcium dans le RS a une incidence sur les mouvements du calcium intracellulaire des CMLV dans les situations physiologiques ou pathologiques (Searls YM. et coll., 2010). L'importance de ces protéines dans les CMLV est documentée dans plusieurs études, telle que celle réalisée par Vallot et ses collaborateurs, qui ont montré que l'absence du RyR et de la pompe SERCA inhibe la contraction des CMLV (Vallot O. et coll., 2000). En outre, la prolifération des CMLV au niveau des vaisseaux sanguins cérébraux est réduite par la suppression de l'activité de l'IP3R (Wilkerson MK. et coll., 2006).

Nous allons donc nous focaliser dans ce qui suit sur ces protéines de gestion des flux du calcium du RS : RYR, IP3R, SERCA, en détaillant leurs isoformes, leurs structures aussi bien que leurs fonctions dans la contraction des CMLV.

II.2.6.5.2.1. Les récepteurs sensibles à la ryanodine

Les récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR) situés au niveau de la membrane du RS sont des canaux ioniques de libération du Ca^{2+} des réserves intracellulaires vers le cytosol (Guerrero-Hernández A. et coll., 2014). Ils doivent leur nom à la ryanodine, une molécule extraite d'une plante d'Amérique du Sud, *Ryania speciosa*, qui se caractérise par ses propriétés insecticides. La ryanodine interagit préférentiellement avec les RyR dans leur conformation ouverte. Ainsi, on trouve qu'à des faibles concentrations ($<10 \mu\text{M}$), la ryanodine stimule l'ouverture des canaux, ce qui entraîne la libération du calcium du RS et augmente la concentration du calcium cytosolique. En revanche, à de fortes concentrations ($>100 \mu\text{M}$), la ryanodine inhibe l'ouverture de ces canaux. Cette propriété était largement utilisée pour explorer l'état fonctionnel de ce canal (Petegem FV., 2015). Les RyR sont des canaux impliqués dans la gestion du couplage excitation-contraction dans les cellules des muscles striés (squelettiques et cardiaques) et des muscles lisses (Matsuki K. et coll., 2017).

II.2.6.5.2.1.1. Isoformes des RyR

Les RyR sont les canaux ioniques les plus grands connus à ce jour (Zorzato F. et coll., 1990), avec une masse moléculaire qui dépasse les 2,2 MDa. Chez les mammifères, trois isoformes de RyR sont identifiées : RyR1, RyR2, et RyR3 (Petegem FV., 2012), avec 65% d'homologie dans leurs séquences (Lanner JT. et coll., 2010). L'isoforme RyR1 prédomine dans les muscles squelettiques, alors que l'isoforme RyR2 est, quant à elle, majoritaire dans les cardiomyocytes. C'est pour cette raison que les expressions « l'isoforme des muscles squelettiques » et « l'isoforme cardiaque » sont couramment utilisées respectivement pour RyR1 et RyR2 (Petegem FV., 2015). L'isoforme 3 (RyR3), initialement isolé dans le cerveau, est exprimée à des niveaux faibles dans plusieurs types de cellules tels que les cellules musculaires squelettiques, les poumons et le pancréas, mais n'est pas associé à un tissu en particulier où il serait majoritaire (Hakamata Y. et coll., 1992). Il n'existe pas une isoforme prédominante de RyR dans les muscles

lisses, les 3 isoformes (RyR1, RyR2 et RyR3) sont présentes dans ce tissu (Wray S. et Burdyga T., 2010). Les RyR sont aussi mis en évidence dans d'autres types de cellules comme les neurones, les lymphocytes, et les cellules épithéliales (Petegem FV., 2015).

II.2.6.5.2.1.2. Structure des RyR

Globalement, la structure du canal-récepteur RyR ressemble à la forme d'un champignon (Fig. 17), avec environ 80% de la masse de cette protéine qui se trouve dans le cytosol (ayant une forme de chapeau du champignon) et les 20% restants étant intégrés au niveau de la membrane du reticulum sarco/endoplasmique (ayant une forme de pied du champignon) (Zalk R., 2014). L'architecture des RyR consiste en quatre protomères entourant un pore transmembranaire central qui coïncide avec l'axe de symétrie de cet homo-tétramère. Chaque protomère (sous-unité du tétramère) est constituée de 5000 acides aminés (Ngo VA. et coll., 2017) (~ 4 × 5000 résidus) avec 6 régions transmembranaires (TM) et cytoplasmiques chacun (Yan Z. et coll., 2015) (Lanner JT. et coll., 2010). Le pore transmembranaire central (qui contient un filtre de sélectivité permettant le passage des ions), relie le côté luminal du RS avec le cytosol (Hamilton SL. et Serysheva II., 2009) (Yan Z. et coll., 2015) (Ngo VA. et coll., 2017). Les domaines cytoplasmiques clés du récepteur RyR, qui sont des domaines régulateurs de sa fonction, forment un assemblage cytosolique qui est relié au pore via une structure α -solénoïde (α -solenoid scaffold) (Zalk R. et coll., 2014) (Ngo VA. et coll., 2017). La structure α -solénoïde consiste en des domaines protéiques formés par une chaîne de plis presque identiques, souvent appelés "répétitions". Cette structure est trouvée dans presque tous les types de protéines. En plus de l'assemblage cytosolique, les RyR contiennent un domaine unique inséré entre les deuxième et troisième protomères transmembranaires qui interagit intimement avec des mains-EF (EF-hands) provenant de cette structure α -solénoïde, suggérant un mécanisme par lequel le Ca^{2+} peut induire l'ouverture de ce canal. Il est à noter que les mains-EF sont des domaines structuraux hélice-boucle-hélice trouvés classiquement dans une large variété de protéines liant le calcium (Zalk R. et coll., 2014) (Yan Z. et coll., 2015).

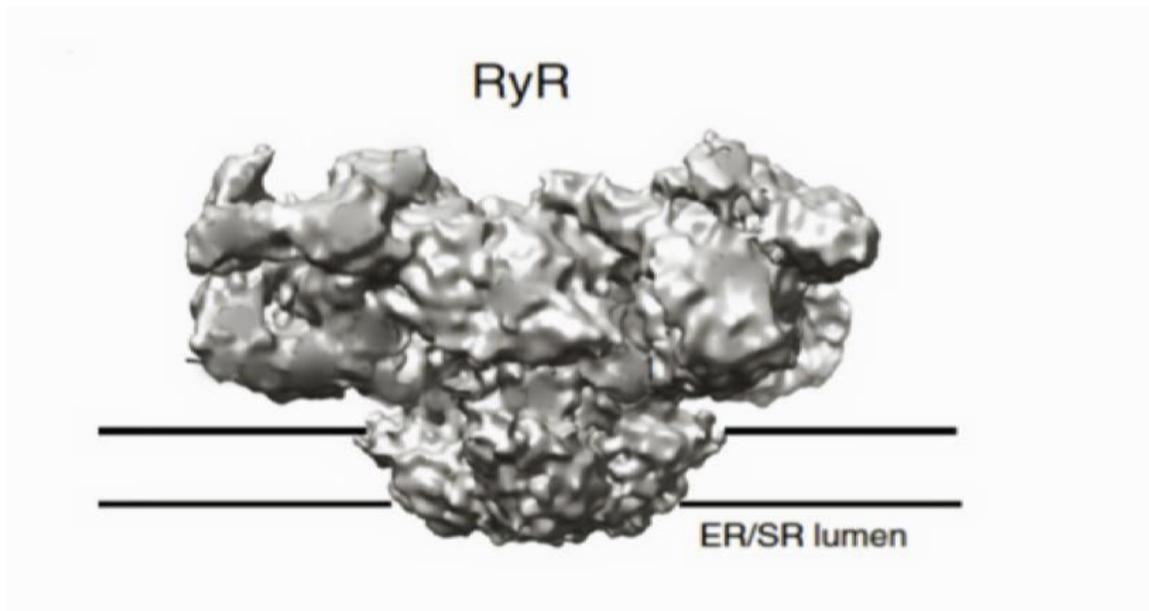


Figure 17 : Image montrant la structure de RyR1 reconstituée à partir d'une image issue de la cryo-microscopie électronique avec résolution à 9,6 Å (Petegem FV., 2012).

II.2.6.5.2.1.3. Fonctions des RyR

Le Ca^{2+} est l'un des signaux qui stimule l'ouverture des RyR. La relation entre l'ouverture des RyR et le Ca^{2+} est modulée de plusieurs façons : ainsi, des niveaux élevés de Ca^{2+} cytosolique déclenchent la fermeture des RyR, tandis que le Ca^{2+} de la lumière du RS peut aussi activer les RyR depuis leur lieu de stockage (Chen W. et coll., 2014) (Petegem FV., 2012) (Hamilton SL. et Serysheva II., 2009).

Les RyR1 et RyR2 ont été impliqués dans plusieurs troubles génétiques graves du cœur ou du tissu musculaire squelettique. Les mutations de RyR2 sont liées à la tachycardie ventriculaire polymorphe catécholaminergique (Laitinen PJ. et coll., 2001), alors que les mutations de RyR1 sont liées principalement à l'hyperthermie maligne (MacLennan DH. et Phillips MS., 1992) et à la myopathie congénitale à cores centraux, est une affection neuromusculaire héréditaire qui doit son nom à l'aspect au microscope du muscle. Les cores sont des petites zones cellulaires caractérisées par des lésions rondes au centre de la fibre musculaire visibles sur la biopsie musculaire et à l'origine des manifestations cliniques d'une myopathie congénitale (Zhang Y. et coll., 1993).

Au niveau des muscles lisses et striés, les RyR transforment, avec les canaux calcium voltage-dépendants de type L, le signal électrique (la dépolarisation de la membrane plasmique) en un

signal chimique par la libération des ions Ca^{2+} intracellulaires et participent ainsi au couplage excitation-contraction (Zalk R. et coll., 2007) (Petegem FV. et coll., 2015) (Mackrill JJ., 2012) (Amador FJ. et coll., 2013).

II.2.6.5.2.1.4. Le rôle des RyR dans les muscles lisses

Une propriété importante fait de la ryanodine une molécule de choix pour examiner l'état d'ouverture des RyR au repos : en effet, la ryanodine reconnaît et se lie aux RyR seulement lorsqu'ils sont dans leur conformation ouverte, et bloque ces derniers dans cet état (Guerrero-Hernández A. et coll., 2014). Il est bien démontré que les RyR sont impliqués dans l'amplification transitoire de la concentration cytosolique du Ca^{2+} produite à la fois par l'ouverture des canaux calciques voltage-dépendant (CCVD) membranaires et par la libération du Ca^{2+} par l'IP3R dans les certains muscles lisses (Guerrero-Hernández A. et coll., 2002) (Kotlikoff ML. et coll., 2002) (Marx SO., 2005). Quand aux muscles lisses vasculaires, ils expriment les 3 isoformes de RyR : RyR1, RyR2 et RyR3. Mais la régulation du couplage excitation-contraction se fait principalement via l'activation de RyR1 et RyR2 (Essin K. et Gollasch M., 2009). Ces récepteurs sont activés par le Ca^{2+} et peuvent agir comme des amplificateurs des petits signaux Ca^{2+} provenant de l'influx de Ca^{2+} extracellulaire ou de sa libération des réserves intracellulaires induite par l'Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) (Del Valle-Rodríguez A. et coll., 2003) (Westcott EB. et coll., 2012). Cette amplification, connue sous le nom de «libération de Ca^{2+} induite par Ca^{2+} » (CICR), induit la mobilisation de grandes quantités de Ca^{2+} du RS dans le cytosol et elle joue un rôle important dans le couplage excitation-contraction dans le muscle lisse (Li X. et coll., 2005). Le CICR lié aux RyR peut également moduler les étincelles (sparks) de Ca^{2+} , qui sont des petites libérations locales de calcium qui activent les canaux K^+ sensible au Ca^{2+} (Mukherjee S. et coll., 2013). Ceci entraîne une hyperpolarisation membranaire et une fermeture des canaux calciques voltage-dépendants (Nelson MT. et coll., 1995) (Croisier H. et coll., 2015). Ainsi, la libération de calcium induite par les canaux RyR à partir des réserves du RS peut être régulateur positif ou négatif du couplage excitation-contraction au niveau du muscle lisse vasculaire (Tykocki NR. et coll., 2013) (Kotlikoff ML. et coll., 2002) (Croisier H. et coll., 2015).

II.2.6.5.2.2. Les canaux IP3R

Les IP3R sont ubiquitaires et sont les principaux acteurs des élévations de Ca^{2+} intracellulaires générées par la libération des d'ion Ca^{2+} à partir des réservoirs intracellulaires (Egorova PA. et Bezprozvanny IB., 2017). Les RyR sont exprimés au niveau de la membrane du RS avec des récepteurs de l'inositol-1, 4,5-trisphosphate (IP3R), qui constituent une autre classe de canaux de libération du calcium de ses réserves intracellulaires. Les IP3R se trouvent d'une façon prédominante (mais non-exclusive) dans la membrane du RS, ou RE dans les cellules non-musculaires (Alzayady KJ. et coll., 2015) (Mikoshiha K., 2007).

L'implication des IP3Rs dans plusieurs fonctions physiologiques a été confirmée par des études sur des souris déficientes en IP3Rs. Ces dernières avaient développé des anomalies sévères telles que la réduction de la fonction cardiaque et la déformation des ostéoclastes (les macrophages des os) (Lin Q. et coll., 2016) et des maladies dont l'ataxie, l'épilepsie (Matsumoto M. et coll., 1996), une sécrétion exocrine défectueuse ainsi que, dans certains cas, des leucémies lymphoblastiques touchant les lymphocytes T (Ouyang K. et coll., 2014).

II.2.6.5.2.2.1. Isoformes des IP3R

Trois isoformes d'IP3R sont exprimés dans les cellules des mammifères : IP3R1, IP3R2 et IP3R3 (Iwai M. et coll., 2005) (Foskett JK. et coll., 2007) (Narayanan D. et coll., 2012), qui forment des canaux calcium homo-tétramériques ou hétéro-tétramériques. Les 3 isoformes d'IP3R son encodées par 3 gènes différents : *Itp1*, *Itp2*, et *Itp3*.

Malgré la grande similarité que présentent ces 3 isoformes dans leurs séquences, entre 60-80% d'homologie dans leurs séquences d'acide aminés (Ivanova H. et coll., 2014), chacune d'entre elles diffère de l'autre par son degré d'affinité à l'IP3 (Chandrasekhar R. et coll., 2016).

Les études *in-vitro* révèlent que l'IP3R1 a une affinité intermédiaire pour l'IP3 et qu'il génère des oscillations de Ca^{2+} plus irrégulières que celles produites par l'IP3R2 (Taylor CW. et Tovey SC., 2010). Au niveau des cellules Sf9 (initialement isolées du tissu ovarien) chez la souris, les constantes d'association intrinsèques (qui définissent l'affinité avec IP3) sont estimés à $3,5 \times 10^7$, $1,7 \times 10^8$ et $3,4 \times 10^6$ (M^{-1}) pour IP3R1, IP3R2 et IP3R3 respectivement (Iwai M. et coll., 2007) (Tu H. et coll., 2005).

Les CMLV expriment les trois isoformes d'IP3R, avec des niveaux relatifs de chacune qui dépendent du tissu d'origine et du stade de développement (Narayanan D. et coll., 2012). L'isoforme IP3R1 est l'isoforme prédominant exprimé dans les CMLV des mammifères (Grayson TH. et coll., 2004) (Islam MO. et coll., 1996) (Morel JL. et coll., 2003) (Wang Y. et coll., 2001) (Zhao G. et coll., 2008) (Zhou H. et coll., 2008). Les résultats de PCR quantitative, réalisée sur des CMLVs isolées à partir de l'artère cérébrale de rats, montrent que l'ARNm de l'IP3R1 est le plus abondant parmi les trois isoformes, avec 82% du total des ARNm d'IP3R. De même, l'IP3R1 est l'isoforme majeure détectée dans les artères mésentériques, l'aorte thoracique, ainsi que dans les CMLVs extraites de la veine porte en culture et les cellules A7r5 (lignée de CMLV aortique du rat) (Grayson TH. et coll., 2004) (Islam MO. et coll., 1996) (Morel JL. et coll., 2003) (Tasker PN. et coll., 2000) (Wang Y. et coll., 2001) (Zhou H. et coll., 2008).

II.2.6.5.2.2. Structure des IP3R

Les canaux IP3R sont des tétramères, chacune de leurs sous-unités ayant un poids moléculaire de 300 kDa. La structure globale des IP3R ressemble à celle des RyR (Fig. 18). Les 3 isoformes d'IP3Rs possèdent la capacité de former des hétéro-tétramères (Sato C. et coll., 2004), dont chaque monomère est formé de 2700 acides aminés (Bezprozvanny I., 2005).

L'isoforme IP3R1 dans son état de repos est utilisée comme référence pour définir la structure des IP3Rs (Sun MY. et coll., 2017). Sa structure consiste en 4 sous-unités organisées autour d'un axe central. Chaque sous-unité est constituée de deux domaines β en trèfle (β - TF1 et β - TF2), trois plis solénoïde armadille (ARM1-ARM3) (une structure armadille est une structure constituée d'une quarantaine d'acides aminés organisés en une séquence répétitive), un domaine α -hélicoïdal, un domaine latéral, six hélices α (TM1–TM6), un domaine C terminal, et un domaine de liaison hélicoïdale (Taylor CW. et Konieczny V., 2016) qui relie les sites transmembranaire et cytosolique de chaque sous-unité.

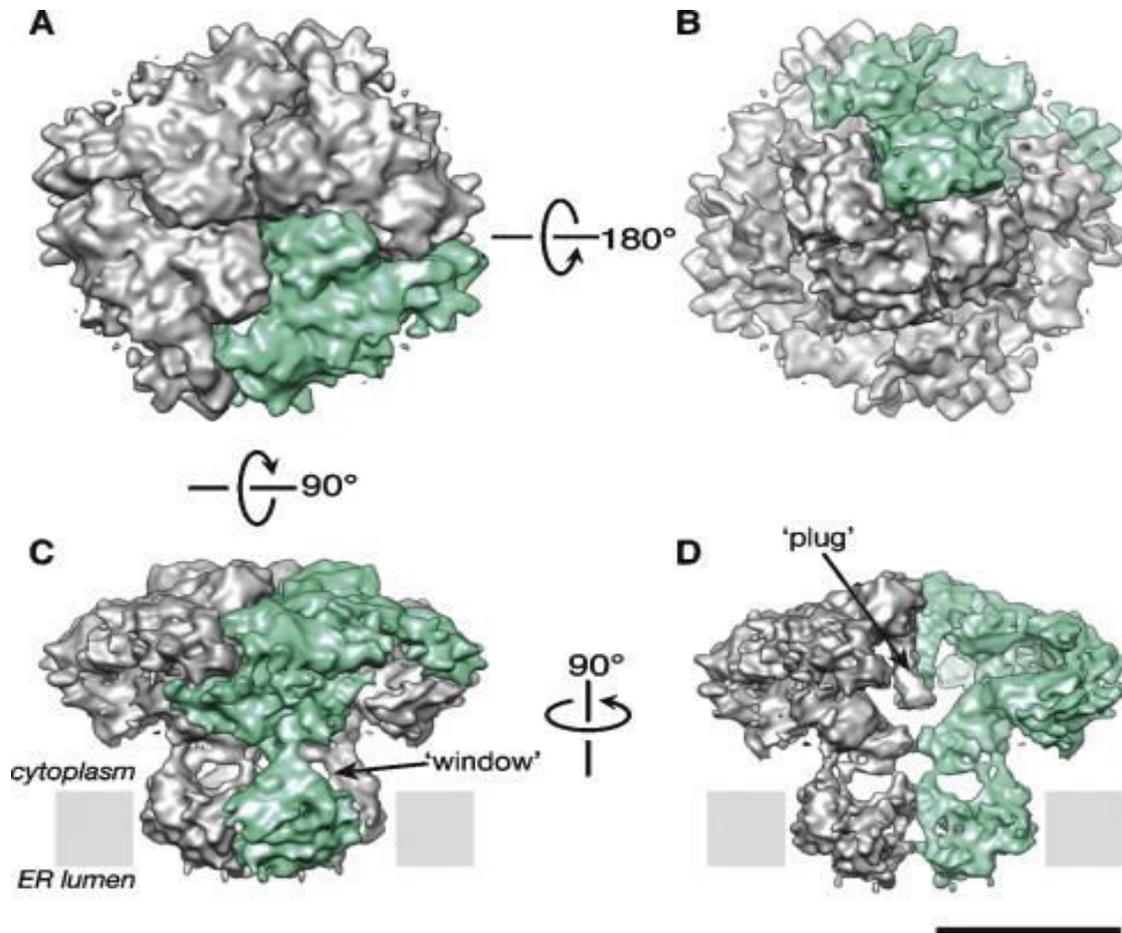


Figure 18 : La structure 3D du canal IP3R1 tétramérique déterminée par cryo-microscopie électronique. La représentation de surface de cette structure est montrée dans trois vues orthogonales : du côté cytoplasmique (A), du côté luminal (B) et le long du plan membranaire (C, D). Une sous-unité putative est représentée en couleur ; (D) deux sous-unités opposées sont montrées pour permettre la visualisation des caractéristiques internes dans la structure de canal. La barre d'échelle représente 100 Å (Serysheva II., 2014).

II.2.6.5.2.2.3. Fonctions des IP3R

L'IP3 se lie à l'IP3R et déclenche l'ouverture du canal, causant ainsi la libération du calcium du RS (ou RE dans les cellules non-musculaires) vers le cytosol, ainsi que l'entrée du calcium à travers la membrane plasmique dans certains types de cellules du système immunitaire : lymphocytes B et T (Ramos-Franco J. et coll., 2000) (Akimzhanov AM. et Boehning D., 2012). Les signaux générés par l'IP3R lors de la libération/entrée du calcium dans le cytosol sont indispensables pour la régulation de différents processus cellulaires (Vervloessem T. et coll., 2015), dont la prolifération, la différenciation, le métabolisme, la sécrétion et la mémoire

cellulaire (Parys JB. et coll., 2012). De plus, les IP3R jouent un rôle important, avec les RyR, dans le couplage excitation-contraction des cellules musculaires lisses et striées.

II.2.6.5.2.3. Les pompes SERCA

Les pompes SERCA sont des Ca^{2+} -ATPases du RS connues sous le nom de *Sarco-plasmique/Endoplasmic Reticulum Calcium Atpase*.

Ces pompes sont essentielles pour le fonctionnement du RS, surtout lors de la relaxation des muscles.

II.2.6.5.2.3.1. Isoformes de SERCA

Les SERCA sont les seuls transporteurs actifs du Ca^{2+} depuis le cytosol vers le réticulum sarco/endoplasmique (Chemaly ER. et coll., 2018). Les protéines SERCA sont codées par 3 gènes, Atp2A1, Atp2A2 et Atp2A3, qui sont localisés sur 3 chromosomes différents. Un épissage alternatif de ces gènes produit au moins 13 variétés d'ARNm codant pour les différentes isoformes de SERCA (Chemaly ER. et coll., 2018). Ainsi, on distingue 3 isoformes provenant de l'épissage du gène Atp2A1 : SERCA1a, SERCA1b, et SERCA1c. De même pour le gène Atp2A2, l'épissage alternatif résulte en 4 isoformes nommées SERCA2a, SERCA2b, SERCA2c, SERCA2d et finalement pour le gène Atp2A3, les 6 isoformes résultant de l'épissage alternatif sont : SERCA3a, SERCA3b, SERCA3c, SERCA3d, SERCA3e, et SERCA3f (UniProt, 2018). Une large variété d'isoformes de SERCA est spécifique des espèces et des tissus (Chemaly ER. et coll., 2013). En effet, l'isoforme SERCA1a est exprimée dans les muscles squelettiques adultes et néonataux, l'isoforme SERCA2a est exprimée dans les muscles cardiaques, l'isoforme SERCA2b est exprimée dans les muscles lisses (Bobe R. et coll., 2005), alors que l'isoforme SERCA3a est trouvée en co-expression avec l'isoforme SERCA2b dans les cellules endothéliales des poumons et les neurones Purkinje du cervelet (Periasamy M. et Kalyanasundaram A., 2007). Les isoformes SERCA2 et SERCA3 sont aussi identifiées dans le muscle lisse (Johny JP. et coll., 2017).

La structure des isoformes de SERCA est hautement conservée, avec plus de 75% d'homologie entre les protéines SERCA1, SERCA2 et SERCA3 (Periasamy M. et Kalyanasundaram A., 2007) (Dally S. et coll., 2010). L'isoforme SERCA2a, aussi nommée "isoforme cardiaque", est exprimée dans les muscles cardiaques, les muscles squelettiques à contraction lente et les cellules

musculaires lisses, alors que l'isoforme SERCA2b est exprimée dans tout type de cellule musculaire et non-musculaire (Periasamy M. et Kalyanasundaram A., 2007).

Les SERCA2a et SERCA2b diffèrent uniquement par 49 acides aminés supplémentaires, qui constituent une boucle transmembranaire supplémentaire de SERCA2b dans le RS (Greene AL. et coll., 2000).

Dans le muscle squelettique, les trois gènes SERCA sont simultanément exprimés (Chemaly ER. et coll., 2013). L'isoforme majeure dans les fibres musculaires squelettiques à contraction rapide est la SERCA1a, suivi par SERCA2a, plus spécifique des muscles squelettiques à contraction lente (Berchtold MW. et coll., 2000).

Faisant partie des éléments constituant la membrane du RS, SERCA représente jusqu'à 90% des protéines du RS et possède une haute affinité pour le Ca^{2+} (Orallo F., 1996) (Stammers NA. et coll., 2015). Cette affinité des isoformes de SERCA pour le calcium n'est cependant pas toujours la même : $2b > 2a = 1 > 2c > 3$ (Lipskaia L. et coll., 2013). Dans les muscles, l'affinité des SERCA aux ions calcium est responsable de l'abaissement de la concentration de calcium intracellulaire à 10^{-7} M et ainsi provoque une relaxation musculaire (Chemaly ER. et coll., 2013).

Enfin, l'affinité des SERCA pour le calcium est réduite par deux protéines membranaires intrinsèques exprimées dans le RS : la phospholamban (PLN) et la sarcopiline (SLN) et qui se lient au même site de liaison régulatrice de SERCA (MacLennan DH. et Phillips MS., 1992).

II.2.6.5.2.3.2. Fonctions des SERCA

Au niveau des muscles squelettiques, une diminution du re-pompage du Ca^{2+} par le RS est liée à la réduction de l'activité des pompes Ca^{2+} -ATPase du RS, qui provoque une maladie héréditaire humaine du muscle très rare connue sous le nom de maladie de Brody (Chemaly ER. et coll., 2013). Les patients souffrent de troubles de la relaxation musculaire. La réduction de l'activité de re-pompage de calcium par le RS peut être associée à une mutation du gène SERCA1 conduisant à l'absence de l'expression de la protéine SERCA1 (Schulte L. et coll., 1994).

Au niveau des muscles cardiaques, la pompe SERCA2a joue un rôle clé dans le couplage excitation-contraction. Une diminution de son expression est liée à l'insuffisance cardiaque, chez l'animal ainsi que chez les patients (Shanks J. et coll., 2017). De même, chez l'Homme, une augmentation du niveau de l'expression de l'isoforme SERCA3f, provenant de l'épissage alternatif du gène ATP2A3, est observée dans l'insuffisance cardiaque, ainsi que dans le stress du

réticulum endoplasmique (RE) au niveau des cellules non-musculaires (Chemaly ER. et coll., 2013). Ce stress est dû à l'accumulation des protéines mal conformées dans le RE et, comme ceci est associé à l'insuffisance cardiaque, une relation intéressante peut être faite entre l'augmentation de l'expression de SERCA3f dans l'insuffisance cardiaque, l'augmentation parallèle des marqueurs de stress du RE et la capacité de SERCA3f à induire le stress du RE (Dally S. et coll., 2010) (Periasamy M. et Kalyanasundaram A., 2007).

II.2.6.5.2.3.3. Structure des SERCA

Comme pour toute autre protéine, la structure des SERCA est adaptée à sa fonction. Ainsi, SERCA possède une bande hydrophobe autour de sa partie extérieure (non-polaire) qui se trouve dans la membrane du RS, car elle interagit plus favorablement avec les chaînes d'acides gras non-polaires qu'avec la lumière du RS qui est de nature aqueuse (Sacchetto R. et coll., 2012). La protéine SERCA, est divisée en quatre domaines fonctionnels et se caractérise par la présence d'une série de dix hélices α dans sa structure (Olesen C. et coll., 2007). Ces quatre domaines sont désignés par M, N, P et A (Fig. 19). Le domaine M est le seul domaine de SERCA qui se trouve dans la section transmembranaire, entre le cytoplasme et la lumière du RS. C'est ce domaine qui est constitué des hélices α (10 hélices : M1-M10) et il est encore nommé domaine transmembranaire. Les trois autres domaines se trouvent dans le cote cytosolique et sont comme suit : le domaine A, qui est le domaine actionneur, le domaine N, qui est le domaine de liaison nucléaire et le domaine P qui est le domaine de phosphorylation (Wuytack F. et coll., 2002). Situés dans le sarcoplasme, les domaines N, P et A sont fonctionnellement associés principalement à l'hydrolyse de l'ATP. Ces 3 domaines consistent en une combinaison d'hélices α et de feuillets β (Toyoshima C. et coll., 2000).

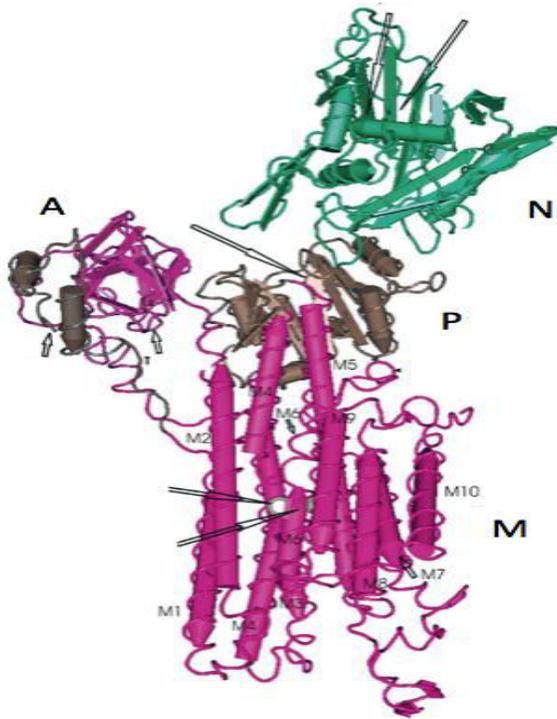


Figure 19 : Les domaines structuraux de la pompe Ca^{2+} -ATPase du réticulum sarcoplasmique SERCA (Wuytack F. et coll., 2002).

Le système cardiovasculaire contient la partie du système musculaire la plus touchée par des pathologies chroniques car en interaction directe avec les changements de notre environnement et de notre mode de vie. Après description du système cardiovasculaire, de ces composants vasculaires et de sa physiologie, nous nous intéresserons donc ensuite à son étude dans le cas de pathologies cardiovasculaires.

II.3. Plasticité musculaire dans les situations physiopathologiques

Des conditions environnementales néfastes, comme par exemple l'exposition à l'hypoxie, l'inactivité physique, etc., entraînent un déconditionnement musculaire, qui est par définition, un ensemble complexe de changements physiologiques qui parviennent suite à une période d'inactivité et qui entraîne une perte des capacités fonctionnelles nécessaires pour accomplir les activités de la vie quotidienne. Ce déconditionnement se traduit par des changements moléculaires et cellulaires qui aboutissent à des situations physiopathologiques surtout au niveau

du système cardiovasculaire, qui est particulièrement touché par les conditions environnementales. Nous allons donc présenter dans ce qui suit les maladies cardiovasculaires, leur prévalence, aussi bien que leurs facteurs de risque. Nous monterons ensuite le lien entre ces maladies et le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), et notamment l'impact de l'hypoxie intermittente générée par le SAOS. Enfin, nous présenterons l'effet de l'entraînement physique dans la prévention de la survenue des maladies cardiovasculaires.

II.3.1. Santé publique et maladies cardiovasculaires, SAOS, obésité

Les maladies chroniques constituent la toute première cause de mortalité dans le monde. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), ces maladies sont définies comme des affections de longue durée qui, en règle générale, évoluent lentement et sont responsables de 63% des décès globaux. La prévalence des maladies chroniques est actuellement en augmentation du fait de leur relation avec le mode de vie de l'Homme (World Health Organization – CVDs, 2016).

Parmi ces maladies, nous pouvons distinguer : le syndrome d'apnée obstructive du sommeil (SAOS), l'obésité, le diabète de type 2, les maladies cardiovasculaires (MCV) dont : les accidents vasculaires cérébraux et l'athérosclérose, la maladie d'Alzheimer. Ces pathologies sont liées à plusieurs facteurs, tels que le tabagisme, l'inactivité physique, l'abus d'alcool, l'obésité, les régimes alimentaires trop riches, la pollution et d'autres facteurs environnementaux (Heart UK, 2016). La plupart des MCV peuvent être évitées en s'attaquant à ces facteurs de risque comportementaux (Cardiovascular Disease Risk Factors | World Heart Federation, 2017).

Les MCV sont responsables d'un nombre très élevé de décès dans le monde. Selon le rapport de l'OMS publié en 2016 (World Health Organization, 2016), environ 17,5 millions de personnes sont décédées de maladies cardiovasculaires durant l'année 2013 (Fig. 20), ce qui représentent 31% de tous les décès dans le monde. Plus des trois quarts des décès dus aux MCV ont lieu dans les pays à revenu faible et intermédiaire (World Health Organization, 2016).

Le rapport de l'OMS révisé en Septembre 2016 montre que 82 % des 16 millions de décès de personnes âgées de moins de 70 ans dus à des maladies chroniques qui surviennent dans les pays à revenu faible et moyen dont 37% sont causés par des maladies cardiovasculaires.

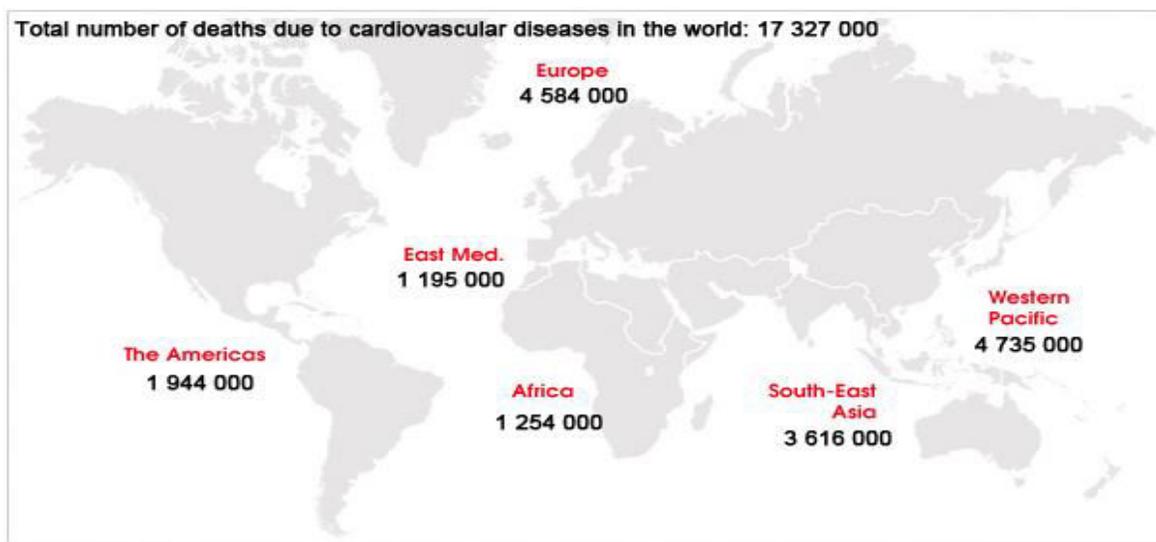


Figure 20 : Carte mondiale montrant la distribution mondiale des 17,3 millions de morts dues aux maladies cardiovasculaires selon le rapport de l'organisation mondiale de la santé (Global facts | World Heart Federation, 2016).

En Europe, les MCV causent plus de la moitié de la totalité des décès (Wilkins E., 2017). Ils représentent 11 fois la totalité de la morbidité causée par le sida, la tuberculose et le paludisme réunis (Townsend N. et coll., 2016).

Le nombre de décès causés par les MCV chez les femmes (2,2 millions) est plus élevé que les hommes (1,8 millions) avec un pourcentage de 49% du total des décès chez les femmes et 40% du total des décès chez les hommes (Fig. 21) (Townsend N. et coll., 2016).

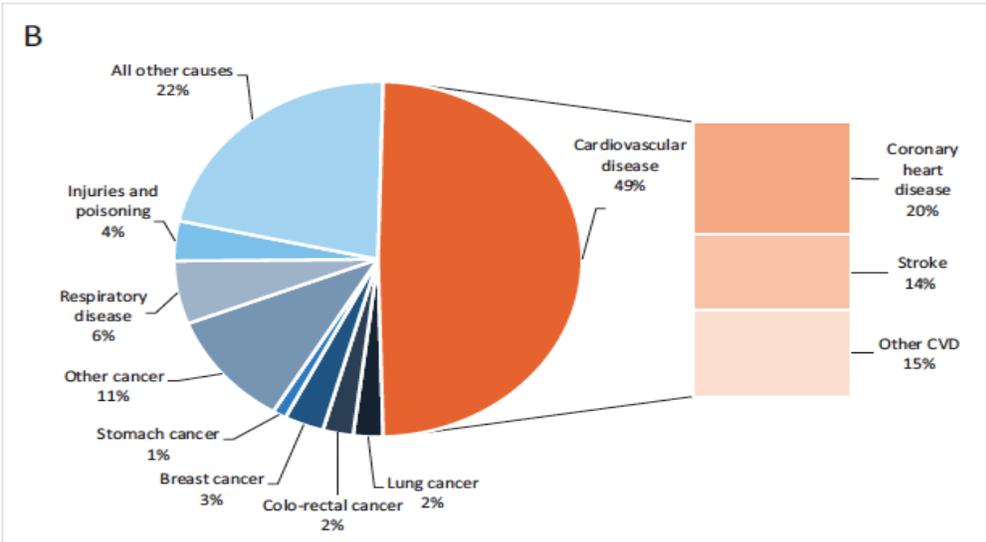
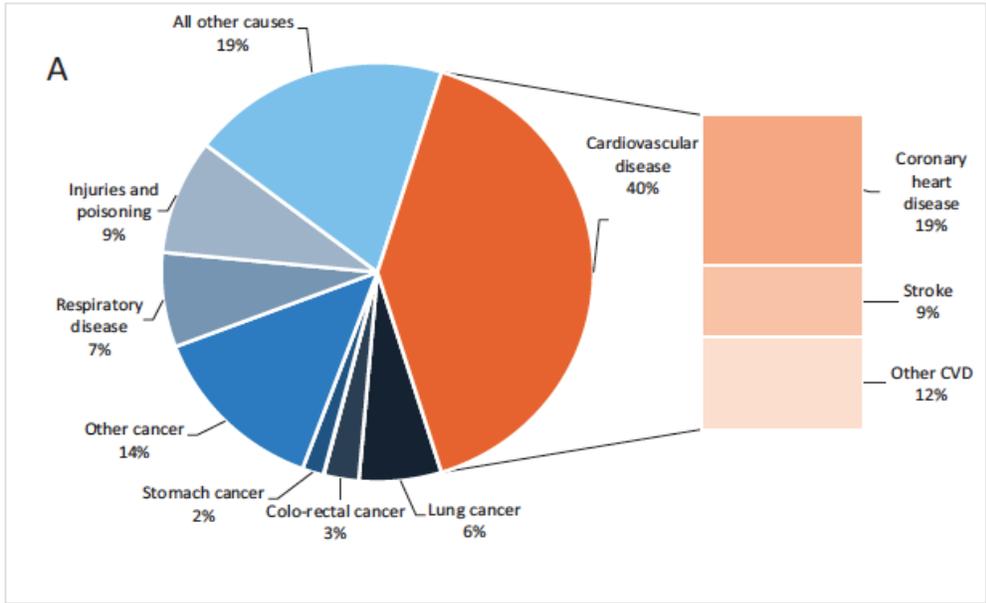


Figure 21 : Répartition des causes de mortalité chez les hommes (A) et les femmes (B) en Europe (Townsend N. et coll., 2016).

Dans son rapport concernant la région de la méditerranée orientale, l’OMS estime que 54% des décès dus aux maladies non-transmissibles (chroniques) dans cette région sont associés à des MCV.

Au Liban, les MCV sont responsables en moyenne de 47% des décès liés aux maladies non transmissibles (Fig. 22) (World Health Organization, 2014). La haute prévalence des MCV est due à un mode de vie sédentaire et à des facteurs de risque communs tels que l'hypertension (dont la prévalence va de 28% (valeur minimale) aux Émirats arabes unis à 41% (valeur

maximale) en Libye et au Maroc), le diabète (dont la prévalence va de 4% (valeur minimale) en Iran à 19% (valeur maximale) au Soudan) et l'hypercholestérolémie (dont la prévalence va de 14% au Liban à 52% (valeur maximale) en Iran) (Cardiovascular Disease By Country | World Heart Federation, 2017).

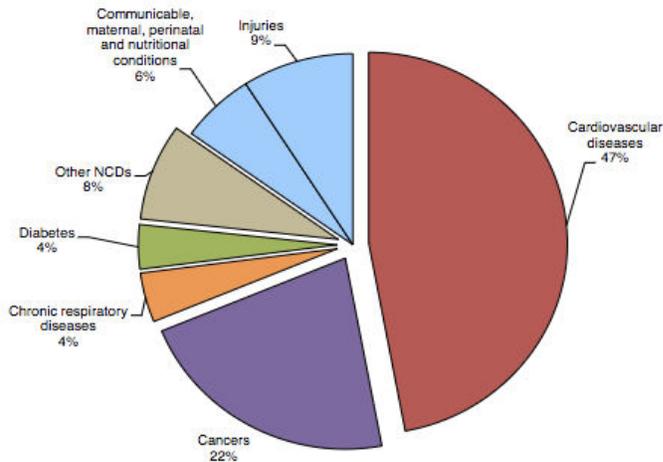


Figure 22 : Répartition des causes de mortalité (de tout âge, dans les deux sexes) au Liban tiré du rapport de l'organisation mondiale de santé en 2014 (World Health Organization, 2014).

Après avoir présenté les MCV comme la première cause de mortalité en Europe et au Moyen-Orient, nous allons présenter dans ce qui suit les MCV les plus courantes et leur association avec le SAOS. Ensuite nous détaillerons les caractéristiques du SAOS et de l'hypoxie intermittente, la conséquence majeure du SAOS, dans le but de comprendre la physiopathologie de ce syndrome et sa contribution aux complications vasculaires par son effet sur les voies de signalisation du calcium. Enfin, nous présenterons les effets bénéfiques sur le système musculaire de l'entraînement physique intensif comme une méthode de traitement non-pharmacologique des pathologies et complications musculaires induites par le SAOS.

II.3.1.1. Les maladies cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires concernent des troubles du cœur et des vaisseaux sanguins et comprennent :

- Les maladies coronariennes, qui sont des maladies qui touchent les artères coronaires alimentant le muscle du cœur. Elles sont souvent causées par l'athérosclérose, qui est une

accumulation de plaques d'athérome à l'intérieur de la paroi des artères. Ceci réduit peu à peu le diamètre des artères et diminue le flux sanguin. L'endommagement des plaques d'athérome favorise la formation de caillots sanguins qui aggravent l'obstruction des artères ; ceci amène éventuellement à l'infarctus du myocarde (communément appelé crise cardiaque), qui entraîne la destruction partielle du muscle cardiaque (Andreadis EA., 2016) (Papageorgiou N. et coll., 2016).

- Les maladies cérébrovasculaires, qui sont des maladies qui touchent les vaisseaux alimentant le cerveau ; elles sont dues à un problème vasculaire tel que la rupture ou l'occlusion d'une artère (ou d'une veine). Ces maladies constituent l'ensemble des atteintes vasculaires cérébrales cliniquement caractérisées par l'apparition d'un déficit neurologique brutal. Cet événement, à l'origine d'un dysfonctionnement temporaire ou définitif d'une des régions du cerveau, est communément appelé accident vasculaire cérébral (World Health Organisation - Fact sheet, 2015) (Papageorgiou N., 2016).

- Les artériopathies périphériques, qui sont des maladies affectant les artères des bras et des jambes, et aboutissant à une diminution voire à un arrêt de la circulation dans les artères concernées : ceci est due à l'accumulation de dépôts de lipides (conduisant à des plaques d'athérome) dans la paroi des artères. Ces maladies accentuent le risque d'apparition d'autres MCV (infarctus de myocarde, accident vasculaire cérébral). En effet, les personnes atteintes d'artériopathie périphérique sont deux à six fois plus susceptibles de décéder à cause d'un infarctus du myocarde ou d'un accident vasculaire cérébral (American Heart Association, 2018) (Andreadis EA., 2016).

- Les cardiopathies rhumatismales, qui sont des maladies affectant le muscle et les valves cardiaques et sont dues à rhumatisme articulaire aigu, causé par une bactérie de type streptocoque. La cardiopathie rhumatismale peut provoquer des accidents cérébrovasculaires, une insuffisance cardiaque congestive grave (une maladie chronique du cœur qui survient lorsque le cœur ne peut plus pomper le sang normalement) et la mort (American Heart Association, 2018) (Papageorgiou N., 2016).

- Les malformations cardiaques congénitales, qui sont des malformations de la structure du cœur ou des vaisseaux associées présentes dès la naissance. Ces malformations sont très diverses, allant des anomalies bénignes (permettant la croissance de l'enfant sans aucun problème)

jusqu'aux anomalies cancéreuses (entraînant la mort du nouveau-né) (World Health Organisation - Fact sheet, 2015).

- Les thromboses veineuses profondes, qui sont des obstructions des veines des jambes par un caillot sanguin, susceptibles de se libérer et de migrer vers le cœur ou les poumons, entraînant des complications graves dont les embolies pulmonaires (World Health Organisation - Fact sheet, 2015) (American Heart Association, 2018) (Papageorgiou N., 2016) (Andreadis EA., 2016).

Cette liste n'est pas exhaustive, mais elle nous donne une idée de la diversité et de la complexité des troubles qui peuvent toucher le système cardiovasculaire. Quatre décès sur cinq dus à des MCV sont attribués à l'infarctus du myocarde et à des accidents vasculaires cérébraux. Les individus à risque de MCV présentent une pression artérielle élevée, un taux de glucose et de lipides également élevés dans le sang ainsi que des problèmes de surpoids ou d'obésité (World Health Organisation - Fact sheet, 2015).

II.3.1.1.1. Maladies cardiovasculaires et syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Jusqu'en 2010, les MCV représentaient un coût annuel s'élevant à \approx 863 milliards de dollars américain dans le monde : une projection jusqu'en 2030 évalue les coûts à 1044 milliards de dollars par an pour traiter ces maladies (The Cost of CVD, 2017).

Les anomalies du sommeil, fréquemment associées aux MCV, constituent un facteur aggravant la morbidité et la mortalité cardiovasculaires. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) est la forme la plus répandue des troubles du sommeil, caractérisée par des apnées répétitives au cours du sommeil, dues à la fermeture intermittente des voies aériennes supérieures. Le SAOS a une prévalence affectée par le mode de vie et constitue un facteur de risque indépendant des MCV. Ainsi, la prévalence actuelle du SAOS, atteint des valeurs alarmantes allant jusqu'à 34% des hommes et 17% des femmes, dont une grande proportion est malheureusement non-diagnostiquée (Peppard PE. et coll., 2013).

Les patients souffrant du SAOS, sont souvent obèses, avec une prévalence élevée de maladies et complications cardiovasculaires, d'hypertension artérielle systémique et de diabète de type 2 (Roca GQ. et coll., 2015). Depuis la dernière décennie, la recherche épidémiologique et clinique

a constamment montré l'association entre le SAOS et la morbidité et la mortalité cardiovasculaires (Peppard PE. et coll., 2000) (Olafiranye O. et coll., 2013) (Parati G. et coll., 2014) (Maan A. et coll., 2015). Des études (Fig. 23) montrent aussi que le SAOS est associée à l'hypertension (Peppard PE. et coll., 2000) (Jean-Louis G. et coll., 2005) (Logan AG. et coll., 2001), à la fibrillation auriculaire (Olafiranye O. et coll., 2013) (Iwasaki YK. et coll., 2014) (Maan A. et coll., 2015) (Oza N. et coll., 2014), aux maladies coronariennes (Schäfer H. et coll., 1999) (Gottlieb D. et coll J., 2010), à l'insuffisance cardiaque (Gottlieb DJ. et coll., 2010) (Javaheri S., 2006), à l'hypertension résistante (Pedrosa RP. et coll., 2013) (Dudenboster T. et coll., 2012) (Parati G. et coll., 2014).

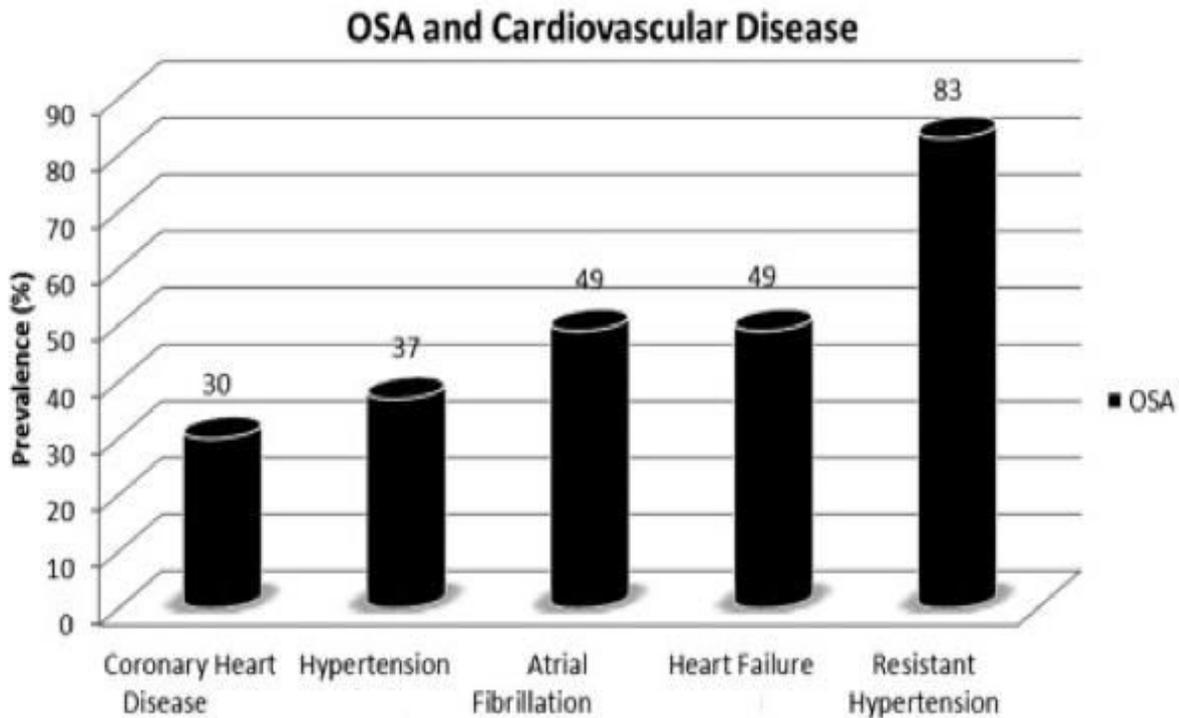


Figure 23 : Graphique montrant la prévalence des apnées obstructives du sommeil dans les différents MCV. Coronary heart disease : maladie coronarienne, atrial fibrillation : fibrillation auriculaire, heart failure : insuffisance cardiaque, resistant hypertension : hypertension résistante, OSA : apnées obstructives du sommeil, cardiovascular disease : maladie cardiovasculaire (Olafiranye O. et coll., 2013).

Les mécanismes physiopathologiques reliant le SAOS aux MCV sont complexes, et impliquent des interactions entre les voies respiratoires, le système nerveux central et le système

cardiovasculaire (Olafiranye O. et coll., 2013). Ces mécanismes comprennent par exemple une augmentation du tonus sympathique (Somers VK. et coll., 1995), des changements de la pression intra-thoracique, un stress oxydatif et une inflammation vasculaire (Fig. 24) résultant de l'hypoxie et de la réoxygénation nocturne.

L'hypoxie intermittente semble être à l'origine de la plupart de ces voies pathophysiologiques importantes. En effet, les désaturations sanguines en oxygène répétitives provoquent l'activation du système nerveux sympathique (Somers VK. et coll., 1995) (Lavie L., 2003) (Fletcher EC., 2001) et produisent une hypertension (Fig. 24) (Fletcher EC., 2001). Un mécanisme similaire pourrait expliquer l'association entre le SAOS et la tachyarythmie (Gami AS. et coll., 2007). L'hypoxie intermittente et la réoxygénation ont également été impliquées dans la pathogenèse de l'inflammation systémique causée par le SAOS (Li C. et Jackson RM., 2002) (Ryan S. et coll., 2005). Les patients atteints du SAOS ont des niveaux plus élevés d'endothéline circulante (ce qui favorise la vasoconstriction) et des niveaux plus faibles de monoxyde d'azote (ce qui affaiblit la vasodilatation endothélium-dépendante) par comparaison aux personnes saines (Lavie L., 2003) (Ip MS. et coll., 2000). Ceci les rend plus susceptibles à des augmentations de la pression artérielle que des sujets sains. En outre, cette voie d'activation affecte les réponses inflammatoires et immunitaires favorisant l'activation des cellules endothéliales, des leucocytes, et les plaquettes (Lavie L., 2003). Une fois activées, ces cellules expriment des molécules d'adhésion et des cytokines pro-inflammatoires qui peuvent entraîner des lésions et des dysfonctionnements endothéliaux (Lavie L., 2003) (Budhiraja R. et coll., 2007), qui peuvent conduire au développement de l'athérosclérose.

En observant cette chaîne d'événements, les recherches suggèrent que ce dysfonctionnement endothélial commence peu après le début du SAOS et peut être le mécanisme par lequel ce dernier intervient dans la genèse ou l'aggravation de l'hypertension, l'arythmie, les accidents vasculaires cérébraux, et l'arrêt cardiaque (Milleron O., 2005) (Budhiraja R. et coll., 2007) (Lévy P. et coll., 2015).

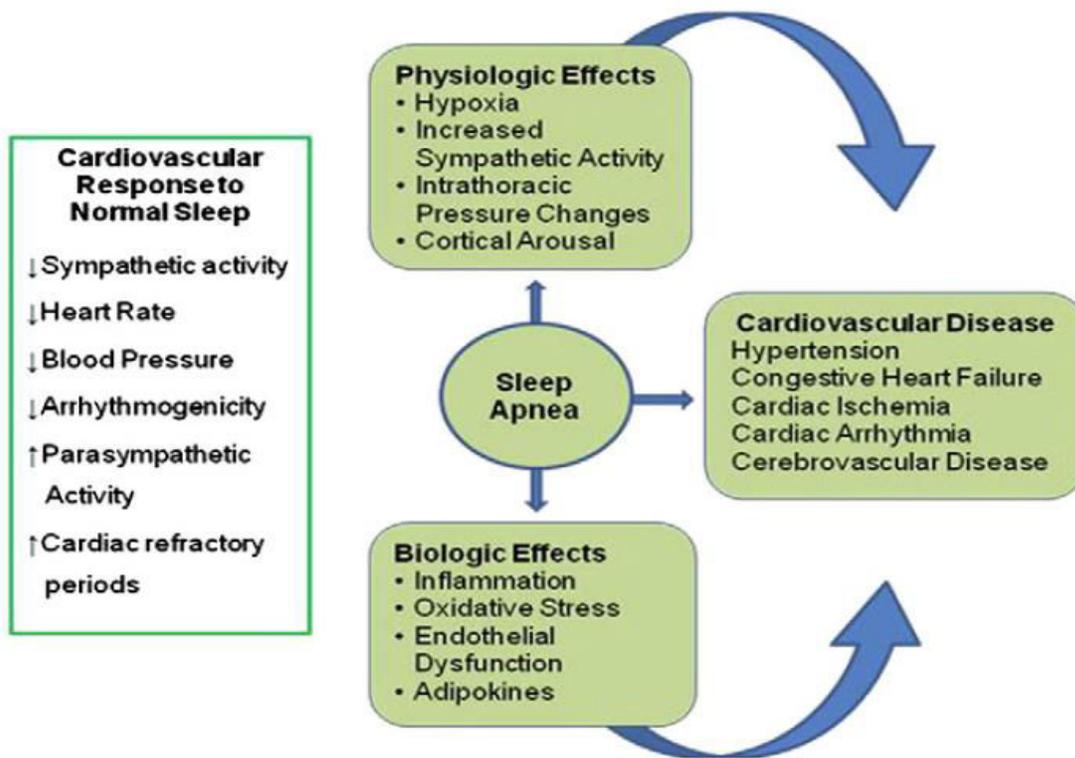
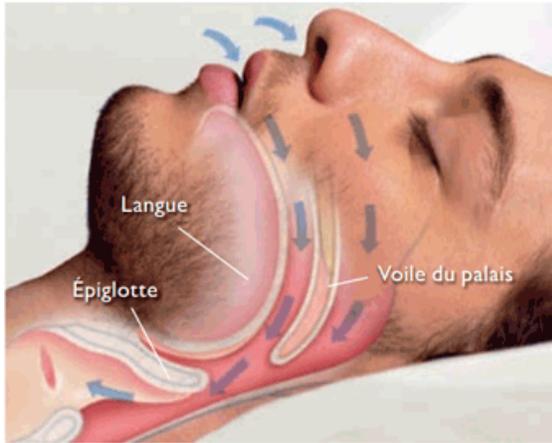


Figure 24 : Diagramme représentant les liens pathophysiologiques entre les apnées obstructives du sommeil et les MCV (Olafiranye O. et coll., 2013).

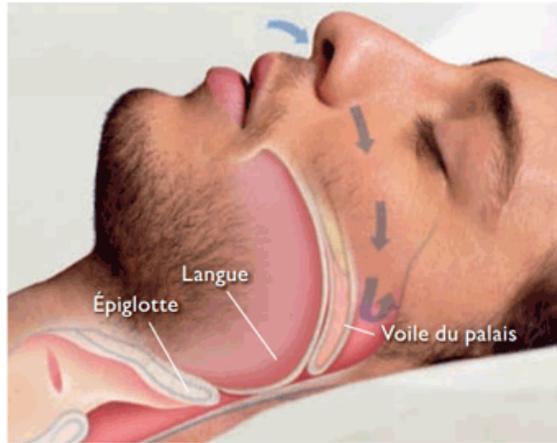
II.3.1.2. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Le syndrome d'apnée du sommeil (SAOS) est le sous-type le plus courant des troubles respiratoires du sommeil. C'est une maladie chronique commune qui induit un arrêt ou une diminution intermittente de la respiration des patients d'une façon répétée, due à des fermetures transitoires des voies aériennes supérieures, qui peuvent être dues à des causes anatomiques ou pathologiques (comme spasme laryngo-glottique) durant leur sommeil (Fig. 25) (Semelka M. et coll., 2016). Le sommeil devient ainsi fragmenté et non-réparateur, ce qui amène à des symptômes tels que les maux de tête matinaux et la somnolence diurne.



Respiration normale

Pendant le sommeil, l'air peut circuler librement depuis et vers vos poumons en passant par les voies aériennes.



Syndrome d'apnées obstructives du sommeil

Vos voies aériennes s'affaissent, ce qui empêche l'air de circuler librement depuis et vers vos poumons, et perturbe votre sommeil.

Figure 25 : Figure montrant l'état des voies aériennes supérieures durant le sommeil dans le cas de la respiration normale (figure de gauche) et dans le cas du SAOS (figure de droite) (Sleep Apnea Solutions, 2016).

La sévérité de cette maladie est mesurée en se fondant sur l'index d'apnées-hypopnées (= "apnea-hypopnea index" ou AHI), qui se définit par la moyenne du nombre des épisodes d'apnée (arrêt de la respiration) et hypopnée (diminution de l'amplitude respiratoire) par heure de sommeil. La sévérité des apnées obstructives du sommeil est définie comme légère si l'index AHI est entre 5 et 15 évènements par heure, comme modérée si l'AHI est compris entre 15 et 30 évènements par heure et comme sévère si l'AHI dépasse les 30 évènements par heure (Ruehland WR. et coll., 2009).

Récemment Lévy et Pépin (Lévy P. et coll., 2015), ont affiné les caractéristiques du SAOS et proposé une nouvelle définition du diagnostic : le SAOS est identifié quand $AHI \geq 5$ accompagné d'au moins un des signes cliniques suivantes : somnolence diurne excessive (EDS), sommeil non-réparateur, fatigue ou insomnie, réveil avec l'étouffement, ronflements habituels et/ou interruptions de la respiration, hypertension, troubles de l'humeur, dysfonctionnement cognitif, maladie des artères coronariennes, accident vasculaire cérébral, insuffisance cardiaque congestive, fibrillation auriculaire ou diabète de type 2 (Berry RB. et coll., 2012) (American Thoracic society., 2013). Alternativement, le SAOS peut également être identifié si $AHI > 15$ indépendamment de la présence ou non des autres symptômes (Lévy P. et coll., 2015).

Bien que très répandu, le SAOS est fréquemment sous-diagnostiqué. Il existe plusieurs comorbidités associées au SAOS, comme l'hypertension, les maladies de l'artère coronaire, les arythmies cardiaques et la dépression - d'où la nécessité d'une sensibilisation du public à la forte prévalence du SAOS, à son diagnostic et à une amélioration de la compréhension de ses conséquences sur la santé. Cette étape est essentielle afin de limiter ses incidences sur la qualité de vie quotidienne.

II.3.1.2.1. Prévalence et épidémiologie

Selon Young et ses collaborateurs, le SAOS est une maladie fréquente chez les adultes affectant 9% des femmes et 24% des hommes pour un AHI ≥ 5 (Young T. et coll., 2002). Dans leur revue, Lévy et ses collaborateurs, montrent que pour un AHI $10 \geq$ ou AHI ≥ 15 cette prévalence est entre 5-15% chez les hommes et entre 4-9% chez les femmes (Lévy P. et coll., 2015).

Franklin et Linderberg ont montré, dans leur revue sur l'épidémiologie de l'apnée du sommeil, que la prévalence du SAOS a augmenté avec le temps dans les études épidémiologiques, et que cette prévalence est très variable et différente d'une étude à l'autre. Ceci semble être dû au fait que la définition du SAOS et de l'AHI, les équipements de diagnostic utilisés, la conception des études et les caractéristiques des sujets dans chaque études sont largement différents (Franklin KA. et Lindberg E., 2015).

Selon Franklin et ses collaborateurs, les apnées obstructives du sommeil, avec une somnolence diurne excessive sont présentes en moyenne chez 6% des hommes avec des chiffres allant de 3% (en minimum) jusqu'à 18% (en maximum), et chez 4% des femmes en moyenne, avec des chiffres allant de 1% (en minimum) jusqu'à 17% (en maximum) (Franklin KA. et Lindberg E., 2015).

Plusieurs facteurs comme le sexe, l'âge, et l'obésité sont associés au SAOS et affectent sa prévalence. L'impact de ces facteurs est détaillé dans ce qui suit.

II.3.1.2.1.1. Le sexe

Les apnées obstructives du sommeil sont plus répandues chez les hommes que chez les femmes (Fig. 26), de la même façon que la distribution de prévalence de ronflement est plus importante chez les hommes par rapport aux femmes. Ceci semble être lié aux différences hormonales et

leurs effets sur les muscles des voies aériennes supérieures (Franklin KA. et coll., 2015) (Gabbay IE. et Lavie P., 2012).

Dans une des plus récentes revues, Senaratna et ses collaborateurs (Senaratna C. et coll., 2017) indiquent une prévalence globale des apnées mesurées à $AHI \geq 5$ dans la population générale d'âge >18 ans qui varie entre 9% et 38%, avec un effet positif de l'appartenance au sexe masculin sur la prévalence du SAOS : 13 à 33% chez les hommes et 6 à 19% chez les femmes.

En outre, Wimms et ses collaborateurs résument dans leur revue publiée en 2016 (Wimms A. et coll., 2016), les travaux de plusieurs équipes de recherche entre les années 1993 et 2015, en regroupant les prévalences estimées des apnées du sommeil faibles ($AHI \geq 5$) aussi bien que les apnées modérées à sévères ($AHI \geq 15$) chez les hommes et les femmes. Le tableau résumant les estimations de ces prévalences (Fig. 26), révèle lui-aussi que les apnées modérées à sévères, (surtout celles qui sont mesurées avec un $AHI \geq 15$) ont une plus forte prévalence chez les hommes que chez les femmes (Wimms A. et coll., 2016).

Study	Mild OSA ($AHI \geq 5$)		Moderate to severe OSA ($AHI \geq 15$)	
	Males	Females	Males	Females
Young <i>et al</i> (1993)	24%	9%	9%	4%
Redline <i>et al</i> (1994)	-	-	26%	13%
Bixleret <i>et al</i> (1998, 2001)	17%	-	7%	2%
Duran <i>et al</i> (2001)	26.2%	28%	14%	7%
Peppard <i>et al</i> (2013)	-	-	13.5%	6%
Franklin <i>et al</i> (2013)	-	50%	-	26%
Heinzeret <i>et al</i> (2015)	34%	38%	49.7%	23.4%

Figure 26 : Tableau résumant les différentes estimations de prévalence des apnées obstructives du sommeil faibles à sévères, mesurées par plusieurs chercheurs (1993-2015) en fonction du sexe (Wimms A. et coll., 2016).

II.3.1.2.1.2. L'âge

Le SAOS affecte les personnes de tous âges, mais il est très fréquent chez les personnes âgées de plus de 60 ans (Punjabi NM., 2008), et la moyenne de l'AHI mesurée augmente avec l'âge (Gabbay IE. et Lavie P., 2012) (Fig. 27). L'âge influence la prévalence des apnées du sommeil indépendamment des autres facteurs de risque (Franklin KA. et coll., 2013) (Bixler EO. et coll.,

1998) (Gabbay IE. et Lavie P., 2012) (Peppard PE. et coll., 2000). Dans une étude réalisée par Bixler et ses collaborateurs, on trouve que le SAOS (avec AHI>10) est diagnostiqué chez 3,2 % des hommes âgés entre 20 et 44 ans, et chez 11,3% des hommes âgés entre 45 et 64 ans, et chez 18,1% chez les hommes âgés entre 61 et 100 ans (Bixler EO. et coll., 1998). En outre, Duran et ses collaborateurs, montrent dans leur étude que pour AHI >10 la prévalence de SAOS chez des personnes âgées entre 60-70 ans est d'ordre de 32% chez les hommes et de 25% chez les femmes (Duran J. et coll., 2001). Plus récemment, le SAOS a été considéré comme fréquent chez une population française âgées entre 40 et 70 ans ; puisque selon Payen et ses collaborateurs, 7-15% de cette population basées sur Grenoble ont un SAOS avec un AHI> 15 par heure du sommeil (Payen JF. et coll., 2016).

D'autre part, Gabbay et ses collaborateurs révèlent que l'âge affecte également la sévérité du SAOS en augmentant la moyenne de l'AHI mesuré dans les deux sexes. Ainsi, on trouve que la moyenne des AHI mesurés chez les femmes augmente de 6 à l'âge de 21-25 ans jusqu'à 26 à l'âge de 76-80 ans. De même, chez les hommes cette moyenne augmente de 12 à l'âge de 21-25 ans jusqu'à 28 à l'âge de 71-75 ans et avant de rebaisser légèrement vers 26-27 à 76-80 ans (Fig. 27) (Gabbay IE. et Lavie P., 2012).

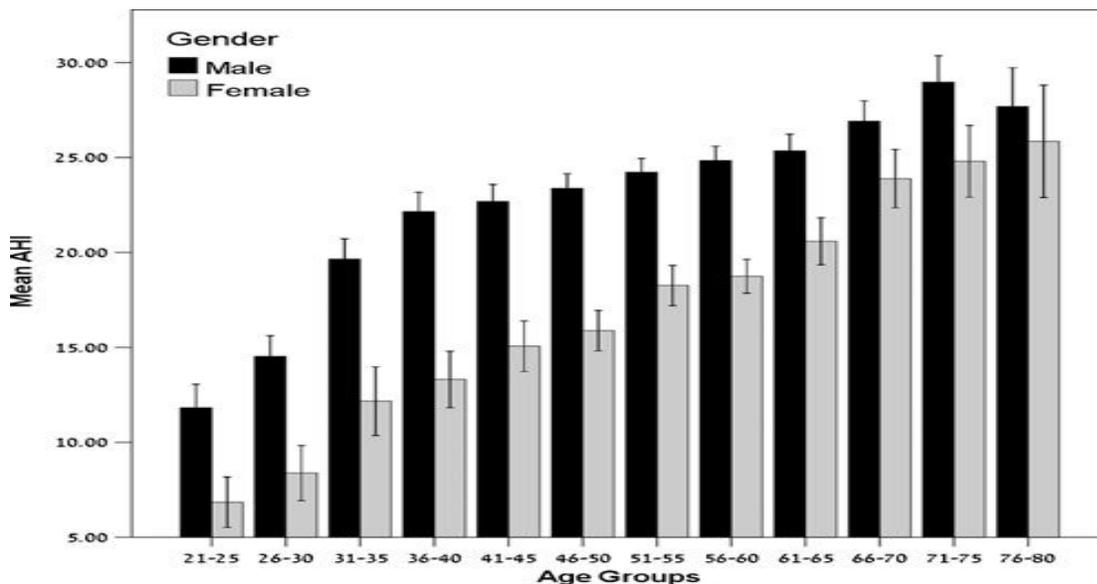


Figure 27 : Graphique montrant la moyenne de l'AHI croissante des années du sommeil en fonction de l'âge chez l'homme et la femme (Gabbay IE. et Lavie P., 2012).

II.3.1.2.1.3. L'obésité

La relation entre le SAOS et l'obésité est complexe, multifactorielle, et bidirectionnelle, ce qui aboutit à un aggravement symptomatique commun des deux pathologies (Romero-Corral A. et coll., 2010) (Schwartz AR. et coll., 2008).

En effet, l'obésité est bien admise comme un facteur de prédisposition aux apnées obstructives du sommeil, ceci étant dû à l'accumulation massive des tissus graisseux au niveau des voies aériennes supérieures (Koskenvuo M. et coll., 1987). (Shelton KE. et coll., 1993) (Franklin KA. et coll., 2013).

Le traitement primaire pour le SAOS est toujours la réduction du poids et le maintien de ce poids d'équilibre (Quan SF. et coll., 2013). Busetto et ses collaborateurs ont montré qu'une réduction de 15% de l'indice de masse corporelle fait augmenter sensiblement le diamètre de la zone transversale du pharynx au niveau du cou. Il en résulte une diminution de la sévérité du SAOS (Wall H. et coll., 2012).

II.3.1.2.2. Physiopathologie du SAOS

Le SAOS est une pathologie complexe et multifactorielle (Bailly S. et coll., 2016) (Owens RL. et coll., 2015). Le SAOS correspond à la fermeture intermittente des voies aériennes supérieures au cours du sommeil du fait d'un collapsus qui se forme au niveau du voile du palais et/ou en arrière de la base de langue. Ceci peut être dû à plusieurs facteurs tels qu'une augmentation de la quantité de tissus mous accumulés dans cette zone et/ou une masse de la langue plus grande que le normal (Wimms A. et coll., 2016). Ainsi, l'anatomie du pharynx joue un rôle important dans la physiopathologie du SAOS (Heinzer R., 2007) : en raison du faible support osseux dans cette région, le maintien de la perméabilité du pharynx est assuré principalement par des muscles dilatateurs.

Dans le cas de la personne saine, lors de l'inspiration, la contraction des muscles dilatateurs du pharynx maintient sa perméabilité. Un déséquilibre entre la force générée par la contraction de ces muscles dilatateurs (maintenant l'ouverture des voies aériennes) et la pression négative inspiratoire intraluminale (tendant à fermer le pharynx) produit l'apnée (Destors M. et coll., 2017). La survenue des apnées transitoires successives durant le sommeil induit plusieurs conséquences qui sont observées immédiatement : une hypoxie intermittente (HI - répétitions

cycliques des phénomènes de désaturation-ré-oxygénation du sang), des variations considérables des pressions intra-thoraciques dues aux efforts respiratoires du patient pour lutter contre le collapsus des voies aériennes, la survenue d'un micro-éveil terminant l'évènement respiratoire et entraînant une fragmentation du sommeil (Dempsey JA. et coll., 2010) (Lévy P. et coll., 2015). L'HI est la conséquence la plus importante du SAOS, dont la sévérité est déterminante pour les complications cardiovasculaires. La répétition de l'HI va provoquer des mécanismes chroniques d'adaptation à ce manque transitoire d'oxygène : un stress oxydant, une hyper-activation du système sympathique à l'origine d'une inflammation systémique, une inflammation et un remodelage vasculaire (Fig. 28), hépatique et du tissu adipeux (Destors M. et coll., 2017).

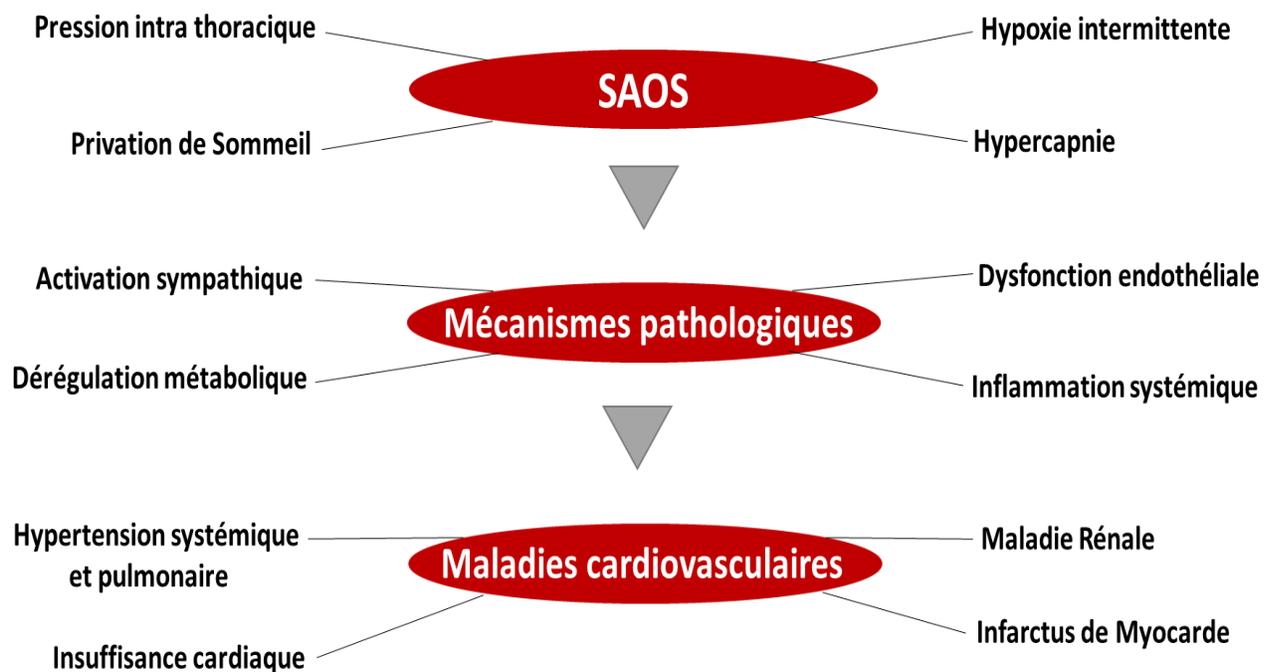


Figure 28 : Graphique montrant la physiopathologie et les effets du syndrome d'apnées obstructives du sommeil sur le système cardiovasculaire.

Les études sur les rongeurs (*in vivo*) aussi bien sur les cultures cellulaires (*in vitro*), ont montré que l'HI induit un stress oxydant au niveau des CMLV, ce qui fait augmenter le taux des espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species : ROS) (Nanduri J. et coll., 2008) (Yuan G. et coll., 2005). Les ROS à leur tour induisent une surexpression et une activation d'une série de facteurs de transcription, comprenant l'hypoxia – inducible factor (HIF-1), le facteur nucléaire des lymphocytes T activés (NFAT), et le facteur nucléaire κ B (NF- κ B) (Yuan G. et coll., 2008).

L'activation des facteurs de transcription pro-inflammatoire NF- κ B et HIF1 α provoque une cascade de processus inflammatoires et active le système endothéline (ET) (Yuan G. et coll., 2008) (Kanagy NL. et coll., 2001). Ce dernier est constitué de deux récepteurs couplés aux protéines G, ET-A et ET-B, et de deux enzymes de maturation, une protéase de type furine et une enzyme de conversion de l'endothéline (Yuan G. et coll., 2005) (Pinet F., 2004). L'endothéline est considéré comme le vasoconstricteur endogène le plus puissant, il est donc capable d'induire directement une vasoconstriction favorisant ainsi la survenue de l'hypertension (Pinet F., 2004). Le système endothéline ainsi activé par l'HI, provoque une augmentation du taux d'ET-1 circulant chez les patients atteints du SAOS aussi bien que dans les modèles animaux (Gras E., 2016) (Kanagy NL., 2001). L'ET-1 à son tour active encore la réponse inflammatoire dépendante de l'HI via l'activation de NF- κ B au niveau des CMLV. Prises ensemble, ces données révèlent que l'HI est responsable de l'activation de HIF-1 et NF- κ B qui induisent une augmentation de l'activation sympathique aussi bien que du système endothéline (Kanagy NL. et coll., 2001) (Fletcher EC., 2001) (Yuan G. et coll., 2008) (Gras E. et coll., 2016). L'activation du système endothéline favorise à son tour la dysfonction endothéliale, l'athérosclérose et un remodelage vasculaire caractérisé par une augmentation de la rigidité artérielle (Belaidi E. et coll., 2016) (Javaheri S. et coll., 2017). La dysfonction endothéliale résultante induit une diminution du taux de NO produit par les cellules endothéliales, ceci réduit la vasodilatation, augmente la vasoconstriction et favorise par conséquent la survenue de l'hypertension artérielle.

L'HI induit également une hyperactivité sympathique par l'activation du chemoréflexe (qui est par définition un réflexe physiologique initié par un stimulus chimique ou par activation d'un chémorécepteur), qui, à son tour, active le système rénine-angiotensine-aldostérone et renforce l'activité vasoconstrictrice, ce qui favorise la survenue de l'hypertension (Horner RL., 2008). Il est à noter que les chemoréflexes sont des modulateurs importants de l'activation sympathique. Plusieurs vaisseaux sanguins possèdent des chémorécepteurs sensibles à l'hypoxie : les chémorécepteurs périphériques localisés au niveau de l'artère carotide, ainsi que des récepteurs sensibles à l'hypercapnie (chémorécepteurs centraux localisés dans la région du tronc cérébral) (Kara T. et coll., 2003) (Mansukhani MP. et coll., 2015).

II.3.1.2.2.1. La relation entre le SAOS et l'hypertension

L'hypertension est une caractéristique commune chez les patients SAOS (Sánchez-de-la-Torre M. et coll., 2013). Les résultats des études longitudinales prospectives montrent qu'un AHI modéré à sévère constitue un facteur de risque indépendant de l'hypertension (Peppard PE. et coll., 2000). En outre, les études montrent une relation bidirectionnelle entre le SAOS et l'hypertension ; environ 50 % des patients de SAOS sont hypertendus (Lavie P. et coll., 2000) et environ 30 % des patients hypertendus ont aussi le SAOS (Somers VK. et coll., 2008) et souvent non-diagnostiqués (Nieto FJ. et coll., 2000) (Torres G. et coll., 2015). En outre, les personnes avec une forte sévérité du SAOS ont un risque 3,2 fois plus important de développer une hypertension par comparaison aux personnes sans SAOS (Peppard PE. et coll., 2000) (Marin JM. et coll., 2005) (Torres G. et coll., 2015).

Les apnées peuvent abolir la diminution nocturne de la pression artérielle en augmentant la production de l'angiotensine II, un peptide impliqué dans la régulation de la tension artérielle. L'angiotensine II, à son tour induit une activation du système sympathique et stimule la production de l'aldostérone. Des niveaux élevés d'aldostérone dans le plasma sont associés à un AHI plus élevé chez les patients et à une sévérité alarmante des apnées obstructives du sommeil (Sánchez-de-la-Torre M. et coll., 2013). Cette augmentation du taux d'aldostérone va induire une augmentation de la pression artérielle via l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, ce qui favorise à son tour la survenue de l'hypertension (Patel S. et coll., 2017).

Deux différentes études réalisées par O'Connor et Cano-Pumarega sur la relation hypertension-SOAS révèlent des données semblables. En effet, l'étude faite par O'Connor et ses collaborateurs en 2009 sur 2470 individus non-hypertendus, montre qu'une relation entre AHI et le risque d'hypertension existe mais elle disparaît après ajustement de l'indice de masse corporelle (O'Connor GT. et coll., 2009). Le risque d'hypertension chez ces individus sans hypertension était estimé par le calcul du risque relatif rapproché pour le développement de l'hypertension (Odds ratio) durant 5 ans de suivi de la pression artérielle en fonction de l'AHI initial. De même, la deuxième étude réalisée par Cano-Pumarega et ses collaborateurs sur 1180 individus, montre qu'après ajustement de l'âge, du sexe et du BMI (= Body Mass Index : pour l'indice de masse corporelle), il n'y a aucune association entre l'hypertension artérielle et les apnées obstructives du sommeil (Cano-Pumarega I. et coll., 2011). Donc, les études sur l'Homme

rèvent que l'HI est associée à l'hypertension, mais d'une façon dépendante d'autres facteurs dont essentiellement la masse corporelle.

En parallèle, dans le cadre des études sur les modèles animaux, Fletcher et ses collaborateurs ont montré pour la première fois que l'hypoxie intermittente induit une hypertension. Ils ont exposé des rats à l'HI (avec un cycle de FIO₂ à 3-5% toutes les 30 secondes), 7 heures par jour sur 35 jours, et montrent une augmentation significative de la pression artérielle moyenne d'une valeur de 13.7 ± 1.8 mm Hg (Fletcher EC. et coll., 1992).

De plus, sur le modèle animal, plusieurs semaines d'exposition à l'hypoxie intermittente induisent la survenue d'une athérosclérose (Barthlen GM., 2002) et d'un remodelage vasculaire de l'aorte thoracique descendante et du ventricule gauche. Ceci se manifeste par la surexpression de la molécule d'adhérence des cellules endothéliales plaquettaires (PECAM-1 : Platelet endothelial cell adhesion molecule), qui induit une dérégulation du tonus vasculaire, qui avec l'augmentation de l'épaisseur intima-média de l'aorte par l'HI, fait augmenter la vasoconstriction et donc la pression artérielle (Dematteis M. et coll., 2008).

Prises ensemble, les données évoquées ci-dessus, révèlent que l'HI est responsable de l'hypertension, en induisant une augmentation du chemoréflexe, une activation sympathique, un remodelage vasculaire et une dysfonction endothéliale, qui tous résultent en une augmentation de la pression artérielle.

L'HI est la conséquence majeure du SAOS et est responsable de la plupart des complications associées à ce syndrome. C'est pour cela nous nous sommes concentrés particulièrement sur ce type d'hypoxie dans les parties précédentes. Cependant, l'hypoxie intermittente n'est pas le seul type d'hypoxie qui existe dans les situations physiologiques et pathophysiologiques. Pour cette raison, il nous a semblé intéressant de présenter ici une description de l'hypoxie en général, et ses effets sur l'organisme. En particulier, nous allons présenter l'autre type d'hypoxie, l'hypoxie continue, pour la comparer à l'HI, afin de pouvoir comprendre les mécanismes par lesquels l'HI amène spécifiquement aux complications cardiovasculaires liées au SAOS.

II.3.1.2.2.2. L'hypoxie

L'hypoxie est définie comme une déficience de la quantité d'oxygène au niveau des tissus du corps, qui a lieu dans différentes circonstances. Généralement, les organes les plus touchés par l'hypoxie sont le cerveau, le cœur et le foie (Prabhakar NR. et coll., 2007) (Michiels C., 2004).

L'hypoxie est différente de l'hypoxémie, qui signifie une quantité insuffisante d'oxygène circulant dans le sang. L'hypoxie peut être due à une hypoxémie, par exemple, une quantité insuffisante d'oxygène peut atteindre les tissus, du fait d'une quantité insuffisante d'oxygène dans le sang. L'hypoxie est générée soit par des conditions environnementales telles que l'exposition à la haute altitude (Deldicque L. et Francaux M., 2013), soit par des conditions pathologiques telles que certaines maladies pulmonaires comme les broncopneumopathies obstructives chroniques (BPCO) -dont l'emphysème- (référence) ou les apnées obstructives du sommeil (Garvey JF. et coll., 2009) ou l'anémie sévère (Grocott M. et coll., 2007). De même, l'exercice physique est à l'origine d'une hypoxie, mais au contraire des situations précédentes, le déficit en oxygène est limité au muscle squelettique (Leek BT. et coll., 2001). L'hypoxie peut affecter tout le corps (hypoxie généralisée), ou un organe spécifique ou tissu (hypoxie tissulaire). Elle peut également être classée comme aigüe ou chronique (Bayer C. et coll., 2011); ainsi l'hypoxie chronique est définie comme étant un manque d'oxygène qui dure sur une période de temps (de quelques heures jusqu'à plusieurs jours) causée par des limitations critiques dans la diffusion d'oxygène à travers un tissu respirant (Chaudary N. et Hill RP., 2007). Inversement, l'hypoxie aigüe est générée par un manque d'oxygène limité dans le temps (moins d'une heure), principalement causée par des perturbations temporaires et locales de la perfusion de l'oxygène dans un tissu respirant (Dewhirst MW., 2009).

II.3.1.2.2.2.1. L'hypoxie continue

L'hypoxie continue est une diminution du taux d'oxygène dans un tissu/ organe ou dans tout l'organisme à un niveau constant pendant une période donnée. L'hypoxie continue chronique (HCC) peut avoir lieu dans des conditions non-pathologiques comme le développement embryonnaire et durant la montée en haute altitude (Deldicque L. et Francaux M., 2013). Mais, l'HCC peut aussi avoir lieu dans des situations pathologiques comme les maladies pulmonaires (diminution de la capacité de l'appareil respiratoire à assurer un taux suffisant d'oxygène) (Baldi S. et coll., 2010), l'anémie (diminution du contenu d'oxygène dans le sang), l'ischémie (diminution du flux sanguin aux tissus), ainsi que dans des cas de cancer (par augmentation de la consommation d'oxygène par les tissus malins) (Chen LMa. et coll., 2007). Les études sur les rats montrent que l'hypoxie continue est associée à l'hypertension pulmonaire par l'intermédiaire

d'une dérégulation de la voie de signalisation calcique, se manifestant par une surexpression des canaux-récepteurs TRPV4 et RyR2 au niveau des CMLV pulmonaires (Dahan D. et coll., 2012). De même, l'exposition des rats à l'hypoxie continue induit une dysfonction endothéliale de l'aorte révélée par une diminution du taux de NO secrété par l'endothélium, ce qui entraîne une diminution de la vasodilatation endothélium- dépendante (Zhao YX. et coll., 2015).

II.3.1.2.2.2.2. L'hypoxie intermittente

Contrairement à l'hypoxie continue, l'hypoxie intermittente (HI) consiste en une alternance fréquente entre des périodes d'hypoxie et de normoxie. L'hypoxie intermittente chronique (HIC), qui est définie par une HI qui persiste au cours d'une période prolongée est identifiée durant les apnées obstructives du sommeil (Chen LMb. et coll., 2007).

Dans le SAOS, les apnées répétitives transitoires (cessation de la respiration) entraînent une hypoxémie périodique (diminution de la saturation en oxygène du sang artériel), ce qui conduit à cette condition d'hypoxie intermittente chronique. La fréquence des apnées peut dépasser 60 épisodes par heure de sommeil. Une avancée majeure dans le domaine de la recherche sur l'apnée du sommeil a été la démonstration du fait que l'exposition d'animaux à l'HI chronique seule est suffisante pour entraîner des changements physiopathologiques similaires à ceux décrits chez les patients souffrant du SAOS (Fletcher EC., 2001).

Les études sur les modèles animaux révèlent que l'HI chronique est plus efficace que l'hypoxie continue dans l'activation de la voie de signalisation HIF (Nanduri J. et coll., 2008) (Yuan G. et coll., 2005). La différence réside dans le fait l'HIC, au contraire de l'HCC est capable d'induire une accumulation de l'ARNm de HIF 1-alpha d'une manière persistante (Nanduri J. et coll., 2008) (Coleman ML. et Ratcliff PJ., 2007), ce qui déclenche la cascade des voie de signalisation qui résultent en l'inflammation systémique, l'activation sympathique, A l'inverse, la surexpression du facteur HIF par l'HCC est transitoire, ce qui l'empêche d'exercer son effet sur les voies de signalisation en aval (Coleman ML. et Ratcliff PJ., 2007) (Nanduri J. et coll., 2008) (Yuan G. et coll., 2005).

II.3.1.2.2.3. Association de l'HI/SAOS avec les pathologies cardiovasculaires

Les apnées obstructives du sommeil provoquent l'hypoxie intermittente (HI), avec une série de complications systémiques, dont l'hypertension artérielle, l'infarctus du myocarde et l'athérosclérose (Powell FL. et Garcia N., 2000).

De nombreuses études dans ce domaine ont été réalisées au sein de notre laboratoire (HP2) sur des patients atteints du SAOS et sur des modèles animaux, révélant des morbidités cardiovasculaires dues à l'HI. Ainsi, une étude réalisée par Destors et ses collaborateurs a montré que, 35 à 80% des patients atteints du SAOS risquent de développer des maladies cardiovasculaires, ce qui est plus important que chez les sujets sains. Ceci est dû à l'HI qui favorise l'hyper-activation sympathique, perturbe la réactivité vasomotrice et induit un stress oxydant qui constitue la base des morbidités cardiovasculaires (Destors M. et coll., 2014). De plus, les études récemment publiées sur des modèles animaux montrent que l'exposition des souris à l'HI (14 jours, 8h/jour, 30s hypoxie 5% O₂-30s normoxie) induit un stress du RS du myocarde aboutissant à l'expansion de la taille de l'infarctus du myocarde induit expérimentalement (Belaidi E. et coll., 2009), et provoque un remodelage inflammatoire artériel (Gras E. et coll., 2016).

Par ailleurs, le rat est classiquement utilisé comme un modèle animal pour étudier l'association entre la physiopathologie du SAOS et les maladies cardiovasculaires. Ainsi, des rats développent une hypertension artérielle suite à leur exposition à l'HI (3-6 secondes d'hypoxie suivi d'un retour au niveau normal d'oxygène pour 15-18 secondes, répétée deux fois par minute durant 6-8 heures par jour pendant 30 jours), avec des baisses de la saturation en oxygène du sang similaire à ceux observés chez les patients SAOS, inférieures à 80-85 % (Lesske J. et coll., 1997). De plus, il a été démontré que l'exposition des rats à l'HI seul est suffisant pour étudier les pathologies liées au SAOS (Prabhakar NR. et coll., 2007) (Prabhakar NR. et coll., 2005). Tous ces éléments nous amènent à penser que le modèle de rat placé en HI permet de générer, d'étudier, de comprendre et prévoir les symptômes du SAOS, et ainsi de pouvoir mieux les comprendre chez l'Homme.

II.4. Entraînement physique intensif et système cardiovasculaire

Comme mentionné précédemment dans la partie concernant les maladies cardiovasculaires et les apnées du sommeil, notre mode de vie affecte directement la prévalence de ces maladies. Parmi les facteurs déterminants, la sédentarité (l'inactivité physique), ainsi que le tabagisme et la malnutrition sont ceux qui ont une influence majeure sur l'expansion des maladies chroniques, et spécialement le SAOS (González K. et coll., 2017) (Booth FW. et coll., 2012) (Igelström H. et coll., 2013) (Mokdad AH. et coll., 2003).

Il est connu que la sédentarité favorise l'incidence de nombreuses maladies telles que l'obésité, les diabètes, l'hypertension, l'ostéoporose, et la dépression. En outre, l'inactivité physique est associée à l'augmentation de la mortalité, surtout celle qui est liée aux maladies cardiovasculaires (Warburton DER. et coll., 2006) (Thompson PD. et coll., 2003).

La plupart des études réalisées pour évaluer l'association entre la vie sédentaire, les risques sur la santé et les bénéfices de l'exercice physique, rapportent que l'activité physique induit une réduction significative de la mortalité. Ainsi, Myers et ses collaborateurs, dans une étude clinique récente (Myers J., 2015), rapportent que la mortalité due aux maladies cardiovasculaires chez les personnes sédentaires est 4 fois plus élevée que la mortalité chez les participants hautement actifs (Fig. 29). Le risque de développer des MCV est donc diminué par l'exercice physique. Cette relation inversement proportionnelle entre l'activité physique et la mortalité due aux MCV est rapportée dans nombreuses autres études par Leeper, Stamatakis, Wickramasinghe, Joyner et Kokkinos et leurs collaborateurs (Kokkinos P. et Myers J., 2010) (Myers J. et coll., 2002) (Leeper N. et coll., 2013) (Stamatakis E. et coll., 2013) (Wickramasinghe CD., 2014) (Joyner MJ. et Green DJ., 2009). Enfin, la relation inverse entre l'activité physique et le risque des MCV persiste toujours même après avoir pris en compte des facteurs de risques tels que la pression l'hypertension artérielle et le diabète (Paffenbarger RS Jr. et coll., 1986) (Kokkinos P., 2012) (Shiroma EJ. et Lee IM., 2010).

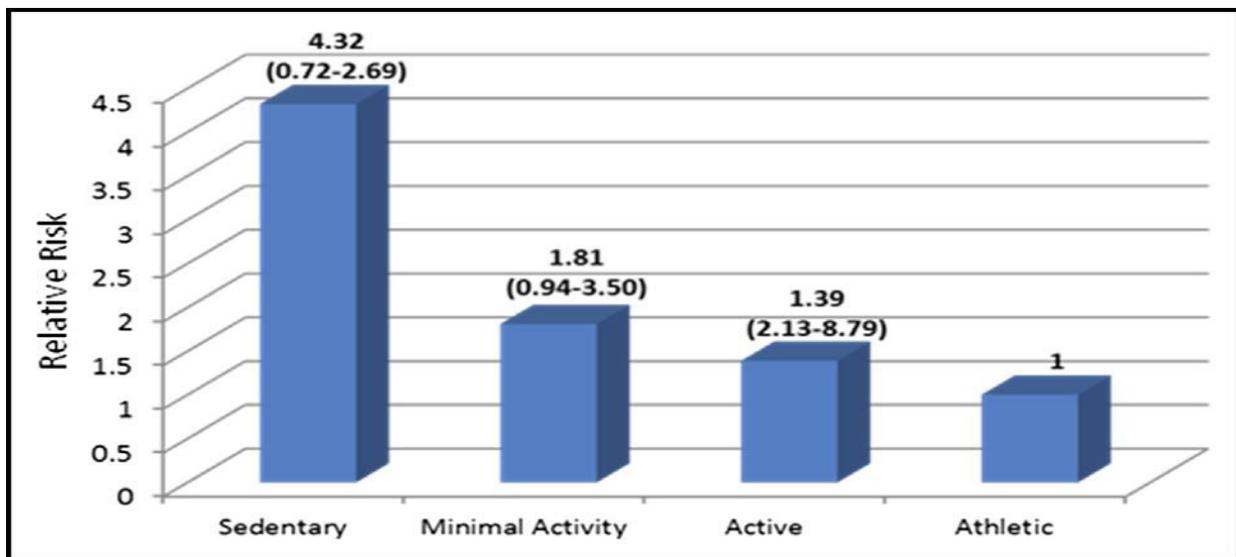


Figure 29 : Graphique représentant le risque relatif de la mortalité toutes causes confondues chez 4 différentes catégories de participants à l'étude en fonction de leur degré d'activité physique. La 4^{ème} colonne (Athletic) représente le groupe le plus actif physiquement et est considéré comme le groupe de référence. Le risque relatif de mortalité est ainsi calculé en normalisant les valeurs de risques de mortalité de différents groupes mesurés par rapport à celui du groupe de référence (Athletic), d'où sa valeur de risque qui est considérée égale à 1. Relative risk : risque relatif, sedentary : sédentaire, minimal activity : activité minimale, active : actif, athletic : athlétique (Myers J. et coll., 2015).

II.4.1. Entraînement physique et hypertension (effet sur la pression artérielle et la fréquence cardiaque)

L'hypertension, aussi connue comme le « tueur silencieux », est un problème de santé relativement répandu dans la population adulte, et l'hypertension est associée aux maladies cardiovasculaires, qui constituent la première cause de mortalité dans le monde entier (La fédération française de cardiologie, 2017).

Le manque d'activité physique (la sédentarité) constitue l'un des facteurs de risque de survenue de l'hypertension artérielle.

L'estimation du risque cardiovasculaire chez les hommes et les femmes se fait en fonction de la valeur de la pression artérielle : si la valeur de la pression artérielle est supérieure à 180 mm Hg (pour la pression systolique)/110 mm Hg (pour la pression diastolique), le risque cardiovasculaire est considéré comme élevé quels que soient les autres facteurs de risque

(Recommandations de l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes), 2008). Cependant, plusieurs facteurs autres que la pression artérielle élevée sont aussi pris en compte dans le calcul du risque cardiovasculaire : l'âge, le tabagisme, la prédisposition génétique, le diabète, un niveau de LDL-cholestérol supérieur ou égale à 1,60 g/l, et de HDL-cholestérol inférieur ou égal à 0,40 g/l, l'obésité, la sédentarité, et la consommation d'alcool.

Un nombre important d'études a été réalisé pour déterminer l'intensité optimale d'un entraînement physique capable de réduire la pression artérielle, mais les variations inter-individuelles ne permettent pas de donner une valeur unique - il faut donc adapter l'entraînement à chaque individu en fonction de ses caractéristiques physiques.

L'entraînement physique provoque une série de changements au niveau des fonctions cardiovasculaires, en abaissant la fréquence cardiaque, en diminuant la pression sanguine, et en favorisant les adaptations des muscles squelettiques et cardiaques. Cet ensemble de modifications représente les bénéfices de l'activité physique dans le cadre de la prévention des maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2 (Miele EM et Headley SAE., 2017) (Pedersen BK et Saltin B., 2006) (Kojda G. et Hambrecht R., 2005) (Diaz KM. et Shimbo D., 2013). L'entraînement physique est également utilisé comme un traitement curatif efficace de ces maladies, comme dans l'ischémie myocardique (Powers SK. et coll., 2014), l'insuffisance cardiaque, les maladies pulmonaires obstructives chroniques, le diabète de type 2 et l'hypertension artérielle (Börjesson M. et coll., 2016) (Hamer M., 2006).

II.4.2. Effet de l'entraînement physique sur la structure et la fonction vasculaires

L'exercice physique est capable d'induire une adaptation vasculaire fonctionnelle aussi bien que structurelle (Green DJ. et coll., 2008) (Joyner MJ. et Green DJ., 2009). Concernant l'effet structurel, plusieurs explications mécanistiques existent. Une de ces explications est que l'exercice a un effet direct, ou "primaire", sur la structure des artères par l'exposition répétée des artères à des augmentations de tension artérielle, du débit sanguin et des forces de cisaillement artérielles (shear stress) qui surviennent lors de chaque session d'entraînement physique (Fig. 30) (Green DJ. et Smith KJ., 2017). Ces variations hémodynamiques répétées rendent les artères adaptables à de telles augmentations en optimisant la vasodilatation dépendante de l'endothélium

par l'amélioration de la fonction des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires (Woodman CR. et coll., 2003) (Woodman CR. et coll. 2004) (Chakraphan D. et coll., 2005) et par le remodelage structurel des artères, qui élargissent leurs diamètres suite à l'augmentation du débit sanguin et des forces de cisaillement artériels (Baeyens N. et coll., 2015) (Green DJ. et Smith KJ., 2017).

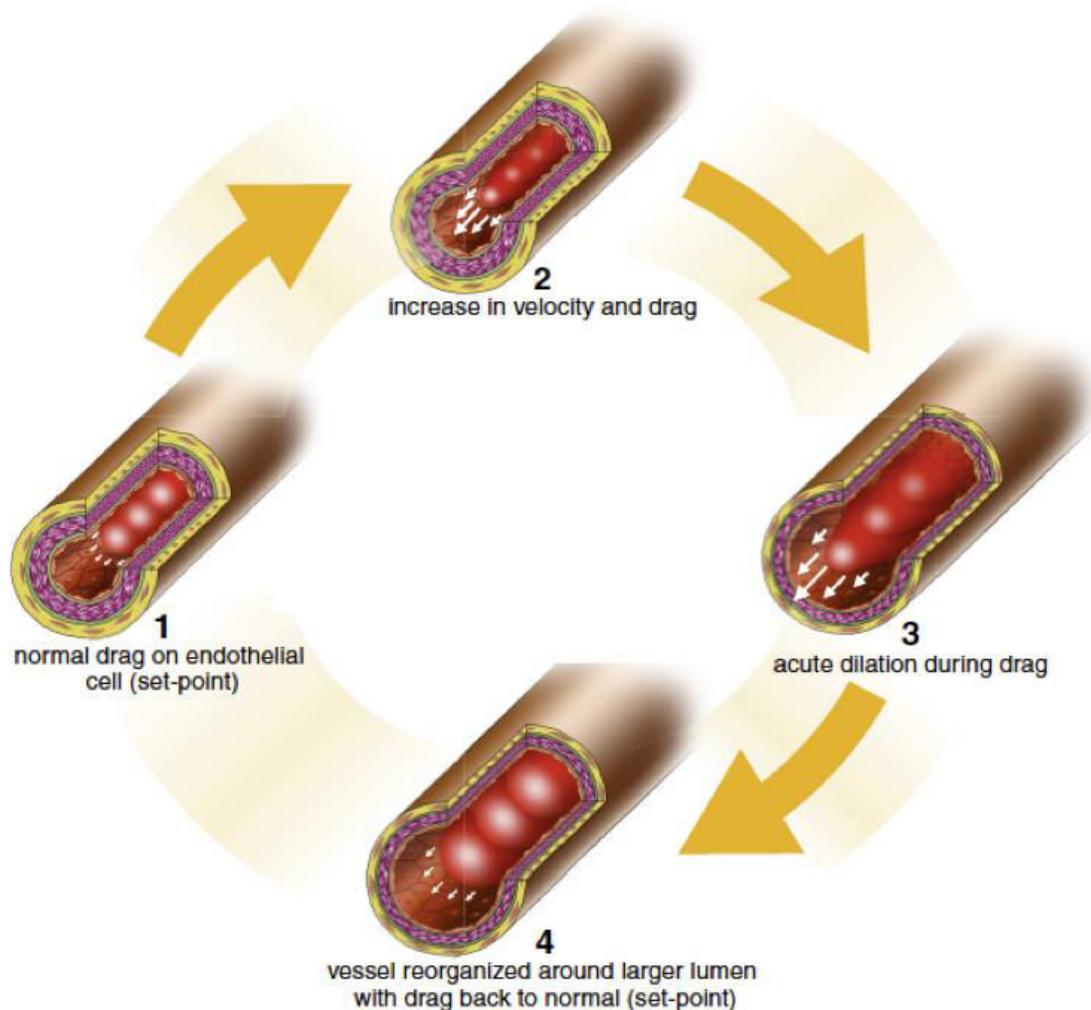


Figure 30 : Les stimuli hémodynamiques durant l'exercice physique et leurs effets sur le remodelage vasculaire et la dilatation endothélium-dépendante activée par le flux sanguin. Étape 1 : Résistance normale des cellules endothéliales à l'écoulement sanguin. Étape 2 : Exposition de l'endothélium à une augmentation de la vitesse du flux sanguin et des contraintes de cisaillement durant l'exercice. Étape 3 : Déclenchement de la dilatation. Étape 4 : Remodelage structurel des vaisseaux autour d'une lumière plus large même après le retour du flux à sa vitesse normale après l'exercice (Green DJ. et Smith KJ., 2017).

À l'échelle cellulaire et moléculaire, l'exercice physique se montre capable d'exercer son effet sur l'endothélium à différents niveaux (Pellegrin M. et coll., 2009) (Moyna MN. et Thompson 2004) (Heylen E., et coll. 2008) (Goanvec C., et coll. 2014) (Fig. 31). Le NO, la molécule la plus connue des substances produites par l'endothélium, est synthétisée à partir de la L-arginine. Cette dernière, qui est un acide aminé, et en présence de la tétrahydrobioptérine (BH4) comme cofacteur, est catalysée par une enzyme constitutive, la synthase du monoxyde d'azote endothéliale (endothelial nitric oxide synthase, eNOS), pour libérer le NO. L'exercice physique stimule l'activité transcriptionnelle et traductionnelle aboutissant à une augmentation de l'expression protéique de la eNOS (Sindler AL., et coll. 2009) (Haram PM., et coll. 2008). En outre, au niveau post-traductionnel, l'exercice fait augmenter l'activité de la protéine eNOS en favorisant sa phosphorylation Akt-dépendante (Akt est une protéine kinase spécifique de Serine/threonine) (Caillaud D. et coll., 2001) (Goanvec C., et coll. 2014) (Fig. 31). Cette augmentation d'expression et d'activité de eNOS par l'exercice fait augmenter la production de NO, qui à son tour favorise la vasorelaxation des CMLV et induit donc une diminution de la pression artérielle et une amélioration de la fonction cardiovasculaire (Joyner MJ. et coll, 2009) (Green DJ. et coll., 2008).

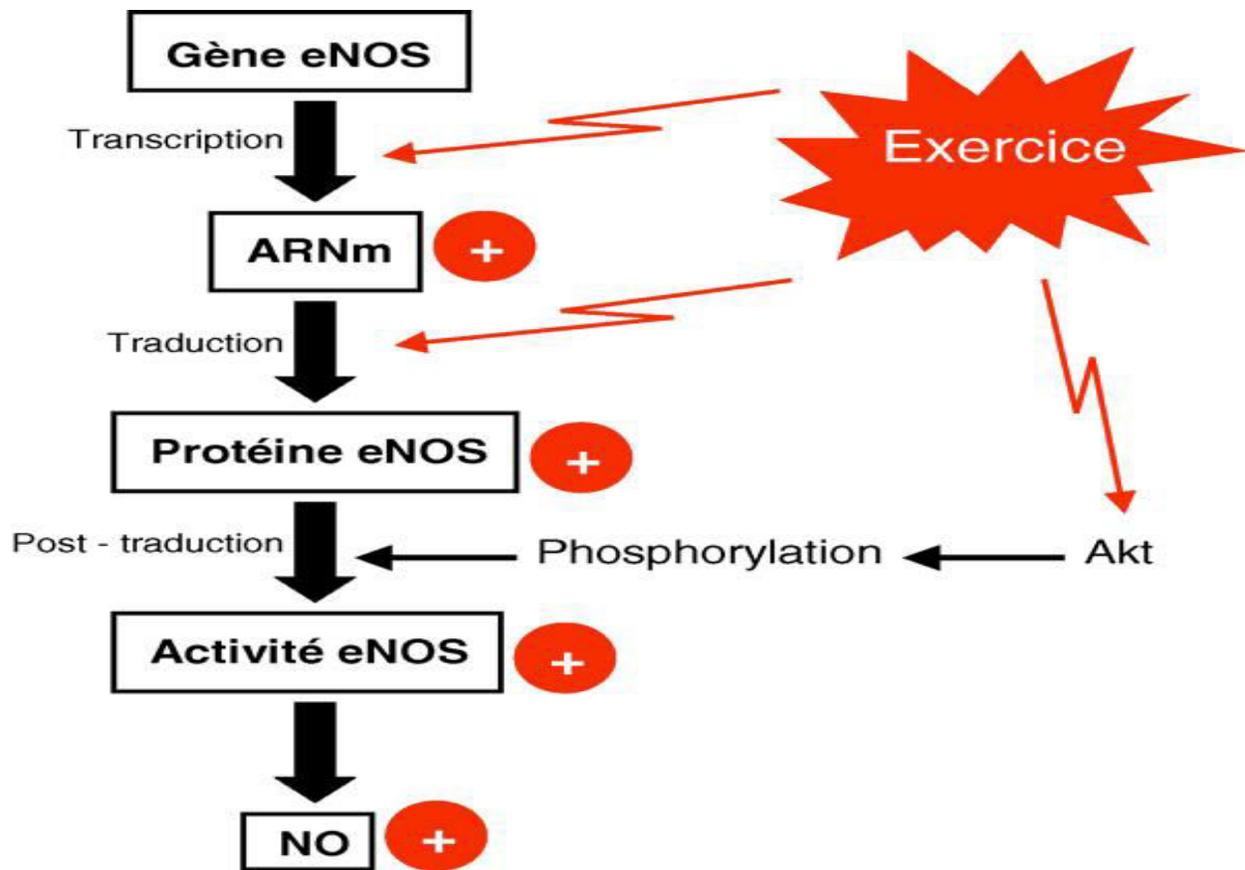


Figure 31 : Schéma représentant les effets de l'exercice physique sur les mécanismes cellulaires et moléculaires endothéliaux impliqués dans la régulation de l'activité de la eNOS et dans la synthèse du NO (Pellegrin M. et coll., 2009).

Donc, concernant les adaptations vasculaires fonctionnelles, la plupart des études se concentrent sur la voie de la vasodilatation produite par le monoxyde d'azote, NO.

Moins de données sont disponibles sur les autres changements induits par l'entraînement physique sur la fonction vasculaire. Il est prouvé que l'activité physique diminue le degré d'athérosclérose au niveau des artères coronaires chez les personnes physiquement actives en modifiant la chimie et le métabolisme des lipoprotéines (Petrovic-Oggiano G., et coll. 2010). Cet effet de l'activité physique sur le statut lipidique est obtenu en affectant les enzymes du métabolisme des lipoprotéines, notamment la lipoprotéine et la lipase du foie et la protéine de transport des esters de cholestérol (Kadlec AO., et coll. 2018).

En outre, d'autres études révèlent que l'effet positif de l'activité physique sur le système cardiovasculaire se reflète aussi par l'amélioration de la sensibilité à l'insuline (Petrovic-Oggiano G., et coll. 2010) et les fonctions immunologiques : il augmente la perfusion du myocarde et réduit

l'adhérence des thrombocytes due à la stimulation d'une synthèse accrue de prostaglandine (PGI₂) (Hellsten Y. et coll., 2012).

L'exercice physique améliore également la consommation d'énergie, ce qui est important pour le maintien d'un poids idéal, la prévention et le traitement de l'obésité, et il a un effet positif sur le contrôle du stress (Montero D., et coll. 2014). De plus, l'entraînement physique induit une diminution de la production de l'endothéline et l'angiotensine, ce qui réduit par conséquent la vasoconstriction (Maeda S. et coll., 2001) (Adams V. et coll., 2005) (Thijssen DH. et coll., 2007) (Van Guilder GP. et coll., 2007) (Nyberg M. et coll., 2014).

Aussi, l'impact de l'entraînement physique sur la régulation sympathique de la fonction vasculaire n'est pas définitivement établi, et les résultats diffèrent d'une étude à l'autre. D'une part, il est constaté que l'exercice modifie l'équilibre du système nerveux autonome en faveur de la fonction parasympathique par rapport à celle du système sympathique (Pagkalos M. et coll., 2008) (Mueller PJ., 2010) (Munk PS. et coll., 2010), suggérant que l'entraînement est capable de réguler le tonus vasculaire de manière à favoriser la vasodilatation et diminuer le tonus vasoconstricteur. D'autre part, certaines études suggèrent que l'entraînement peut augmenter le tonus vasoconstricteur sympathique au repos (Alvarez GE. et coll., 2005) (Sugawara J. et coll., 2007), alors que d'autres suggèrent qu'après l'exercice (au repos) le contrôle nerveux sympathique est réduit alors que durant les sessions d'exercice ce contrôle est augmenté (Ray CA., 1999). Il est donc logique de proposer que l'augmentation de la fonction vasodilatatrice artérielle induite par l'entraînement physique est compensée au repos, par une augmentation du tonus sympathique capable de laisser le débit sanguin et le diamètre artériel inchangés (Roveda F. et coll., 2003) (Carter JR. et Ray CA., 2015).

II.4.3. Entraînement physique intensif contre entraînement physique modéré

Il existe plusieurs types d'entraînement physique selon le niveau d'énergie dépensé durant l'exercice et le temps de cet exercice. Le terme « dose » est utilisé fréquemment dans la description de l'activité physique, mais « dose » peut être interprétée de plusieurs façons : en tant qu'une quantité totale d'activité physique (c'est-à-dire l'énergie totale dépensée) ou en tant que l'intensité, la durée ou la fréquence d'activité (Haskell WL. et coll., 2007).

En effet, les activités physiques sont classées en deux catégories : l'entraînement physique intensif et l'entraînement physique modéré.

Selon les recommandations de l'American College of Sports Medicine (ACSM) et l'American Heart Association (AHA) publiées en 2007, dans le journal de "Circulation" (Haskell WL. et coll., 2007) : "pour promouvoir et maintenir une vie saine, les adultes en bonne santé âgés de 18 à 65 ans ont besoin de faire de l'activité physique en aérobie à une intensité modérée pendant un minimum de 30 minutes, cinq jours par semaine ou une activité en aérobie intensive pour un minimum de 20 minutes, trois jours par semaine". Des combinaisons des exercices physiques modérés et intensifs peuvent être réalisés pour répondre à ces recommandations. Par exemple, une personne peut répondre à ces recommandations en marchant rapidement pendant 30 minutes deux fois par semaine, puis faire du jogging-plus intense- pendant 20 minutes deux autres jours de la semaine (Haskell WL. et coll., 2007).

Ces deux types d'entraînement physique ne se diffèrent pas seulement par leurs intensités mais aussi bien par leurs effets sur le système cardiovasculaire. Ainsi, on trouve que l'entraînement physique intensif apporte, chez l'Homme aussi bien que chez les modèles animaux, des effets bénéfiques sur le système cardiovasculaire plus importants que ceux induits par l'entraînement modéré (Guiraud T. et coll., 2012) (Trachsel LD., 2016) (Gayda M. et coll., 2016) (Bourdier G. et coll., 2016) (Besnier F. et coll., 2016) (Davis B. et coll., 2013) (Ravi Kiran T. et coll., 2006) (Soares ER. et coll., 2011). En effet, les études chez l'Homme montrent que l'entraînement intensif est plus efficace que l'entraînement modéré dans la réduction l'activation sympathique et l'amélioration de la pression artérielle (Guiraud T. et coll., 2012) (Trachsel LD., 2016). Une étude réalisée par Giolac et ses collaborateurs, sur des femmes qui ont des parents hypertendus, montre qu'un protocole d'entraînement physique intensif est plus efficace dans la prévention de l'hypertension héréditaire chez ces femmes qu'un protocole d'entraînement modéré. Ainsi, l'exercice intensif a réduit les altérations métaboliques et hormonales impliquées dans la physiopathologie de l'hypertension artérielle, à des valeurs plus proches de la normale que celles résultant de l'entraînement modéré. De même, le taux de l'ET-1 était réduit par les deux protocoles d'exercice alors que le taux de NO était augmenté uniquement durant l'exercice intensif, ce qui montre qu'il est le plus efficace dans l'amélioration de la fonction endothéliale et donc dans la prévention de l'hypertension artérielle (Giolac EG. et coll., 2010). Une autre étude récente réalisée sur des hommes âgés, par Bailey et ses collaborateurs, montre que l'intensité de

l'exercice physique module son effet sur les capacités cardio-respiratoires de ces sujets. Ainsi, on trouve que, par comparaison avec l'exercice modéré, l'exercice physique augmente la dilatation dépendante du flux (flow mediated dilation) d'une façon persistante, alors que l'augmentation induite par l'exercice à intensité modéré est transitoire et est normalisée rapidement (Bailey TG. et coll., 2017). La dilatation dépendante du flux est classiquement mesurée (comme l'épaisseur intima-média) au niveau de l'artère brachiale des personnes âgées pour évaluer le risque des maladies cardiovasculaires (Seals DR. et coll., 2009). Etant principalement causée par la libération du NO par les cellules endothéliales, sa mesure reflète l'état fonctionnel de l'endothélium des vaisseaux sanguins (Shcheter M. et coll., 2009). Donc, dans cette étude, l'entraînement physique intensif était le seul protocole efficace dans l'amélioration de la fonction endothéliale des artères chez les personnes âgées et la prévention des maladies cardiovasculaires. D'autre part, les études réalisées sur le modèle animal montrent la plus grande efficacité de l'entraînement intensif sur l'entraînement modéré dans la prévention et le traitement des complications du système cardiovasculaire. En effet, une étude réalisée au sein de notre laboratoire HP2 par Bourdier et ses collaborateurs montre que chez les rats ayant subi une ischémie-reperfusion suite à leur exposition à l'HI, l'entraînement physique intensif améliore leur pression artérielle et prévient l'élévation de la taille de l'infarctus du myocarde induit par l'HI. Cet effet est dû au rôle de l'entraînement physique intensif dans la limitation de la voie de signalisation pro-apoptotique du stress du reticulum endoplasmique (Bourdier G. et coll., 2016). Une autre étude réalisée par Baptista et ses collaborateurs, révèle que les séances de course de rats sur un tapis roulant (comme modèle d'exercice intensif) sont plus efficaces que les séances de nage (comme modèle d'exercice modéré) dans les adaptations physiologiques liées au système cardiovasculaire. En effet, l'exercice intensif sur le tapis roulant était le seul protocole ayant la capacité de moduler le système sérotoninergique qui est le responsable de la production de la sérotonine (Baptista S. et coll., 2008). La sérotonine joue un rôle important dans la régulation du tonus vasculaire : la vasodilatation produite par le NO dont sa libération des cellules endothéliales se fait via la sérotonine (Gray EA. et coll., 2013) (Moysés MR. et coll., 2001). De plus, la sérotonine inhibe la libération de norépinephrine, un neurotransmetteur agissant sur les récepteurs alpha-adrénergiques, provoque une vasoconstriction, par les nerfs sympathiques (Yokoyama T. et coll., 2015) (Gray EA. et coll., 2013). Donc la course sur tapis roulant favorise la vasodilatation, limite la vasoconstriction et assure la prévention des

complications cardiovasculaires.

De même, Davis et ses collaborateurs, dans leur revue sur les effets des différents protocoles d'exercice sur la santé cardiovasculaires des rongeurs concluent que tous les protocoles d'exercice ont le même effet sur la réduction du taux du cholestérol circulant dans le sang, alors qu'un protocole d'exercice physique intensif reste le plus efficace dans l'amélioration de la fonction du système sérotoninergique ayant un effet relaxant sur le tonus vasculaire (Davis B. et coll., 2013).

III. Récapitulatif des problématiques ayant motivé la réalisation de mon travail de thèse et objectifs scientifiques

La revue de littérature, détaillée dans la partie précédente, met en évidence le risque cardiovasculaire associé au syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS), qui est une pathologie qui touche les personnes de tout âge des deux sexes (Lévy P. et coll., 2012), avec une prévalence plus importante chez les hommes que chez les femmes et qui augmente avec l'âge (Sforza E. et coll., 2017). L'hypoxie intermittente chronique (HI), la conséquence pathogène majeure liée au SAOS, est responsable des morbidités cardiovasculaires, y compris les accidents vasculaires cérébraux, les insuffisances et arythmies cardiaques, le remodelage et la dysfonction vasculaire, et l'hypertension artérielle pulmonaire et systémique (Lévy P. et coll., 2015) (Dempsey JA. et coll., 2010).

Dans mon travail de thèse, je me suis donc intéressée aux dysfonctions vasculaires, principalement l'hypertension artérielle, le remodelage et la dysfonction vasculaires. Pour cela nous avons choisi d'étudier comment l'HI peut contribuer à leurs survenues par ses effets sur la voie de signalisation du calcium, qui contrôle la contraction du muscle lisse et strié.

De plus, nous avons montré, dans la partie introductive, les effets bénéfiques de l'entraînement physique sur la structure et la fonction du système cardiovasculaire. Dans mes recherches de thèse, je me suis focalisée particulièrement sur l'effet bénéfique de l'exercice physique intensif sur le système vasculaire. Ceci nous a donc conduit à formuler l'hypothèse que l'entraînement physique intensif (EI) pourrait être un traitement potentiel curatif ou préventif non-pharmacologique des pathologies vasculaires induites par l'HI, en particulier l'hypertension artérielle, le remodelage et la dysfonction artériels.

Nous avons choisi le rat comme modèle animal pour réaliser notre étude. Ce modèle est largement utilisé dans ce domaine et il a été mis en évidence le fait que l'exposition des rats à l'HI est suffisante pour induire et étudier les pathologies cardiovasculaires liées au SAOS (Prabhakar NR. et coll., 2007).

En premier lieu, nous avons étudié les effets de l'HI sur le système vasculaire des rats à l'échelle physiologique (par mesure du poids, de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de la réactivité vasculaire par myographie de tension sur vaisseaux isolés), à l'échelle cellulaire (par l'étude de la signalisation calcique sur culture de cellules musculaires lisses vasculaires et la mesure des épaisseurs intima-média des vaisseaux) et à l'échelle moléculaire (par l'étude de l'expression des gènes codant pour les protéines responsables de la signalisation du calcium et de la contraction des vaisseaux, par Q-PCR et WB) ainsi que les effets de l'EI sur ces mêmes paramètres. Le but est de vérifier, à travers différents niveaux que l'EI est capable d'abolir ou de limiter les effets délétères de l'HI, et ainsi de proposer l'EI comme traitement/prévention des pathologies vasculaires induites par l'HI.

Ensuite, et après avoir évalué tous ces changements dans le muscle lisse vasculaire, une partie de notre travail a eu pour but d'étudier les effets des mêmes paramètres environnementaux (HI et EI) sur les muscles squelettiques. Comme nous l'avons expliqué dans l'introduction, plusieurs différences existent entre les différents types de muscles, mais la contraction reste le phénomène majeur commun. Comme toute contraction musculaire est dépendante du calcium, nous avons donc choisi d'étudier les voies de signalisation du calcium, responsables de la contraction musculaire des muscles squelettiques (Wakizaka M. et coll., 2017) et des muscles lisses (Hill-Eubanks DC. et coll., 2011). Ceci permet d'évaluer les éventuels changements qui peuvent avoir lieu au niveau des récepteurs responsables de la signalisation du calcium à l'intérieur des cellules musculaires des rats suite à leur exposition à l'HI et à l'EI.

Nous avons donc étudié, dans la deuxième partie de notre travail de recherche, les effets de l'HI et l'EI sur les constituants moléculaires majeurs de la voie de signalisation calcique dans trois tissus musculaires squelettiques extraits des membres inférieurs des rats : le muscle gastrocnémien, le muscle soléaire et le muscle plantaire.

Au regard de tout ce qui précède, le travail de cette thèse peut être divisé en deux parties, dont chacune répond à une série de questions.

La première partie répond aux questions suivantes :

Est ce que l'exposition des rats à l'HI va entraîner des changements physiologiques et des complications cardiovasculaires observés chez les patients ayant le SAOS ? Si oui, comment leurs vaisseaux (artères élastiques et artères musculaires) vont répondre à l'HI au niveau de leur

structure et leur fonction, en particulier la réactivité vasculaire et les voies de signalisation du calcium sous-jacentes ?

D'autre part et en parallèle, comme l'EI est bien connu pour prévenir et traiter de nombreuses MCV, l'EI sera-t-il un bon traitement curatif ou préventif des complications vasculaires dans le cas du SAOS en corrigeant les effets de l'HI sur la voie signalisation calcique ?

Dans la suite de notre travail nous avons étudié un autre type de muscle, le muscle strié squelettique qui est directement sollicité lors de l'entraînement physique. La deuxième partie de notre recherche répond aux questions suivantes :

Comment l'HI va affecter le niveau d'expression des protéines de la gestion de calcium et des protéines effectrices du couplage excitation-contraction dans les muscles striés squelettiques ? Est ce que les mêmes protéines sont sollicitées dans le muscle strié squelettique et le muscle lisse vasculaire ?

Et d'autre part, comment l'EI va affecter à son tour l'expression de ces mêmes protéines de la voie de signalisation de calcium et du couplage excitation-contraction dans les muscles striés squelettiques?

Les résultats obtenus seront présentées dans la partie V.

IV. Matériels et méthodes

IV.1. Modèle expérimental

L'étude du système cardiovasculaire passe par l'utilisation d'un modèle animal qui possède une organisation proche de celle de l'Homme. Dans notre étude, des rats Wistar males adultes âgés de 6 à 7 semaines pesant 250 à 350 g ont été utilisés (hébergement : 4 rats par cage). Les rats ont été maintenus dans un cycle lumière-obscurité 12/12h (période d'éclairage: 8h-20h) dans des conditions de température contrôlées ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) avec un accès libre à l'alimentation et à l'eau. Toutes les procédures expérimentales ont été réalisées conformément aux lois sur l'expérimentation animale (approbation du ministère de l'agriculture n° C3851610006), issues de la Convention européenne sur la protection des animaux vertébrés utilisés à des fins expérimentales ou à d'autres fins scientifiques STE 123 (décret n° 2001-486), ainsi que de la directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil Européen relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (décret n° 2013-118). L'élevage Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, France) est le fournisseur exclusif pour cette étude. Le protocole a été approuvé par le comité d'éthique de recherche animale de l'Université Grenoble Alpes et l'approbation du ministère de la recherche : numéro d'autorisation 2015031116526943_v (APAFIS #431).

IV.2. Les conditions de l'étude

Les rats ont été distribués aléatoirement dans 4 groupes :

- 1) **N** (Normoxic) : correspondant aux rats sédentaires normoxiques (10-15 rats).
- 2) **IH** (Intermittent Hypoxia) : correspondant aux rats sédentaires en hypoxie intermittente (10-15 rats).
- 3) **NIT** (Normoxic Intensively Trained) : correspondant aux rats normoxiques entraînés de façon intensive (10-15 rats).
- 4) **IHIT** (Intermittent Hypoxia Intensively Trained) : correspondant aux rats en hypoxie intermittente entraînés de façon intensive (10-15 rats).

IV.3. Suivi du poids

Le poids des rats est mesuré chaque matin avant leur exposition à l'hypoxie/normoxie jusqu'au jour du sacrifice. Ce suivi de poids est nécessaire afin de vérifier la perte de poids systématique, constatée chez les sujets soumis à l'hypoxie intermittente (Hoppeler H. et coll., 1990) (Bigard X. et coll., 2000) (Daneshrad Z. et coll., 2000), qui génère une diminution de prise alimentaire (Tonini J. et coll., 2007).

IV.4. Exposition à l'hypoxie intermittente chronique

L'hypoxie intermittente chronique (HI) est la conséquence majeure du SAOS, et elle est associée à la plupart des pathologies cardiovasculaires qui y sont associés (Kanagy NL., 2009) (Dempsey JA. et coll., 2010). Les effets de l'HI sur le système cardiovasculaire sont observés chez l'Homme aussi bien que dans le modèle murin (Lévy P. et coll., 2008) (Dematteis M. et coll., 2008) (Davis EM. et O'Donnell CP., 2013). Pour cela, la soumission des rats (ou souris) à l'HI est classiquement utilisé par les chercheurs pour étudier les phénomènes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux complications et pathologies cardiovasculaires observés chez les patients SAOS (Sica AL. et coll., 2000) (Dematteis M. et coll., 2008) (Davis EM. et O'Donnell CP., 2013) (Castro-Grattoni AL. et coll., 2016). Le dispositif d'HI avec système de pilotage informatisé que nous utilisons dans cette étude a été développé au sein de notre laboratoire HP2 en collaboration avec un partenaire industriel (Entreprise André Cros S.A., Echirolles, France).

IV.4.1. Dispositif d'exposition à l'HI

Le système d'exposition des animaux à l'hypoxie intermittente consiste en un extracteur d'azote situé sur le toit du bâtiment, et en un mélangeur/injecteur de l'azote extrait qui permet de faire diminuer le taux d'oxygène de l'air présent dans les cages des rats (Fig. 32). Ce système est complété par un analyseur de gaz (ML206, AD instruments, Oxford, UK), utilisé pour vérifier le teneur en O₂ de l'air dans les cages.

Le dispositif d'exposition à l'HI est muni de valves qui s'ouvrent et se ferment automatiquement toutes les 30 secondes en injectant dans les cages un mélange air/azote qui établit la teneur de l'air en oxygène à la valeur voulue à l'intérieur des cages.

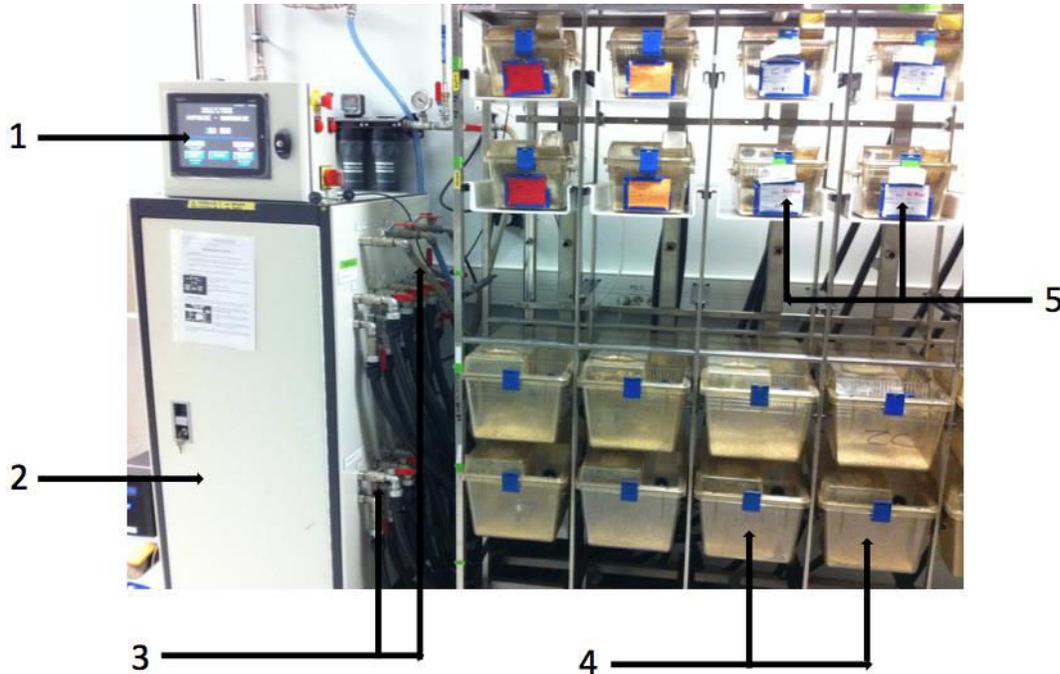


Figure 32 : Dispositif d'exposition à l'hypoxie intermittente pour rats/souris de l'animalerie du laboratoire HP2. 1 : écran tactile de pilotage permettant la visualisation des variations de la teneur en oxygène, 2 : injecteur d'azote, 3 : tuyaux distribuant le mélange de air/azote vers les cages, 4 : cages plexiglas contenant des rats, 5 : cages plexiglas contenant des souris.

IV.4.2. Protocole d'exposition

Les cages contenant les rats en hypoxie intermittente (HI) sont alimentées par de l'air avec une composition de 5% en O_2 (hypoxie) pendant 30 s, suivi par une injection pendant 30 s d'air normal pour restaurer la normoxie (21% O_2) (Fig. 33). Les cages des rats témoins (normoxie, N, 21% O_2 en continu) reçoivent des injections d'air toutes les 30 s, avec ouverture et fermeture des valves induisant sur les rats les mêmes perturbations de bruit et de flux d'air que celles que subissent les rats en HI. Ces cycles d'HI, ou d'injection d'air pour les animaux témoins, ont été répétés 8h / jour (correspondant à la durée moyenne du sommeil chez l'Homme) sur une durée de 21 jours (Belaidi E. et coll., 2009) (Dematteis M. et coll., 2009). Durant les 16h restantes par cycle de 24h, les rats respirent de l'air atmosphérique (21% O_2).

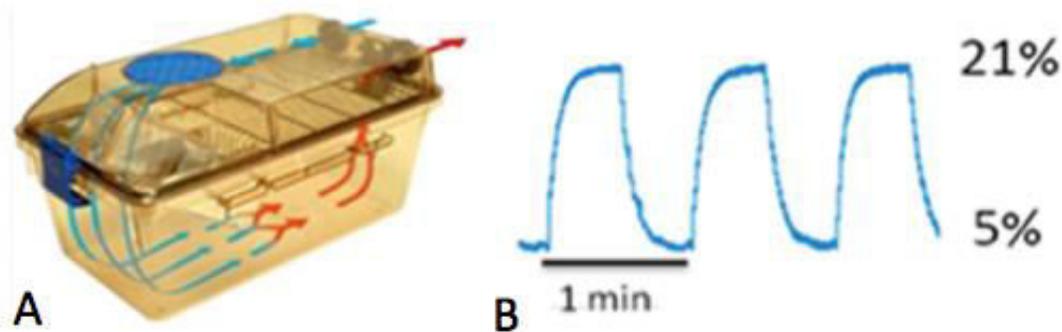


Figure 33 : (A) Image montrant une cage en plexiglas dans lequel les rats sont exposés à l'HI avec les flèches montrant les mouvements de l'air intérieur. (B) : Schéma représentatif des cycles d'hypoxie intermittente en termes de pourcentage d'oxygène de l'air présent dans les cages en fonction du temps (HP2., 2017).

IV.5. Programme d'entraînement physique intensif

IV.5.1. Choix du protocole d'entraînement

L'entraînement utilisé dans notre étude est un entraînement aérobie, qui utilise l'oxygène pour la production de l'énergie nécessaire à l'organisme. Ce type d'activité physique ne doit pas imposer de difficultés dans la respiration ni de douleurs musculaires. Plusieurs protocoles ont été testés et validés au sein de notre laboratoire, en se fondant sur la vitesse maximal aérobie (VMA) que les rats peuvent atteindre en course sur un tapis roulant. La VMA, par définition, c'est la plus petite vitesse de course (à pied) sur piste (e.g. tapis roulant) à partir de laquelle l'individu (ou l'animal) atteint la plus forte consommation d'oxygène, c'est-à-dire atteint la VO_2Max . Deux protocoles d'exercice ont été ainsi validés au sein du laboratoire HP2 (Bourdier G. et coll., 2016) : un

entraînement physique à intensité modérée : à 75% de la VMA et un entraînement physique à forte intensité : à 90% de la VMA. En comparant les données obtenus de ces deux types d'exercice, aussi bien que les résultats provenant d'autres études menées chez l'Homme et chez l'animal (voir les détails et les références dans la dernière partie de l'introduction : chapitre II.4.3), il apparaît que l'exercice intensif est le plus efficace dans le traitement et la prévention des complications du système cardiovasculaire. Ceci nous a encouragés à adopter un entraînement physique à forte intensité à 90% de la VMA.

IV.5.2. Détails du protocole d'entraînement

Les séances d'exercice ont été effectuées 5 fois / semaine (du lundi au vendredi) pour les rats du groupe NIT et IHIT pendant les 21 jours correspondant à la période de passage dans les cages à atmosphère contrôlée. L'entraînement consiste en une course sur tapis roulant, inclinaison 0% (Bioseb, Vitrolles, France). Durant la première semaine d'exposition à l'HI, les rats subissent des séances de pré-entraînement (acclimatation), durant lesquels ils font de la marche rapide sur tapis roulant avec des vitesses modérées qui varient entre 10 et 16 m/min pendant 15-20 minutes. Durant les deuxième et troisième semaines, les rats se voient imposés chaque jour une course à vitesse croissante sur un tapis roulant (Fig. 34). Cet entraînement quotidien est composé de deux séances de course de 24 minutes séparées par 30 minutes de pause. Durant la pause, les rats ont un accès libre à la nourriture et à l'eau.

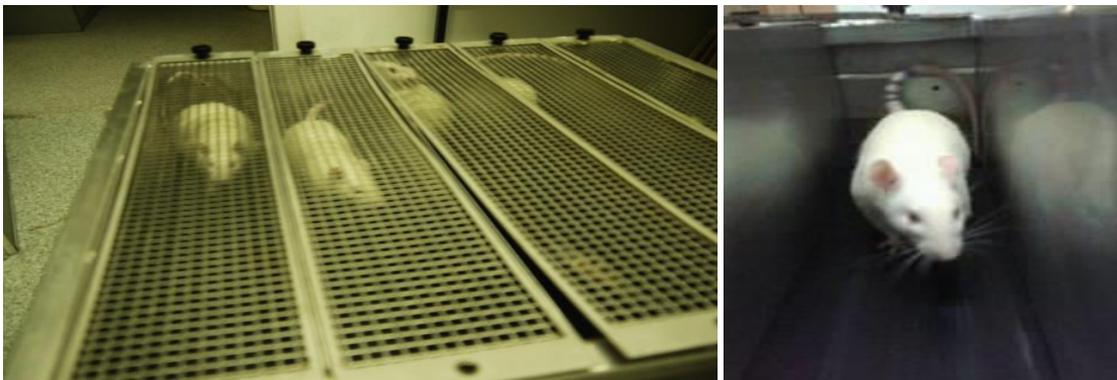


Figure 34 : Prises de vue du dispositif d'entraînement sur tapis roulant.

Durant les périodes de course, la vitesse du tapis roulant a été fixée à 16 m/min pour la première étape qui correspond à un échauffement de 6 min (50% de la VMA), suivie de six étapes de 3 min chacune avec une vitesse croissante (correspondant à 65%, 70 %, 75%, 80%, 85% et 90% de la VMA) pour atteindre 30 m/min après 24 minutes (Fig. 35).

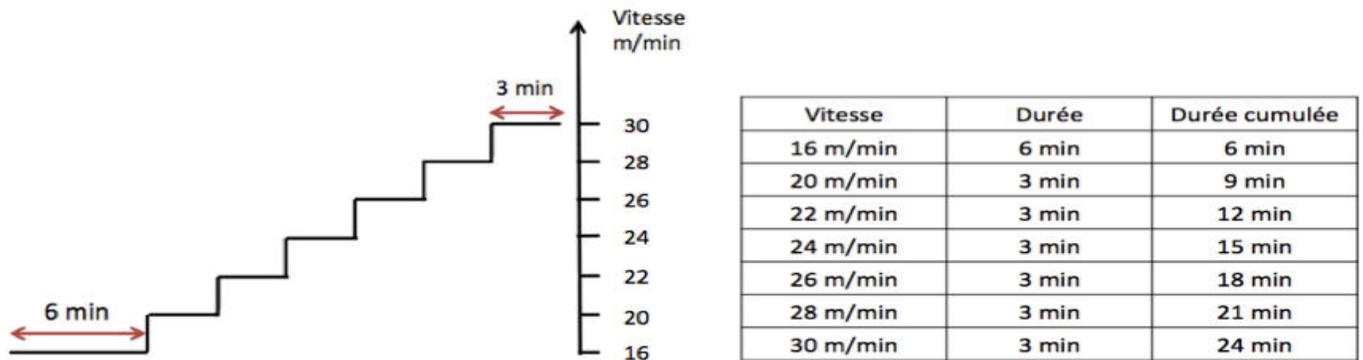


Figure 35 : Schéma et tableau représentatifs du protocole de course (entraînement intensif) suivi par les rats sur tapis roulant, faisant état des vitesses croissantes au cours du temps pendant chaque période de 24 minutes de course.

IV.6. Mesure des paramètres physiologiques

IV.6.1. Technique de mesure *in vivo* de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque

Après l'anesthésie des rats par l'injection intrapéritoniale de 60 mg/kg de pentobarbital sodique (Sanofi, Libourne, France), la pression artérielle (PA) et la fréquence cardiaque (FC) sont mesurées *in vivo* d'une façon invasive, à l'aide d'un capteur de pression relié à un cathéter artériel (composé de silicone et polyéthylène, 1,14 mm de diamètre, Scientific Commodities Inc., cat #PE-60, Arizona, USA) héparinée (500 UI /ml) pour éviter la coagulation du sang (Stanke-Labesque F. et coll., 2001). La peau du rat est incisée (sur 1-2 cm) ventralement au niveau du

cou, le cathéter est ensuite inséré dans la carotide droite de l'animale, puis par le biais de l'aorte ascendante dans le ventricule droit. L'acquisition des données était réalisées à l'aide d'un capteur de pression (MLT844, AD instrument, Harvard, UK) connecté à une interface Powerlab – 8/35 modèle (AD instrument, Harvard, UK) couplée à un ordinateur, et les données sont enregistrées et traitées à l'aide du logiciel LabChart (AD instrument, Harvard, UK) (Jespersen B. et coll., 2012). La PA systolique et diastolique, ainsi que la fréquence cardiaque sont enregistrées durant 5 minutes en continu jusqu'à l'obtention d'une valeur stable. La PA moyenne est calculé ensuite selon la formule suivante : $PA \text{ moyenne} = (PA \text{ systolique} + 2 PA \text{ diastolique})/3$.

IV.6.2. Méthode de mesure de l'hématocrite

L'hématocrite désigne le pourcentage du volume des globules rouges par rapport au volume sanguin total. En cas d'hypoxie, ce pourcentage augmente, ce qui correspond à la réponse de l'organisme pour compenser le manque d'oxygène. Suite à la mesure de la PA et de la FC, les animaux sont héparinés par injection de 500 U/kg d'héparine (Sanofi Winthrop, Gentilly, France) dans la veine saphène. Le sang est ensuite récolté, après exsanguination de l'aorte, par capillarité dans des tubes capillaires (cat #090529, Dutschter, Brumath, France) et centrifugé (13 000 rpm/ 20 000 G pendant 7 min à 21 °C). Après cette centrifugation, tous les globules rouges se rassemblent au fond du tube, ce qui permet de mesurer le rapport entre le volume des globules rouges (G) et le volume total du sang (T). L'hématocrite est ensuite calculé selon la formule suivante : $G/T \times 100$. Le résultat obtenu ainsi représente l'hématocrite en % (Mahiny AJ. et coll., 2016).

IV.7. Dissection

Choix et prélèvement des muscles et vaisseaux sanguins

Après mesure des paramètres physiologiques *in vivo*, les rats sont ensuite euthanasiés par exsanguination, et les tissus sont prélevés.

Notre travail inclut l'étude de différents types de tissus : les vaisseaux sanguins (contenant les muscles lisses) et les muscles squelettiques.

Pour les tissus vasculaires, nous avons prélevé l'aorte thoracique (aorte ascendante, crosse aortique et aorte thoracique descendante), mais aussi l'aorte abdominale, les artères de la première arborescence mésentérique, et les principales artères pulmonaires de l'arborescence intra-pulmonaire du poumon gauche.

L'aorte et les artères ont été nettoyées de tout tissu conjonctif et graisses les entourant. Ainsi, la partie ascendante et la crosse de l'aorte thoracique (section a dans la figure 36), la partie inférieure de l'aorte abdominale (section d de la figure 36) ont été placées pour la moitié d'entre-elles dans du paraformaldehyde (PFA) puis dans un gel : Optimal cutting temperature compound (OCT) pour les études d'histologie (mesure de l'épaisseur intima-média), et pour l'autre moitié d'entre-elles, avec les artères mésentériques supérieure et inférieure (section e de la figure 35) ont été placées immédiatement dans l'azote liquide puis à -80°C sur le long terme pour la réalisation ultérieure des expériences de biologie moléculaires (Q-PCR et Western Blot). La partie supérieure de l'aorte thoracique descendante (section b dans la figure 36) a été utilisée directement après le prélèvement pour mesurer la réactivité vasculaire à l'aide de la technique *ex vivo* de myographie de tension, qui sera détaillée plus loin. La partie inférieure de l'aorte thoracique descendante ainsi que la partie supérieure de l'aorte abdominale (section c), sont utilisées immédiatement après le sacrifice des rats, pour la culture primaire des CMLV.

Les artères intra-pulmonaires gauches (partie f de la figure 36, à gauche) et l'artère carotide gauche (section g de la figure 36) sont placées dans PFA puis du gel OCT pour être ultérieurement utilisées en histologie pour la mesure de l'épaisseur de l'intima-média.

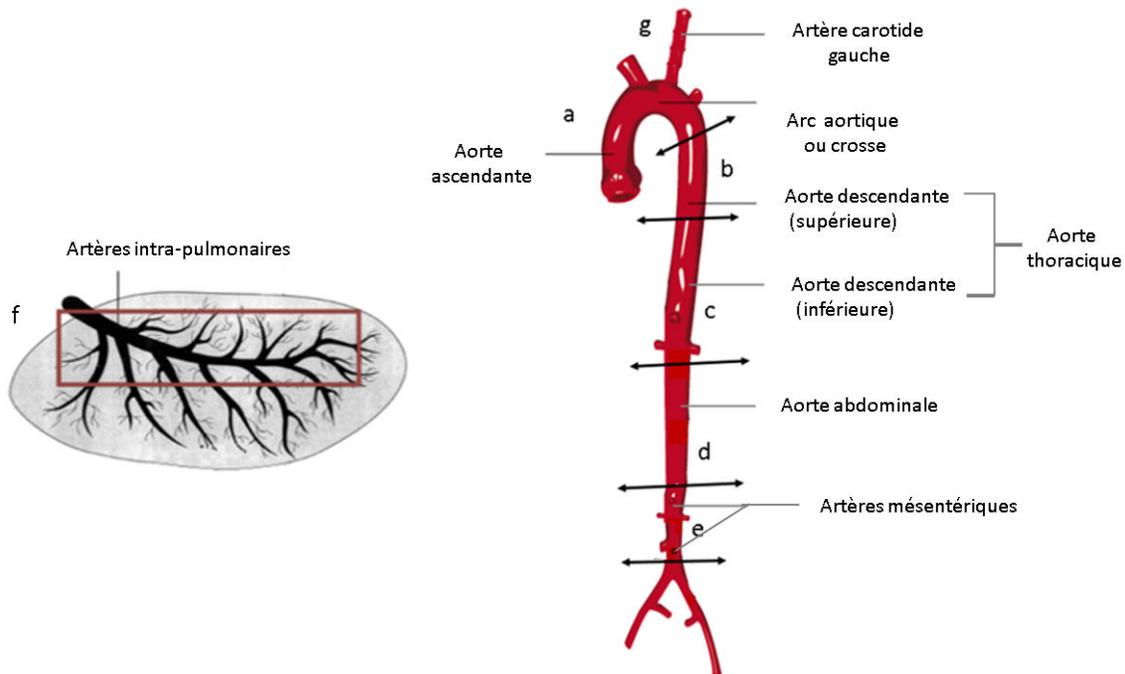


Figure 36 : Schémas montrant les différentes artères prélevées des rats. Les sections de a à e de l'aorte (à droite) sont : a : aorte ascendante et crosse de l'aorte, b : partie supérieure de l'aorte thoracique descendante, c : partie inférieure de l'aorte thoracique descendante et partie supérieure de l'aorte abdominale, d ; partie inférieure de l'aorte abdominale, e : artères mésentériques (inférieure et supérieure), f : dans le poumon gauche (à gauche), les portions des artères pulmonaires prélevées sont indiquées dans le rectangle rouge, g : l'artère carotide gauche.

Concernant les muscles squelettiques, nous avons choisi d'étudier les 3 muscles de la patte postérieure gauche des rats, qui ont été stockés à -80°C pour la réalisation ultérieure des expériences de biologie moléculaires (Q-PCR). Ces trois muscles sont :

- Le muscle gastrocnémien (gastrocnemius) : c'est le muscle du triceps sural (mollet). Le muscle gastrocnémien comporte deux faisceaux : le gastrocnémien latéral et le gastrocnémien médial, qui sont situés sur le muscle soléaire et donnent la forme ronde à l'ensemble musculaire (Fig. 37).
- Le muscle soléaire (soleus), un muscle épais et profond situé à l'arrière de la patte. Il s'insère en haut sur la partie supérieure du péroné (= fibula), l'un des 2 os de la patte, et sur l'arc tendineux qui relie la tête du péroné à celle du tibia (Fig. 37).
- Le muscle plantaire (plantaris), localisé entre le gastrocnémien et le soléaire, est un muscle appartenant à la partie superficielle du mollet, le plus souvent attaché au muscle gastrocnémien (Fig. 37).

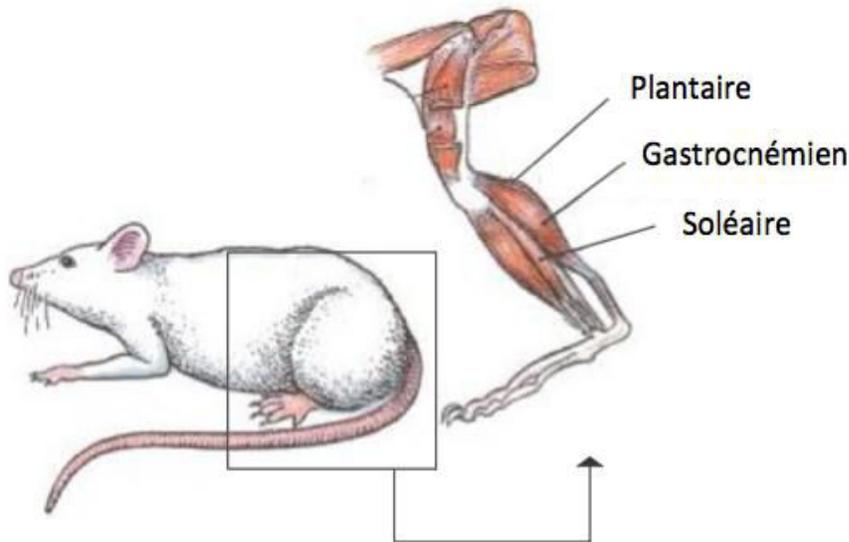


Figure 37 : Figure montrant les trois muscles squelettiques (soléaire, gastrocnémien et plantaire) prélevés de la patte inférieure des rats (Bender DA., 2014).

Nous avons choisi ces 3 muscles squelettiques, comme déjà détaillé dans l'introduction bibliographique, en raison de leurs différences structurales, métaboliques et fonctionnelles :

1) la composition en fibres musculaires :

- le muscle plantaire qui est un muscle dit blanc et rapide, possède une composition mixte avec une majorité de fibres rapides (70%) par rapport aux fibres lentes (30%).
- le muscle soléaire est un muscle rouge et lent, composé essentiellement de fibres lentes (98%), le reste étant des fibres rapides.
- le muscle gastrocnémien est un muscle mixte composé de (45%) de fibres blanches rapides et (55%) de fibres rouges lentes.

2) le degré de recrutement pendant la course : le muscle plantaire est le premier muscle recruté suivi par le muscle gastrocnémien profond (rouge), puis le muscle soléaire. Le muscle gastrocnémien superficiel (blanc) n'est pas recruté à la course et peut donc servir de témoin négatif.

3) le profil métabolique : les muscles plantaire et soléaire se caractérisent par un profil oxydatif, lié à une densité mitochondriale importante. A l'inverse, le muscle gastrocnémien superficiel se caractérise par un profil glycolytique dû à des capacités oxydatives plus faibles (moins de mitochondries).

IV.8. Technique d'étude *ex vivo* de la réactivité vasculaire de l'aorte : myographie de tension

IV.8.1. Description du dispositif expérimental

La mesure de la réactivité vasculaire *ex vivo* a lieu dans un système expérimental qui consiste en une cuve thermostatée à 37°C contenant du liquide physiologique (10 ml) dans laquelle un segment (anneau) d'aorte de 2-3mm de longueur est placé. Deux petits crochets d'acier inoxydable sont passés à travers la lumière de l'anneau aortique : l'un étant relié à un support fixe et l'autre étant relié à un mécano-transducteur. Ce dernier permet la détection de la tension exercée par la contraction de l'anneau d'aorte. Le système utilisé comporte 8 de ces cuves qui permettent d'étudier la réactivité de 8 anneaux aortiques en parallèle. L'information est ainsi transférée, après amplification du signal, vers un système informatique d'enregistrement et d'analyse de données (LabChart- Life Science Data Acquisition and Analysis software- AD instrument, Paris, France). Ce montage est présenté dans la figure 38.

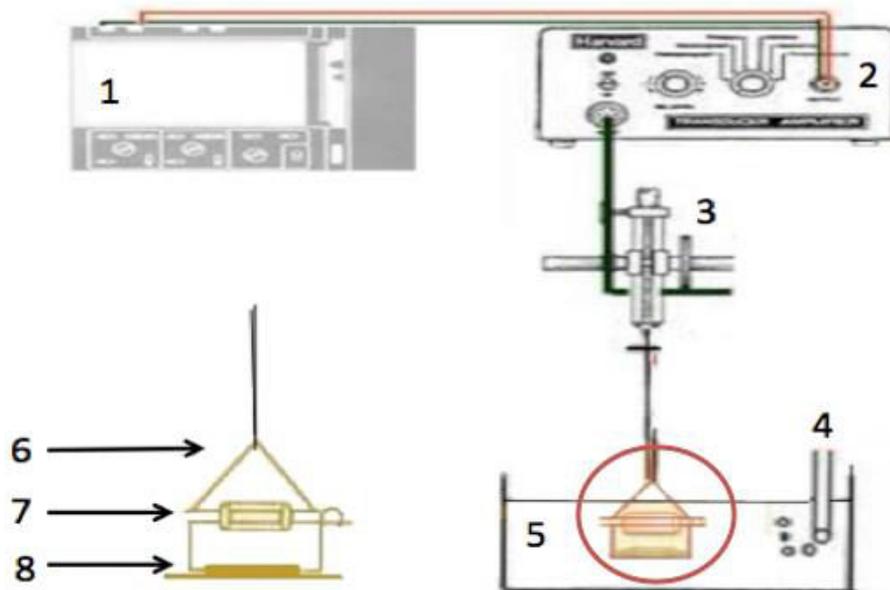


Figure 38 : Représentation schématique du montage utilisé pour étudier la réactivité vasculaire des anneaux d'aorte thoracique descendante de rat. 1 : Système informatique d'acquisition et d'analyse de données AD-instrument, 2 : amplificateur 3 : capteur de tension (mécano-transducteur), 4 : bullage 95% O₂ / 5% CO₂, 5 : bain d'organe rempli d'une solution physiologique décrite plus loin, chauffée à 37°C. Les parties 6, 7 et 8 sont un grossissement des parties du système situées dans le cercle rouge de la partie de droite du schéma. 6 : crochet d'acier inoxydable relié au capteur de tension, 7 : anneau de vaisseau placé entre les deux crochets d'acier, 8 : crochet d'acier inoxydable relié à un support fixe.

IV.8.2. Protocole

Comme cela a déjà été mentionné, les rats subissent une injection préalable de 500 U/kg d'héparine (Sanofi Winthrop, Gentilly, France) dans le but d'éviter la coagulation sanguine pendant la dissection, qui pourraient endommager l'endothélium vasculaire. L'aorte thoracique descendante, prélevée soigneusement et nettoyée de tout tissu conjonctif et graisses, est coupée en segments de 2-3 mm de largeur (= anneaux) qui pourront être montés entre les deux crochets du système décrit précédemment.

Chaque anneau aortique est placé dans une cuve contenant du liquide physiologique qui a la composition suivante : 118 mM NaCl (cat #433209 Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 5,6 mM KCl (cat #P9333 Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1,2 mM MgCl₂ (cat #M8266, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 1,2 mM KH₂PO₄ (cat #M8266, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) , 25 mM NaHCO₃ (cat #NIST200B, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 2,4 mM CaCl₂ (cat #449709, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 11 mM Glucose (cat #G8270, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), pH ajusté à 7,4. Ce liquide est préparé le jour de l'expérience, maintenu à une température de 37°C et par bullage (95% O₂ / 5% CO₂) à un pH 7,4. Les anneaux de l'aorte sont ensuite tendus à 1,5 g et laissés en détente pendant une heure tout en remplaçant le liquide physiologique toutes les 15 minutes.

Les anneaux sont ensuite retendus à 1,5 g, et les anneaux sont de nouveau laissés en détente mécanique pendant 15 minutes. À l'issue de cette période de détente de 15 minutes, des agents pharmacologiques vasoactifs sont appliqués sur les vaisseaux. Une augmentation de la tension est le résultat d'une contraction des CMLV de l'anneau d'aorte induite par ces agents alors qu'un relâchement de l'anneau d'aorte diminue la tension exercée sur les crochets (Lautner RQ. et coll., 2017).

Dans un premier temps, la phényléphrine (PE) (cat #P1250000 Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), un agent sympathomimétique synthétique agoniste sélectif des récepteurs α 1-adrénergiques qui induit la contraction de l'aorte et de l'artère pulmonaire chez le rat (Hussain MB. et coll., 1997), est progressivement ajouté dans le bain d'organe à des doses croissantes allant de 10⁻¹¹M à 10⁻⁴M, avec un temps d'action de 15 minutes par dose (temps nécessaire pour que la tension atteigne un plateau). Cette étape est réalisée dans le but d'évaluer l'effet de l'HI et de l'entraînement physique intensif sur la contractilité aortique à des doses croissantes de PE. Un lavage (liquide physiologique seul) durant 30 à 45 minutes est ensuite effectué pour éliminer toute trace de phénylnéphrine des récepteurs alpha1-adrénergiques et ainsi stopper la contraction induite des CMLV (retour de la tension des anneaux de l'aorte jusqu'à la valeur imposée mécaniquement au départ, soit 1,5 g). Une dose de 10⁻⁶M de PE est ensuite ajoutée pour contracter pharmacologiquement les anneaux de l'aorte à un niveau de l'ordre de 75-80% de leur capacité maximale de contraction (Gonzales RJ. et coll., 2000). Ensuite, des doses croissantes d'acétylcholine (Ach, agent vasodilatateur agoniste des récepteurs muscariniques présents sur les

cellules endothéliales (Daeffler L. et coll., 1999), de 10^{-10} M à 10^{-3} M, sont ajoutées (15 min de temps d'action pour chaque dose) (cat # A6625, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). La même dose de 10^{-6} M de PE est maintenue tout au long de l'application des doses croissantes d'Ach. Les effets de la précontraction des anneaux aortiques par la PE peuvent être différents d'un groupe à l'autre. Afin de permettre la comparaison des effets de l'Ach dans les 4 groupes étudiés (N, IH, NIT, IHIT), les valeurs des tensions enregistrées après précontraction des anneaux par la PE (10^{-6} M), qui est la tension de départ avant application de l'Ach, ont été normalisées pour chaque anneau aortique dans tous les groupes. Les valeurs normalisées des tensions initiales sous PE à 10^{-6} M sont donc rendues identiques pour tous les anneaux de tous les groupes. La valeur initiale de normalisation choisie pour la réponse à la PE à 10^{-6} M est la tension moyenne de tous les anneaux de tous les groupes sous l'action de la PE à 10^{-6} M ($=TM_{PE}$). Pour réaliser cette normalisation, pour chaque anneau X, un même facteur multiplicateur est appliqué à toutes les valeurs de tension mesurées (TX) sous PE 10^{-6} M, puis sous l'effet de chaque concentration d'Ach de 10^{-10} M à 10^{-3} M. Ce facteur multiplicateur est égal au rapport de TM_{PE} sur la tension induite par la PE à 10^{-6} M sur l'anneau X concerné (TX_{PE}). Pour chaque anneau X, le calcul de la tension normalisée (TX_N) pour chaque dose de PE ou d'Ach est donc : $TX_N = TX \times (TM_{PE} / TX_{PE})$.

D'autre part, l'effet de chaque dose d'Ach pour chaque anneau aortique X, initialement mesurée comme une valeur de tension en g (TX), a aussi été exprimé comme le pourcentage restant (% de contraction) de la tension de précontraction induite par la PE sur ce même anneau (TX_{PE}). Pour chaque anneau X, le calcul de ce pourcentage de contraction restant pour chaque dose de PE ou d'Ach est donc : % de contraction = $(TX / TX_{PE}) \times 100$.

Les moyennes de toutes ces valeurs ont été calculées et sont représentées (\pm SEM) pour chaque groupe dans les figures correspondantes.

Un autre lavage avec du liquide physiologique, est ensuite effectué pendant 30-45 minutes pour éliminer tous traces d'agents pharmacologiques et/ou déchets métaboliques produits par les cellules.

Nous avons enfin appliqué sur les anneaux aortiques une gamme de concentrations d'endothéline-1 (ET-1, 10^{-12} M à 10^{-5} M, temps d'action de 15 minutes par dose) pour étudier l'effet de l'HI et de l'EI sur la vaso-contraction aortique. L'ET-1 (cat# E7764, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) est le vasoconstricteur endogène le plus puissant qui agit via les

récepteurs ET-A et ET-B qui sont exprimés à la surface des cellules musculaires lisses de la paroi des artères (Ivey ME. et coll., 2008) (Zhai X. et coll., 2017).

IV.9. Etude de la signalisation calcique dans les cellules musculaires lisses vasculaires

IV.9.1. Culture primaire des cellules musculaires lisses vasculaires

Après dissection de l'aorte d'un rat, la partie descendante de l'aorte thoracique et la partie supérieure de l'aorte abdominale (section c de la figure 36) sont utilisées pour la culture cellulaire et maintenue dans une solution Hank's Balanced Salt Solution avec calcium et magnésium, sans rouge de phénol (HBSS, Invitrogen cat. No 14025; Saint Aubin, France) à 4°C (Churchman AT. et coll., 2009). Afin d'isoler les cellules musculaires lisses, l'aorte (partie thoracique et partie abdominale) est tout d'abord débarrassée des tissus conjonctifs et graisseux qui l'entourent, sous loupe binoculaire. Ensuite l'aorte est placée dans une solution HBSS + collagénase de type 2 (1 mg/ml, Worthington Corporation, cat. No. 4174; New Jersey, USA), pendant 1 h à 37°C afin de digérer l'adventice. L'adventice est alors séparé facilement du reste du vaisseau à l'aide de pinces. Ensuite l'aorte est ouverte dans le sens de la longueur afin de gratter la surface interne par des pinces métalliques (stérilisés auparavant) et éliminer l'endothélium. La média est ensuite découpée en bandes (franges) de 1 à 2 mm, avant d'être placée pendant 30 min à 37°C dans un bain d'enzymes, ceci pour améliorer l'action des enzymes sur la dissociation du tissu et faciliter l'extraction des cellules musculaires lisses. Le bain enzymatique contient les composés suivants : papaïne (0,5 mg/ml), collagénase (0,3 mg/ml), L-cystéine (5 mM) préparé dans du HBSS comme solvant. La média est ensuite transférée à l'aide des pinces dans une solution de 2 ml de HBSS pour rincer et éliminer les enzymes (étape répétée deux fois). Elle est ensuite placée dans un système composé d'un petit tube et d'une pipette (Pasteur) en verre, où elle subit une

dissociation mécanique pour libérer les cellules musculaires lisses. La pipette Pasteur, effilée et recouverte de silicone et dont l'extrémité est amincie, est largement utilisée pour dissocier différents types de cellules (Reynolds BA. et Weiss S., 1992) (Kallos MS. et coll., 1999) (Metz RP. et coll., 2012). Cette dissociation est réalisée grâce au frottement du tissu (la média) avec les parois de la pipette en aspirant et refoulant (20-30 fois), ce qui induit une dilacération du tissu et la libération des cellules. Par la suite, les cellules sont comptées au microscope sur cellule de Thoma, puis centrifugées 5 min à 250 x g. Le surnageant est éliminé et le culot de cellules est re-suspendu dans le milieu de culture Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM ; Invitrogen, cat. No. 31966021; Saint Aubin, France). Les cellules sont ensuite déposées dans une plaque de 96 puits. La plaque est alors incubée à 37°C, 5% CO₂ pendant 16 h à 24 h après ajout de 500 µl de milieu de culture composé de DMEM additionné d'autres produits favorisant la prolifération cellulaire dans les meilleures conditions : DMEM (Invitrogen, cat N°. 1600 ; Saint Aubin, France) + 20% (v/v) sérum bovin fœtal (FBS ; invitrogen, cat. N°.1600; Saint Aubin, France) + 1% (v/v) solution pénicilline/streptomycine (Invitrogen, cat. No. 10378; Saint Aubin, France) + 1% solution d'acides aminés non essentiels (Non-Essential Amino Acids Solution, Invitrogen, cat. No. 1140; Saint Aubin, France).

IV.9.2. Mesure de la concentration du calcium cytosolique

24 h après la mise en culture, les cellules subissent un lavage avec une solution de Krebs Hepes-bicarbonate (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 5.5 mM HEPES, 1 mM D-glucose, pH 7,4) pour éliminer le milieu de culture. Ensuite, une solution de Fluo-4 AM (2 µM) est préparée dans la solution de Krebs-bicarbonate. Le Fluo-4 AM est une sonde fluorescente associée à un ester 'acétoxyméthyl' (AM) lui permettant de traverser la membrane cellulaire. Elle est parfaitement adaptée à la mesure de la dynamique des oscillations calciques cytoplasmiques (Gee KR. et coll., 2000). Le chargement des cellules avec le Fluo-4 AM s'effectue en incubant les cellules pendant 1h en présence de 2 µM de Fluo-4 AM, afin d'assurer le chargement du cytoplasme des cellules avec la sonde calcique (Hagen BM. et coll., 2012). Une fois dans le cytosol, le Fluo-4 AM voit ses groupements acétoxyméthyl clivés par les estérases cellulaires, aboutissant à la forme Fluo-4 de la molécule. Le Fluo-4 s'associe au

calcium et lorsque cette sonde est soumise une excitation lumineuse centrée sur son pic d'absorption, autour de 488 nm, l'intensité de l'émission de photons (à 520 nm) par le fluorophore sera principalement dépendante de la concentration de calcium dans le milieu. Cette fluorescence est d'autant plus intense que la concentration de calcium cytosolique est élevée (Paredes RM., 2008).

On observe la variation de fluorescence dans les cellules à l'aide d'un microscope à épifluorescence Olympus IX81 (objectif à bain d'huile x40 ou x60) (Olympus, Hamburg, Germany) qui nous permet d'observer l'intensité, la cinétique et la localisation de l'émission de fluorescence dans les cellules. Le microscope est équipé d'une caméra photométrique EMCCD (electron multiplying charge-coupled device) photométrique de haute sensibilité, développée pour l'imagerie des cellules vivantes DP30BW (Olympus, Hamburg, Germany) qui est pilotée par le logiciel FIJI 1.46 (NIH, Maryland, USA) (Schneider CA. et coll., 2012) (Betzig E. et coll., 2006). Nous avons réalisé une série d'expériences sur les CMLV en culture, en utilisant différents agents pharmacologiques qui sont des agonistes et des antagonistes des récepteurs sensibles au calcium de ces cellules. Ainsi nous avons testé l'action de la caféine, qui est un agoniste des RyR (Kong H. et coll., 2008) à des concentrations millimolaires (1, 2, 5, 10 et 20 mmol/L). En outre, nous avons utilisé la Xestospongine C (10 μ M), qui, à cette concentration est un inhibiteur des IP3Rs (De Smet P. et coll., 1999) (Saleem H. et coll., 2014) (Oka T. et coll., 2002), ainsi que le dantrolène qui, à la concentration de 10 μ M, contrairement à la caféine, agit sur les RyR en bloquant leur activité (Oo YW. et coll., 2015) (Zhao . et coll F., 2001) (Keshavarz M. et coll., 2016) (Liou B. et coll., 2016), induisant ainsi un blocage du couplage excitation-contraction dans les CMLV. Cette approche pharmacologique a eu pour but de mettre en évidence les mécanismes de la régulation de la contraction des CMLV dans les conditions normales et après exposition à l'HI et l'EI.

IV.9.3. Exploitation des résultats

Une vidéo du champ microscopique est enregistrée sur 30 secondes (100 images par seconde), et les données recueillies sont exploitées grâce au logiciel Image J. Il est possible de mesurer la variation de fluorescence au cours du temps d'une partie délimitée d'une cellule ou d'une partie

d'une cellule (ROI, region of interest). Ces variations peuvent être représentées sous forme de graphiques montrant $\Delta F/F_0$.

Avec : $\Delta \text{Fluorescence } (\Delta F) = F_{\text{Max}} - F_0$

Avec F_{Max} qui correspond à l'intensité du signal de fluorescence à son pic et F_0 à l'intensité du signal de fluorescence avant stimulation par l'agoniste (la caféine). Cette méthode de calcul (Maravall M. et coll., 2000) permet de représenter l'amplitude du signal pour une condition donnée, et calculer sa variation en éliminant la différence entre les niveaux basaux de fluorescence de chaque cellule. Le $\Delta F/F_0$ permet de normaliser les valeurs enregistrées après stimulation de la cellule à sa fluorescence de base au repos.

IV.10. Technique de PCR en temps réel (q-PCR)

L'ARN provenant de différents échantillons de tissus congelés (aorte ascendante, crosse de l'aorte et partie inférieure de l'aorte abdominale, artères mésentériques et muscles squelettiques) a été utilisé pour les études de Polymerase Chain Reaction (PCR) en temps réel (q-PCR) afin d'examiner l'expression génique des principaux effecteurs de la voie de signalisation du calcium. Nous avons ainsi mesuré les niveaux des ARNm des trois isoformes des récepteurs de la ryanodine : (RyR1, RyR2, RyR3), codés par les gènes *Ryr1*, *Ryr2*, et *Ryr3* respectivement, du membre 4 de la sous-famille V de canaux cationiques à potentiel de récepteur transitoire V (TRPV4) codé par le gène *Trpv4*, des pompes du Réticulum Sarco / Endoplasmique Ca^{2+} - ATPase (SERCA1 et SERCA2) codés par les gènes *Atp2a1* et *Atp2a2*, du récepteur de l'Inositol 1,4,5-trisphosphate (récepteur IP3 type 1) codé par le gène *Itp1*. Nous avons aussi mesuré l'expression génique de certains acteurs du mécanisme de la contraction et de ses régulateurs au niveau des tissus musculaires : les formes lente et rapide de la troponine, codées par les gènes *Tnnt1*, *Tnnt3*, les 4 isoformes de la tropomyosine (Tm1, Tm2, Tm3, Tm4) codées par les gènes *Tpm1*, *Tpm2*, *Tpm3*, *Tpm4* et les 3 isoformes de la calmoduline (CalM1, CalM2 et CalM3), codées par les gènes *Calm1*, *Calm2*, *Calm3*.

IV.10.1. Extraction des ARN totaux

Afin d'éviter la dégradation de l'ARN, nous avons choisi d'extraire l'ARN des tissus en présence d'azote liquide en utilisant un mortier et un pilon stérilisés. Pour réaliser cette extraction, il est nécessaire de refroidir le matériel utilisé avant de commencer, pour cela l'azote liquide est versé dans le mortier contenant le pilon durant 15-20 minutes avant d'ajouter les tissus. Ensuite le tissu stocké à -80°C est ajouté dans le mortier et est broyé au pilon pour être réduit en poudre. L'intérêt de cette technique est qu'elle permet la protection de l'ARN contre la dégradation en inhibant l'activité des RNAase qui seront inactives à faible température (Chomczynski P. et coll., 2006).

La poudre de tissu est ensuite transférée dans un tube eppendorf stérile contenant du réactif TRI Reagent (cat # T9424 ; Sigma Aldrich, États-Unis) avec un volume de 1ml pour 100 mg de tissu (Rio DC., 2010). Le tube contenant le tissu broyé avec le réactif TRI Reagent est ensuite agité légèrement à la main et laissé pendant 5 minutes à température ambiante, ce temps est nécessaire pour que le TRI Reagent exerce suffisamment son action sur le tissu pour extraire le maximum de molécules d'ARN.

200 μl de chloroforme sont ensuite rajoutés par 1 ml de TRI Reagent, et les tubes sont ensuite agités vigoureusement à la main pendant 15 secondes, puis laissés à température ambiante pendant 5 minutes. Le chloroforme provoque ainsi la séparation de l'ARN des protéines et des autres déchets cellulaires. Les tubes subissent ensuite une centrifugation de $12000\times g$ pendant 15 minutes à 4°C . Deux phases sont alors obtenues : une phase supérieure translucide contenant les ARN, et une phase inférieure de couleur rouge contenant le chloroforme. Seule la phase supérieure translucide contenant les ARN est récupérée et transférée dans un nouveau tube Eppendorf (Rio DC. et coll., 2010). 500 μl d'isopropanol (pour 1 ml de TRI reagent) sont ensuite rajoutés et le tube est laissé au repos durant 10 minutes à température ambiante après une brève agitation vigoureuse à la main (Fanson BG. et coll., 2000).

Le but de cette étape est la précipitation des ARN par l'isopropanol. Ceci est suivi par 15 minutes de centrifugation à 4°C à $12000\times g$, le résultat de cette étape est la formation d'un culot d'ARN. Le culot est ensuite lavé 2 fois avec de l'éthanol 75% (v/v dans une solution aqueuse) puis séché sous la Sorbonne. L'ARN est ensuite dilué dans 20-40 μl d'eau ultra-pure sans ARNase, et il est enfin dosé (voir le prochain paragraphe) puis stocké à -80°C .

Après extraction de l'ARN, et avant de commencer les étapes d'amplification et de quantification des acides nucléiques, il est important de noter que l'ARN est une molécule instable, c'est pour cela nous ne l'utilisons pas directement dans la PCR en temps réel. Il existe une étape intermédiaire, qui est la transformation de l'ARN en ADN complémentaire (ADNc) qui porte une séquence de bases complémentaire de celle de l'ARN.

IV.10.2. Evaluation quantitative et qualitative des ARN totaux extraits

Cette étape consiste à faire un dosage afin de s'assurer de la pureté et de la concentration des ARN extraits ; ceci dans le but de normaliser la concentration de chaque échantillon de façon à obtenir la même quantité d'ADNc résultant avant de commencer la quantification en temps réel. Le dosage est ainsi réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible NanoDrop™ 2000 (Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Cet appareil permet la quantification et l'évaluation de la pureté des échantillons tels que les protéines et les acides nucléiques. Pour cela, il faut déposer 2-3 μ l de l'échantillon sur une petite surface de l'appareil : la surface de mesure optique. Les densités optiques de chaque échantillon seront mesurées à 3 longueurs d'ondes 230, 260 et 280 nm afin d'en déduire la concentration en ARN totaux. Ensuite le logiciel NanoDrop software analyse les résultats de chaque échantillon et affiche la concentration de chacun en ng/ μ l ainsi que le rapport des densités optiques 260/230 et 260/280 (Desjardins P. et coll., 2010). Le lien entre les densités optiques, la concentration en ARN totaux et les différentes longueurs d'ondes sera détaillé dans ce qui suit.

IV.10.2.1. Concentration des ARN et absorbance

Une corrélation directe entre l'absorbance et la concentration des acides nucléiques a été bien établie par la loi de Beer-Lambert (Trumbo TA. et coll., 2013). Les acides nucléiques absorbent la lumière à plusieurs longueurs d'ondes, mais leur pic d'absorption de la lumière UV est à 260nm. C'est pour cette raison que l'absorbance (la quantité de lumière absorbée) à cette

longueur d'onde est utilisée pour déterminer la concentration d'ARN ou d'ADN en solution en appliquant la loi Beer-Lambert. L'équation de cette loi est la suivante : $A = \epsilon cl$ (Whelan DR. et coll., 2013).

Avec : A = absorbance, ϵ = coefficient d'extinction molaire (qui représente l'amplitude par laquelle un composé absorbe la lumière, c = concentration et l = longueur du trajet parcouru par la lumière.

Il est à noter que l'équation de Beer-Lambert n'est linéaire que pour les absorbances comprises entre 0,1 et 1,0. Ces absorbances se traduisent par des concentrations entre 10 et 3700 ng / μ l en utilisant l'appareil Nanodrop (Desjardins P. et coll., 2010). Les échantillons en dehors de cette gamme doivent être dilués pour produire des résultats plus précis de spectrophotométrie.

IV.10.2.1.1. Absorbance à 260 nm

Les acides nucléiques absorbent la lumière UV à 260 nm en raison de la présence des bases aromatiques dans leurs structures. Les deux types de bases constituants des acides nucléiques : les purines (thymine, cytosine et uracile) et les pyrimidines (adénine et guanine) ont leurs pics d'absorption à 260 nm (A260) permettant ainsi la quantification des échantillons d'acide nucléique (Desjardins P. et coll., 2010).

IV.10.2.1.2. Absorbance à 280 nm

Les protéines et les composés phénoliques possèdent une forte absorbance typiquement à 280 nm (A280), c'est pour cette raison que l'on mesure aussi l'absorbance des échantillons à cette longueur d'onde pour s'assurer de l'absence des contaminants protéiques et organiques (Warburg O. et coll., 1942) (Desjardins P. et coll., 2010).

Ce sont l'aromaticité des groupes phénoliques dans les composés organiques ainsi que les chaînes latérales d'acides aminés aromatiques (tryptophane, phénylalanine, tyrosine et histidine) dans les protéines qui sont les responsables de cette absorbance à 280 nm.

IV.10.2.1.3. Absorbance à 230 nm

Une mesure de l'absorbance de lumière à 230 nm (A230) est effectuée afin de s'assurer de l'absence des nombreux composés organiques utilisés pendant les procédures précédentes, possédant de fortes absorbances à environ 225 nm. En effet, le phénol, le TRIzol ou TRI Reagent (utilisés dans l'extraction des acides nucléiques), et les liaisons peptidiques dans les protéines absorbent la lumière entre 200 et 230 nm (Glasel JA. et coll., 1995) (Desjardins P. et coll., 2010).

IV.10.2.1.4. Le rapport A260 / A280

Le rapport A260 / A280 est généralement utilisé pour déterminer le taux de contamination protéique dans un échantillon d'acide nucléique. Pour que les ADN soient jugés comme purs, la valeur de ce rapport A260 / A280 doit être comprise entre 1,8 et 2 (Simbolo M. et coll., 2013) (Desjardins P. et coll., 2010). Si la valeur du rapport est supérieure à 2, ceci révèle que l'échantillon d'ADN est contaminé par de l'ARN. En revanche, si la valeur de ce rapport est inférieure à 1,8, ceci indique que l'échantillon est contaminé par des protéines, du phénol ou autres contaminants. La présence de contamination protéique peut avoir des effets indésirables sur les applications en aval qui utilisent les échantillons d'acide nucléique. Dans notre cas, la contamination protéique peut biaiser les résultats de la PCR en temps réel.

IV.10.2.1.5. Le rapport A260 / A230

Le rapport A260 / A230 indique la présence de contaminants organiques, tels que le phénol, le TRIzol (ou TRI Reagent), et autres composés aromatiques. Un échantillon d'ARN ou d'ADN est jugé comme étant pur si les valeurs du rapport A260 / A230 sont proches de 2,0 (entre 2,0 et 2,2) (Warburg O. et coll., 1942) (Glasel JA. et coll., 1995).

Les échantillons dont les valeurs de leur rapport 260/230 sont inférieures à 1,8 sont considérés comme contenant une quantité significative de ces contaminants, ce qui peut interférer avec les applications en aval. Ceci est particulièrement vrai pour la transcription inverse.

Il est à noter que les valeurs (allant de 1,8 à 2,2) du rapport de pureté d'ADN sont obtenues suite au calcul de la moyenne pondérée des valeurs des ratios (A260/A280) et (A260/A230) mesurés

sur les bases constituant l'ADN (thymine, cytosine, adénine et guanine) (Desjardins P. et coll., 2010) (Simbolo M. et coll., 2013).

IV.10.3. Transcription inverse (RT)

La transcription inverse correspond à l'«**inverse**» d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN : des enzymes ADN polymérase ARN-dépendantes utilisent un brin d'ARN comme matrice pour synthétiser le brin d'ADN complémentaire (ADNc).

Après le dosage de l'ARN par l'utilisation du NanoDrop, 500 ng d'ADNc sont produits à partir de l'ARN total de chaque échantillon. Seuls des échantillons d'ARN purs sont utilisés pour effectuer la transcription inverse, en utilisant le kit de synthèse d'ADNc de BioRad iScript (cat # 17088910, Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA). La transcription inverse est réalisée selon les étapes suivantes : étape 1 (amorçage) 25°C pendant 5 minutes ; étape 2 (transcription inverse) 46°C pendant 30 min ; étape 3 (inactivation de la RT) 95°C pendant 5 minutes ; et l'étape 4, stabilisation à 4°C (Techathuvanan C. et coll., 2011).

IV.10.4. PCR en temps réel

L'ADN obtenu au cours de l'étape précédente (de transcription inverse) est de l'ADNc, qui est en simple brin complémentaire et attaché à l'ARN isolé à partir des tissus étudiés. Le principe de la PCR en temps réel repose sur la l'opportunité de suivre la quantité d'ADN synthétisée à tout moment de la réaction et non pas à la fin de la PCR. Ceci se fait grâce à l'utilisation des sondes fluorescentes qui ne fluorescent que lorsqu'ils se fixent sur l'ADN double brin, synthétisé à partir de l'ADNc (simple brin). La synthèse de l'ADN double brin à partir de l'ADN simple brin nécessite la présence des amorces (petites séquences nucléotidiques) et d'une enzyme qui est la Taq polymérase. La technique et les détails des produits utilisés seront présentes dans ce qui suit.

Pour réaliser la PCR en temps réel, 50 ng d'ADNc de chaque échantillon (en triplicat) sont déposés au fond d'un puits (dans une plaque de 96 puits) dans lequel est ajouté un mélange composé du kit de BioRad iTaq Universal SYBR Green Supermix (cat # 172-5121; Bio-Rad

Laboratories, California, USA), avec les amorces sens et anti-sens spécifiques de chaque gène étudié. Il est à noter que l'amorce est une courte séquence nucléotidique utilisée pour la synthèse d'un brin complémentaire d'une séquence nucléotidique matrice. Une amorce est dite « sens » quand elle peut lire la séquence matrice dans son même sens ($5'-3'$), alors qu'une amorce « anti-sens » lit la séquence dans son sens contraire ($3'-5'$). La plaque est ensuite déposée dans un thermocycleur iCycler C1000 Thermal Cycler (BioRad, Richmond, CA, USA), selon les étapes suivantes: étape 1 : 95°C pendant 30 secondes, étape 2 : 95°C pendant 15 s, étape 3 : 60°C pendant 30 s. Ces étapes seront répétées 40 fois dans des cycles échauffement / amplification. L'ensemble de ces étapes réalisé selon le protocole du fabricant sera expliqué dans ce qui suit. Le kit BioRad iTaq Universal SYBR Green Supermix (cat # 172-5121; Bio-Rad Laboratories, California, USA) contient essentiellement, l'enzyme Taq polymérase. La Taq polymérase est une ADN polymérase thermostable isolée à partir d'une bactérie thermophile (*Thermus aquaticus*). La première étape de la q-PCR (PCR en temps réel) est une augmentation de température (95°C) pendant 30 secondes, ce qui permet la séparation des brins ARN et ADN et donc l'obtention d'un ADNc simple brin. Par la suite, cette haute température (95°C) est utilisée dans la deuxième étape pendant 15 secondes, permettant le déclenchement de l'activité de la Taq polymérase. Cette dernière catalyse la synthèse du second brin d'ADNc, durant la 3ème étape à 60°C et en présence des amorces (sens et anti-sens) des gènes cibles : le premier brin est utilisé comme matrice. De même, le SYBR Green, un autre composant essentiel du kit iTaq BioRad Supermix, s'associe durant cette étape à l'ADN double brin à fur et à mesure de sa formation.

Le SYBR Green est un colorant fluorescent possédant la spécificité de s'associer à l'ADN double brin, ce qui rend l'augmentation du signal fluorescent proportionnel au nombre des molécules d'ADN double brin générées, appelées amplicons. Un des deux brins de l'amplicon est complémentaire de l'ARN d'intérêt et l'autre possède la même séquence de cet ARN d'intérêt (à la substitution près de la base uracile, U, par la thymine, T).

Les gènes de référence ont été choisis parce que leur expression est stable lors de la variation des conditions environnementales comme, par exemple, lors de l'hypoxie intermittente (Bourdier G. et coll., 2016). Ainsi, nous avons choisi les 3 gènes de références suivants :

1. Béta-actine : *Actb*,
2. Cyclophiline A (=peptidylprolyl isomerase A): *Ppia*,
3. TATA box Binding Protein : *Tbp* (Tableau1).

	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
<i>Actb</i>	GGGTATGGAATCCTGTGGCATCC	GCTCAGGAGGAGCAAGATCTTGA
<i>Ppia</i>	CTGTTCCGCCTAGTCCTGTC	GTTTCTCAGGCTCCCTCTCC
<i>Tbp</i>	TATCTGCACTGCCAAAGACTGAGTG	CTTCTTGCTGGTCTTGCCATTCC

Tableau 1 : Amorces sens et anti-sens des gènes de références utilisés en PCR en temps réel.

Toutes les amorces des gènes utilisés - autres que les gènes de référence - ont été créées en utilisant le programme Primer-BLAST de NCBI (NCBI Primer-Blast., Rockville Pike, Bethesda MD, USA, 2017). Les trois gènes de référence ont été testés avant d'être utilisés pour nos expériences : dans quatre conditions d'exposition environnementale (en présence ou non de l'exposition à l'hypoxie intermittente et en présence ou non de l'entraînement physique intensif) sur les différents types de tissu utilisé (aorte thoracique, aorte abdominale, artères mésentériques, muscle squelettique) et ont tous confirmé un niveau d'expression constant quel que soit les conditions.

Les amorces pour les gènes étudiés se trouvent regroupées dans le tableau 2 ci-dessous :

1. Le récepteur sensible à la ryanodine – isoforme 1 (RyR1) : *Ryr1*,
2. Le récepteur sensible à la ryanodine – isoforme 2 (RyR2) : *Ryr2*,
3. Le récepteur sensible à la ryanodine – isoforme 3 (RyR3) : *Ryr3*,
4. Le membre 4 de la sous-famille V de canaux cationiques potentiels du récepteur transitoire (TRPV4) : *Trpv4*,
5. Le récepteur à 1, 4, 5 Inositol trisphosphate type1 (IP3R1) : *Itp1*,
6. La pompe du réticulum sarco/endoplasmique - Calcium ATPase type 1 (= SERCA I=ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 1) : *Atp2a1*,
7. La pompe du réticulum sarco/endoplasmique - Calcium ATPase type 2 (= SERCA I=ATPase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca²⁺ transporting 1) : *Atp2a2*,
8. La tropomyosine isoforme 1 : *Tpm1*,

9. La tropomyosine isoforme 2 : *Tpm2*,
10. La tropomyosine isoforme 3: *Tpm3*,
11. La tropomyosine isoforme 4 : *Tpm4*,
12. La troponine T1-slow : *Tnnt1*,
13. La troponine T3-Fast : *Tnnt3*,
14. La calmoduline isoforme 1 : *Calm1*,
15. La calmoduline isoforme 2 : *Calm2*,
16. La calmoduline isoforme 3 : *Calm3*.

	Forward 5'-3'	Reverse 3'-5'
<i>Ryr1</i>	GGGACTGTCATCAATCGCCA	GTGGTGTTCCTCAGTCTGTGT
<i>Ryr2</i>	TGAAGTCACAGGATCCCAACG	CAGTCTGGTTGGTTGGTACA
<i>Ryr3</i>	GCTGCCTTGACCTTGGAGTA	ACCACCCATCAGGAAGCGTA
<i>Trpv4</i>	TCCCAAGCAGGCCGAGAA	GAAGTGCCACTCTCGTCTCC
<i>Itpr1</i>	GGTCCTGATCCCTCAAACCG	TCCCAGCCAAGGATGCAAAT
<i>Atp2a1</i>	CCCGAGATGGGGAAGGTCTA	CGGATGTCTGCAGGGACTTT
<i>Atp2a2</i>	TTTGTGGCCCGAAACTACCT	GTCATGCAGAGGGCTGGAAG
<i>Tpm1</i>	AGCTCTCGGAAGGCAAATGT	TCAAAGAGGGCCTGCTGATG
<i>Tpm2</i>	CTGATAGCCTCAGAGGAGGAGT	GAAGGGTCTGGTCCAAGGTC
<i>Tpm3</i>	GGTGGCTCGTAAGTTGGTGA	TCCTCCTCCAGCTCAGAACA
<i>Tpm4</i>	GGCTGACCGGAAGTATGAGG	CAGCAAGGTGGAGACATGGT
<i>Tnnt1</i>	GCACTTTGAGCAGCGGAAAA	AGGTAGCCCCCAAATGAGC
<i>Tnnt3</i>	TCTTGCTGAAAGGCGCAAAC	GCCTTCTTGCTGAACTTGGC
<i>Calm1</i>	GCAATGGCTACATCAGTGCG	GCTCCGAGTCATGGTTCACA
<i>Calm2</i>	AGGACGGGGATGGGACAATA	GAGTACCGGACAGAACACCC

<i>Calm3</i>	ATGAGATCGCTGGGGCAAAA	ACGGAAGGCCTCTCGTATCT
--------------	----------------------	----------------------

Tableau 2 : amorces sens et anti-sens des gènes d'intérêt étudiés en PCR en temps réel.

Les résultats obtenus sont analysés par le logiciel du fabricant BioRad CFX96 Manager 3.0 (Biorad, Laboratories, Hercules, California, USA) qui mesure l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle de PCR. Pendant les premiers cycles, le niveau de fluorescence n'est pas détectable, du fait de la faible quantité d'ADN double brin synthétisé, mais la synthèse des amplicons augmente rapidement après un nombre déterminé de cycle (généralement entre 10 et 15 cycles selon le gène étudié). Le point d'inflexion de la courbe, qui passe d'un plateau initial nul à la phase d'augmentation exponentielle, est dénommé Ct (Cycle threshold). Ct est donc le cycle seuil représentant le moment de détection du signal fluorescent. La courbe PCR possède typiquement une phase exponentielle suivie d'une phase plateau où la synthèse d'amplicon s'arrête dû au nombre d'amorces limités ajoutés au début de l'expérience. Un programme de q-PCR comporte généralement 40 cycles : plus le Ct est élevé (30-35), moins la quantité de l'ARNm est présente dans l'échantillon de départ, car il implique plus de cycles de PCR pour que la fluorescence soit détectable. En revanche, si le Ct obtenu est de faible valeur (10 - 15), l'ARNm est considéré comme fortement présent dans l'échantillon de départ et le gène est considéré comme fortement exprimé du fait du peu de cycles pour détecter la fluorescence. Le principe de Q-PCR se fonde sur le fait que le nombre d'amplicons double à chaque cycle, donc le nombre de copies de gènes se calcule par une exponentielle à base de 2 en fonction de Ct. Dans notre cas, nous étudions par la Q-PCR, «l'expression relative», qui représente la variation dans l'expression d'un gène dans les échantillons des différents groupes expérimentaux.

Pour faire le calcul de cette expression relative des gènes, il nous faut tout d'abord un contrôle endogène. Le contrôle endogène peut être présenté par 1, 2 ou 3 gènes dont l'expression ne varie pas entre les échantillons testés dans les différentes conditions de l'étude, dans notre cas, nous avons choisi d'utiliser 3 gènes de références (Tableau 1). Après le contrôle endogène, nous choisissons le calibrateur ou le groupe contrôle qui est le groupe d'échantillons « non traité », (dans notre cas c'est le groupe N, qui n'est pas exposé à l'HI ni à l'EI) auquel tous les autres groupes (IH, NIT et IHIT) sont comparés.

Généralement, il existe deux méthodes pour calculer la variation d'expression des gènes par q-PCR, ces deux méthodes passent respectivement par les calculs de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ et $2^{-\Delta Ct}$ qui sont des exponentielles à base de deux (Cavé H. et coll., 2003). Ces calculs prennent en compte le fait que le nombre de copies de l'ARNm d'un gène double à la fin de chaque cycle. Les deux méthodes diffèrent par le fait que la méthode de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ nous donne le niveau d'expression relatif d'un gène cible étudié chez des groupes traités (dans notre cas IH, NIT, IHIT) par rapport au niveau de ce même gène chez le groupe non traité contrôle (dans notre cas N). L'inconvénient de cette méthode dans notre cas, est que la normalisation de tous les groupes par rapport au groupe contrôle (N), induit un niveau d'expression relatif de chaque gène dans ce dernier groupe égale à 1 : ceci nous empêche de comparer le niveau d'expression des gènes étudiés à l'intérieur de ce groupe.

Concernant la méthode de $2^{-\Delta Ct}$, ce mode de calcul nous donne le niveau d'expression relatif de plusieurs gènes cibles par rapport au niveau d'expression d'un ou de plusieurs gènes de références (Thellin O. et coll., 1999). Ce qui nous permette de comparer le niveau d'expression des différents gènes cibles dans les différents groupes sans prendre un groupe comme contrôle, et donc le niveau d'expression des gènes pourra être comparé dans et entre les différentes conditions de l'étude dans différents tissus.

Nous avons donc utilisé la deuxième méthode dans notre étude, qui nous calcule la quantification relative (QR) : $QR = 2^{-\Delta Ct}$

Avec : $\Delta Ct = Ct \text{ gène d'intérêt} - Ct \text{ gène de référence}$

IV.11. Technique de Western blot

Dans cette technique, nous avons étudié le niveau d'expression des protéines : RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans les trois tissus vasculaires.

IV.11.1. Extraction des protéines

Les protéines totales sont extraites à partir des différents tissus prélevés sur les rats et stockés dans l'azote liquide. Un tampon SLB (Saline Lysis Buffer) est préparé à partir de : 1% NP40 (tampon de lyse cellulaire), 20 mM Tris-HCL, 138 mM NaCl, 2,7 mM MgCl₂, 5% glycérol, pH 8

et conservé à -20°C. Le jour de l'extraction, la solution de SLB+ est préparée à partir de la solution basale SLB en ajoutant les composés suivant extemporanément : 5 mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM NaF, 1 mM DTT, Protease inhibitor Pi (inhibiteur de protéases). Un volume de 750 ul de la solution de SLB+ est ajouté dans les tubes spécifiques pour l'appareil Precellys (Bertin Technology, Montigny le Bretonneux, France) qui est un équipement conçu pour lyser et homogénéiser à des vitesses variables des échantillons biologiques contenus dans des tubes, en vue d'une extraction de protéines, d'acides nucléiques, ou d'autres molécules. Les tubes contiennent des billes de céramique qui permettent le broyage des tissus suite à une rotation rapide dans l'appareil Precellys.

Les différents échantillons de tissu de l'aorte thoracique, abdominale et des artères mésentériques sont pesés, découpés avec des ciseaux stériles pour faciliter leur broyage, puis déposés dans ces tubes contenant la solution de SLB+. Les tubes contenant le mélange (tissu + solution SLB + billes) sont ensuite déposés dans l'appareil Precellys et subissent une lyse selon le protocole suivant : 3 x10 s de rotation à 2800xg avec 5 secondes d'intervalle entre les cycles de rotation. Le surnageant est ensuite récupéré dans des tubes Eppendorf pour subir une centrifugation à 112000xg à 4°C pendant 10 min. Le surnageant, qui contient l'extrait protéique, est récupéré et stocké dans des cryotubes à -80°C.

IV.11.2. Dosage protéique

Le dosage des protéines est réalisé par la méthode de Bradford en utilisant le réactif "Bradford reagent" (cat #B6916, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Cette méthode est fondée sur un dosage colorimétrique d'absorbance à 595 nm. La mesure de l'absorbance à cette longueur d'onde vient du fait que le bleu de Coomassie, le constituant principal du réactif Bradford sous sa forme cationique libre, absorbe la lumière à une longueur d'onde de 465 nm, alors qu'après sa complexation (liaison) à des acides aminées aromatiques (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) et les résidus hydrophobes des acides aminées (isoleucine, valine, et alanine) présents dans les protéines, il prend sa forme anionique qui absorbe la lumière à 595 nm tout en changeant sa couleur en rouge. Le changement d'absorbance (densité optique : D.O.), proportionnel à la quantité du colorant lié aux protéines, nous indique la concentration en protéines dans l'échantillon mesuré. Cette correspondance entre la valeur de D.O. à 595 nm et la

concentration en protéines de l'échantillon est donnée grâce à l'établissement d'une gamme d'étalonnage. Cette dernière est une gamme de SAB (Sérum Albumine Bovine), et est préparée en allant de 0 µg/ml à 2000 µg/ml à partir d'une solution mère à 20 mg/ml. La gamme de calibration est réalisée en faisant réagir le réactif de coloration avec ces solutions de protéines de concentrations bien connues et croissantes. Les différents échantillons sont dilués au 1/20^{ème} pour les aortes thoracique et abdominale et les artères mésentériques, dans de l'eau déionisé. 5 µl des échantillons de protéines extraites dilués et des échantillons de SAB sont alors déposés sur une plaque 96 puits, puis 250 µl du réactif de Bradford sont ajoutés dans chaque puits. La plaque est ensuite incubée pendant 5 min à l'obscurité à température ambiante. La densité optique est ensuite mesurée à 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. La variation de la D.O. en fonction de la concentration de protéines est linéaire tant que la réaction n'est pas saturée, c'est à dire tant qu'il n'y a pas excès de réactif par rapport à la quantité de protéines présentes. Cette variation permet donc de tracer une droite selon la fonction suivante : D.O. = f (concentrations de protéines) grâce à la gamme de SAB à des concentrations croissantes. L'équation de cette droite nous permet de déduire la concentration de protéines présentes dans un échantillon inconnu à partir de la D.O. mesurée.

IV.11.3. Migration sur gel de polyacrylamide et détection des protéines

Nos échantillons sont préparés de façon à obtenir 50 µg de protéines pour chaque tube eppendorf, puis sont repris dans du tampon Laemmli, puis dénaturés pendant 10 min à 70°C. Il est à noter que le tampon Laemmli (5X), est un tampon utilisé pour dénaturer les protéines afin de les préparer pour l'électrophorèse sur gel polyacrylamide. Cette dernière est une méthode analytique en biochimie classiquement utilisée pour séparer des molécules chargées (telles que les protéines) d'un mélange, en se fondant sur leurs masses moléculaires dans un champ électrique. Les échantillons ainsi préparés sont ensuite chargés sur deux gels d'affilée : le premier gel est appelé le gel de concentration avec une composition de polyacrylamide à 5 %. Ce gel a pour fonction de concentrer le dépôt de l'échantillon protéique fait dans le puits en une fine bande de protéines, ceci va permettre de déposer un volume relativement important sans perdre la résolution. La migration des protéines sur le premier gel est effectuée à 80 V durant 20

minutes. Les protéines atteignent ensuite le deuxième gel appelé gel de séparation, qui a une composition de 8% en polyacrylamide. Au niveau de ce gel, les protéines sont séparées en fonction de leurs poids moléculaire par une migration à 120 V durant 50-60 minutes. Sur les deux gels, la migration est réalisée dans le même tampon de migration tris-glycine-SDS (Biorad, cat #1610772EDU, Marnes-la Coquette, France). Après la migration, une membrane de polyfluorure de vinyldène (PVDF) sera perméabilisée pendant 1 minute dans de l'éthanol afin de la préparer pour le transfert des protéines. Le gel contenant les protéines, aussi bien que la membrane PVDF sont déposés, de façon superposée, dans une cassette du système de transfert de Biorad (Trans-Blot Turbo Transfer System, Mini PVDF, cat # 17001917, Biorad, Marnes-la Coquette, France), où le transfert des protéines du gel vers la membrane PVDF est réalisé à 25 V, 1.0 A, pendant 10 min. Une fois les protéines transférées, les membranes sont ensuite bloquées dans du TBS (Tris Buffered Saline) supplémenté avec 0,1% de Tween et de 5% de SAB (A8531-Bovine Serum Albumin, Sigma-Aldrich, St. Quentin Fallavier Cedex, France) pendant 1 heure sous agitation circulaire (65 rpm) à température ambiante pour les protéines d'intérêt (TRPV4, RyR1, RyR2 et RyR3) et dans du TBS supplémenté avec 0,1% de Tween et 5% de lait écrémé (pour éviter le bruit du fond lors de la révélation) pour la bêta-actine, selon le protocole du fabricant. Cette étape permet d'éviter la formation de liaisons non-spécifiques avec les anticorps sur la membrane. La membrane est ensuite incubée une nuit à 4°C avec un anticorps primaire -dirigé contre les protéines d'intérêt- à sa dilution optimale dans le tampon de blocage (tableau 3).

Anticorps anti- :	Référence	Dilution	Tampon	Source
RyR1	ARR-002 Alomone labs, Berlin, Germany.	1/200	TBS Tween 0.1%, SAB 1%	Lapin
RyR2	ARR-001 Alomone labs, Berlin, Germany.	1/200	TBS Tween 0.1%, SAB 1%	Lapin
RyR3	Gift from Dr V. Sorrentino: Molecular medicine section, department of	1/3000	TBS Tween 0.1%, SAB1%	Lapin

	Neuroscience, University of Siena, Italy. Ref: (Sorrentino V. et coll., 2003).			
TRPV4	ACC-034 Alomone labs, Berlin, Germany.	1/200	TBS Tween 0.1%, SAB1%	Lapin
Béta-actine	SC47778- Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany	1/5000	TBS Tween 0.1%, lait 5%	Souris

Tableau 3 : Liste des anticorps primaires utilisés en Western Blot, leurs références, leurs dilutions, les tampons de dilution et l'espèce qui a servi pour leur fabrication.

Après une nuit d'incubation, les membranes sont lavées 3 fois dans du TBS Tween 0,1% pendant 10 min puis incubées pendant 1 heure à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire correspondant (tableau 4) couplé à la peroxydase et dilué dans le tampon de blocage.

Nom	Dilution	Tampon de préparation	AC primaire Cible
Chèvre anti-lapin	1/2000	TBS Tween 0.1%, SAB 1%	RyR 1, 2,3 ; TRPV4
Chèvre anti-souris	1/5000	TBS Tween 0.1%, Lait 5%	béta-actine

Tableau 4 : Liste des anticorps secondaires utilisés en Western Blot, leurs dilutions et les tampons dans lesquels ils sont dilués.

Les membranes sont ensuite lavées 3 fois pendant 10 min dans du TBS-Tween 0.1%. Le complexe d'anticorps est révélé par chimioluminescence avec un kit de détection Clarity™ Western ECL Substrate (Cat.170-5060, Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France). L'imageur Chemidoc XRS (Chemidoc-xrs-system, Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) permet ensuite l'acquisition des images du signal de chimioluminescence par caméra à transfert de charge (CCD) avec une exposition optimale des membranes. La quantité relative des protéines est ensuite mesurée par densimétrie et l'exploitation numérique est réalisée avec le logiciel ? Image Lab (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France) et exprimée par rapport au contrôle qui est la quantité de béta-actine (gène de référence).

IV.12. Étude du remodelage vasculaire par analyses histologiques

IV.12.1. Montage sur lames

Les différentes artères prélevées (artères thoracique, abdominale, préciser exactement quels segments carotide et pulmonaire) dans les 4 groupes de rats N, IH, NIT et IHIT ont été fixées dans du paraformaldéhyde (4%) pendant 24 h à température ambiante, permettant une conservation du matériel et une immobilisation des constituants tissulaires. Par la suite, les différentes artères sont placées dans du gel Optimal cutting temperature compound (OCT) dans de petits supports en plastiques. Ces derniers sont ensuite placés sur carboglace pendant 30 minutes. Cette étape permet d'obtenir des blocs d'OCT solidifiés contenant les échantillons permettant la réalisation des coupes histologiques (coupes transversales des artères). Les blocs sont montés sur une pastille métallique avec de l'OCT et sont placés dans le cryostat contenant un microtome, avec lequel sont réalisés des coupes de 8 µm d'épaisseur. Ces dernières sont ensuite montées sur lames de verre et conservées à -20°C.

IV.12.2. Coloration hématoxyline / éosine

Afin de visualiser l'épaisseur intima-média, les lames sont d'abord décongelées à température ambiante pendant 30 min puis passées sous l'eau du robinet. Les lames sont incubées pendant 20 min dans une solution d'hématoxyline de Mayer (composée de : sulfate d'aluminium et de potassium (4,5 g/L), iodate de sodium (0,2 g/L), acide acétique glacial (1 g/L), hématoxyline (5 g/L) et de l'eau distillé) qui va colorer les noyaux cellulaires en bleu, puis elles sont rincées à l'eau distillée. Par la suite, les lames sont incubées à nouveau pendant 3 secondes dans une solution d'éosine (10 g/ L), ce qui colore les cytoplasmes des cellules en rose, avant d'être rincées à l'eau jusqu'à l'élimination du colorant non-absorbé par les cellules.

IV.12.3. Déshydratation et montage

Pour conserver les préparations et les colorations sur de longues durées, les lames subissent une étape de déshydratation dans différents bains successifs : 1 bain d'alcool à 70% pendant une minute suivi de 3 bains d'alcool à 100% d'une minute, et enfin 3 bains de toluène d'une durée de 2 minutes. Des lamelles sont ensuite montées sur les lames portant les préparations colorées à l'aide de DePex qui est une résine synthétique miscible avec le xylène et le toluène (Serva Electrophoresis DePex, cat # 1824301, Fischer Scientific, Illkirch Cedex, France).

IV.12.4. Observation au Microscope

24 h après le montage, les lames sont visualisées sur microscope Eclipse 80i (Nikon Instruments, Champigny-sur-Marne, France) et des images sont réalisées au grossissement X10 par une caméra digitale DS-5M (Nikon camera, Champigny-sur-Marne, France). Un total de 5 coupes est étudié pour chaque individu. Pour chaque coupe transversale d'artère, entre 8 et 10 images ont été réalisées sur des parties différentes du vaisseau. Chaque image est analysée en mesurant l'épaisseur intima-média à l'aide du logiciel NIS-Element (Nikon Metrology, Lisses, France). Les données sont rassemblées sur un fichier où les moyennes de l'épaisseur intima-media ont été calculées à partir des données récoltées dans les 4 groupes de rats : normoxiques et hypoxiques avec ou sans entraînement physique.

IV.13. Activité enzymatique de la Citrate synthase

IV.13.1. Principe

Nous nous sommes intéressés à la mesure de l'activité enzymatique de la citrate synthase (CS), parce qu'elle est classiquement utilisée comme indicateur du métabolisme cellulaire aérobie (Larsen S. et coll., 2012). Ceci nous permet d'évaluer si les rats ont bien réagi à l'entraînement physique intensif qu'ils ont subi. L'enzyme citrate synthase, située au niveau de la matrice mitochondriale, se présente comme une enzyme limitant la vitesse de la première étape du cycle

de l'acide citrique (ou cycle de Krebs). La citrate synthase catalyse la réaction de condensation entre le résidu acétate de l'acétyl coenzyme A (acétyl-CoA) et l'oxaloacétate pour former du citrate :



L'oxaloacétate sera ensuite régénéré après l'achèvement d'un cycle de Krebs. L'activité enzymatique est utilisée pour évaluer la capacité oxydative de la mitochondrie ainsi que l'intégrité et la quantité des mitochondries dans un tissu donné. La capacité de réaction de la citrate synthase peut être suivie par la formation du groupe (-SH) libéré du (CoA-SH). Pour suivre la formation du groupe (-SH), on utilise le réactif d'Ellman (5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoïque], DTNB), auquel (-SH) interagit pour former du TNB qui absorbe la lumière spécifiquement à 412 nm :



Donc, l'activité de CS est calculée en fonction de la quantité de TNB formée à la fin de cette réaction.

IV.13.2. Protocole

IV.13.2.1. Préparation du mélange de dosage

Nous avons choisi le muscle squelettique gastrocnémien pour évaluer l'activité CS, parce qu'il fait partie des muscles directement sollicités lors de la course des rats sur le tapis roulant. Pour ce faire, nous avons suivi le protocole suivant : une quantité de 5 mg du muscle (gastrocnémien) est prélevée et nettoyée de tout excédent (e.g. tissu conjonctif). Les 5 mg du muscle sont ensuite placés dans un micro-Potter, sur lesquels 100 μL de tampon d'extraction (contenant : HEPES 5 mM, EGTA 1 mM, 0,10% (vol/vol) Triton X-100 dans de l'eau milli-Q) sont ajoutés. Le muscle est ensuite broyé et incubé pendant 60 minutes sur de la glace. Du DTT (1 mM) est aussi ajouté extemporanément (pH = 8,7 à 30°C). L'homogénat ainsi obtenu sera congelé à -80°C.

IV.13.2.2. Dosage

Pour réaliser le dosage du mélange obtenu à la fin de l'étape précédente, nous avons utilisé à chaque série de dosage 1 ml du tampon d'extraction comme contrôle négatif, pour s'assurer de la stabilité de la mesure au cours de l'expérimentation. Ensuite, nous avons préparé une cuve de spectrophotomètre (1,5 ml), dans laquelle nous avons mis : 940 μ L de tampon de mesure (contenant 840 μ L d'eau milli-Q et 100 μ L du réactif d'Ellman à 10 mM dans du Tris-HCl à 1 M), 30 μ L d'acétyl CoA à 10 mM et 10 μ L de l'échantillon dilué (100 g protéines solubles / ml du dosage total).

Une première mesure avec la cuve contrôle (contenant le tampon de mesure), est réalisée dans un spectrophotomètre à 412 nm. La densité optique (DO) est suivie durant 3 minutes à 30°C. Cette mesure nous permet d'obtenir l'état initial de la réaction (pente 1 de la Fig. 39) qui correspond à l'activité non-spécifique de la CS. 50 μ L d'oxaloacétate à 10 mM sont ensuite ajoutés, ce qui déclenche la réaction avec l'apparition du groupe (-SH), qui sera suivie pendant 3 min. L'évolution de l'absorbance à 412 nm permet de déterminer la pente 2 (Fig. 39) qui correspond à l'activité totale de la CS.

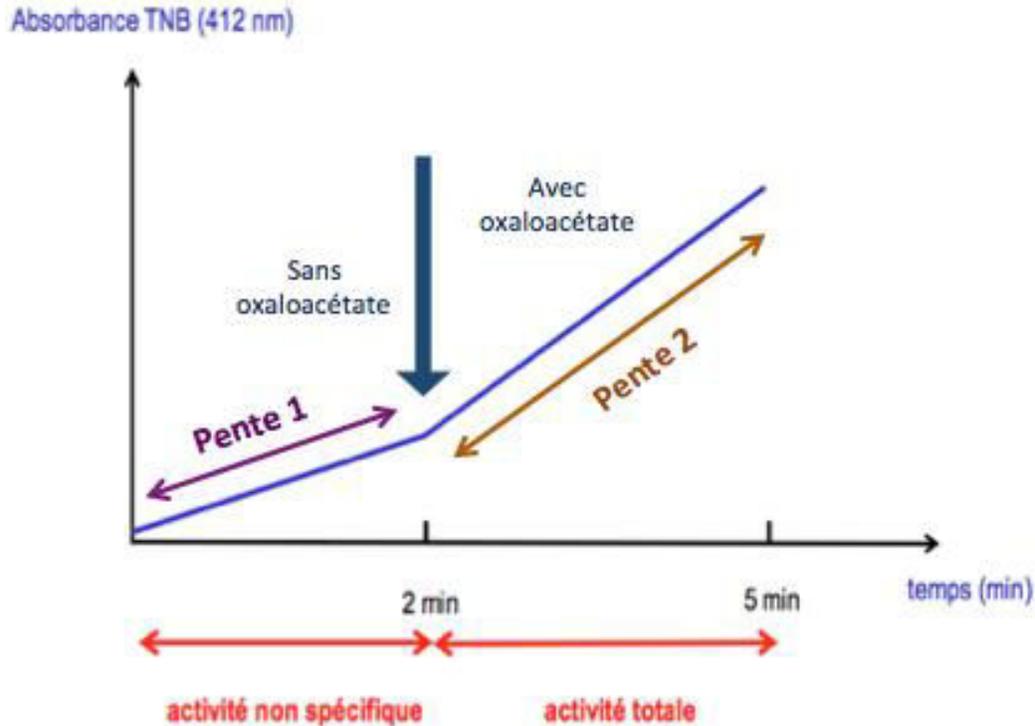


Figure 39 : Figure montrant les phases de mesure de l'activité enzymatique de la citrate synthase avant et après l'ajout de l'oxaloacétate. L'activité CS est représentée par l'absorbance de TNB (à 412 nm) en fonction du temps (en minutes). L'activité spécifique de la CS = activité totale – activité non spécifique.

IV.13.2.3. Calcul

L'activité enzymatique spécifique de la CS correspond à la différence de l'activité totale et l'activité non-spécifique de la CS. Elle sera calculée selon la loi de Beer-Lambert :

$$CS \text{ (UI.g}^{-1}\text{)} = (\text{pente2} - \text{pente1}) \cdot 10^6 / [\epsilon \times A \times B \times C]$$

CS = activité enzymatique spécifique de la citrate synthase

$\epsilon = 13600 \text{ L/mol}^{-1}$

A = facteur de dilution de l'extrait dosé

B = facteur de dilution lors du dosage

C = Concentration massique de l'échantillon = $5 \mu\text{g}/100 \mu\text{L}$

L'activité enzymatique, exprimée en unité internationale (UI), correspond à la quantité d'enzyme nécessaire à la transformation d'une micromole de substrat par min. Cette valeur est rapportée au poids de muscle frais (UI.g^{-1} du poids frais).

IV.13. Analyses statistiques

Les données sont exprimées sous forme de moyenne \pm erreur standard (SEM), les graphiques et tests statistiques sont réalisés en utilisant Prism Software Version 6.0 (GraphPad Software's company, La Jolla, CA 92037 USA) ou R (logiciel libre, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria). Les résultats sont analysés avec les tests ANOVA associés à des tests post-hoc (Tukey). Les différences sont considérées comme statistiquement significatives lorsque $p \leq 0,05$. Un effet significatif global de l'HI est un effet de l'HI sur les rats sédentaires et les rats qui ont subi l'entraînement physique intensif pris ensemble. De même, un effet global de l'EI désigne un effet de l'EI sur les rats en normoxie et les rats soumis à l'hypoxie intermittente pris ensemble.

V. Résultats

V.1. Les paramètres physiologiques

Nous avons débuté notre étude par la mesure des paramètres physiologiques des rats des 4 groupes tests (N, IH, NIT et IHIT) : le poids, la pression artérielle, la fréquence cardiaque, l'hématocrite, et l'activité enzymatique de la citrate synthase.

V.1.1. Poids

Nous avons mesuré quotidiennement les poids des rats dès leur premier jour d'exposition à l'HI, (le poids moyen des rats au début est de 324 g), jusqu'au jour du sacrifice pour vérifier qu'ils réagissent normalement à l'HI par une perte de poids en début de traitement. En effet, les études réalisées précédemment montrent que la perte de poids représente la réponse primaire de l'organisme à l'hypoxie continue chez l'Homme (Hoppeler H. et coll., 1990) (Urdampilleta A. et coll., 2012) (Hobbins L. et coll., 2017), ainsi que dans les modèles animaux (Bigard X. et coll 2000) (Daneshrad Z. et coll., 2000). Une étude réalisée par Martinez et ses collaborateurs, a aussi montré que l'exposition des rats à l'hypoxie intermittente (HI) induit une perte de poids d'environ 3,9 % du poids initial durant les 5 premiers jours d'exposition à l'HI (Martinez D. et coll., 2008).

Nos résultats révèlent que le poids des rats varie au cours du temps du jour 0 au jour 21 et que cette variation est dépendante de l'HI et de l'EI (Fig. 40). En effet, le test ANOVA 3 facteurs (HI, EI et jour) montre que l'HI ($p < 0.0001$) et l'EI ($p < 0.0001$) font baisser globalement le pourcentage de variation du poids chez les rats en fonction du temps ($p < 0.0001$). De plus, le test ANOVA 3 facteurs, révèle des effets croisés entre ces facteurs : interactions significatives HI x EI : $p < 0.0001$, HI x jour : $p < 0.0001$, EI x jour : $p < 0.0001$. Pour mieux savoir l'effet de chaque facteur, nous avons réalisé des tests post hoc LSD-Fisher : HI x EI, HI x jour et EI x jour. Le premier test post hoc (HI x EI), montre que l'HI fait baisser le pourcentage de prise de poids chez les rats normoxiques et chez les rats soumis à l'HI. De même, l'EI fait aussi baisser ce pourcentage chez les rats sédentaires et soumis à l'EI (Fig. 40).

Le deuxième test post hoc (HI x jour), montre que le poids des rats normoxiques est différent du poids des rats soumis à l'HI tous les jours sauf le jour 0. En comparant les rats normoxiques entre eux au cours du temps, on trouve que le poids des rats normoxiques n'est pas différent du poids de ces rats au jour 0, le jour 1 ($p = 0,587$), le jour 2 ($p = 0.113$) et le jour 3 ($p = 0.118$). Puis une prise du poids des rats normoxiques est enregistrée à partir du jour 4 d'exposition à l'HI jusqu'au jour 21 : jour 4 ($p = 0.0012$), jour 5 → jour 21 ($p < 0.0001$) par rapport à leur poids au jour 0 (Fig. 40).

Quant aux rats soumis à l'HI, le test révèle que leur poids subit une baisse les jours : 1 ($p = 0.036$), 2 ($p = 0.005$), 3 ($p = 0.017$), 4 ($p = 0.053$) par rapport à leur poids enregistré le le jour 0. Ensuite, le jour 5 ($p = 0.339$), 6 ($p = 0.888$), 7 ($p = 0.324$), 8 ($p = 0.806$), 9 ($p = 0.863$), 10 ($p = 0.759$), et le jour 11 ($p = 0.172$), le poids des rats en HI redevient non différent de leur poids au jour 0. Puis à partir du jour 12 ($p = 0.011$) jusqu'au jour 21 ($p < 0.0001$) les rats soumis à l'HI recommencent la prise de poids par rapport à leur poids au jour 0 avec ($p = 0.0005$) au jour 13, ($p = 0.0002$) aux jours 14 et 16, ($p < 0.0001$) aux jours 15, 17, 18, 19 et 20.

Le troisième test post hoc LSD-Fisher réalisé est : EI x jour, les résultats de ce test révèle que le poids des rats soumis à l'EI n'est pas différent par rapport au poids des rats sédentaires au cours des jours : 1 ($p = 0.679$), 2 ($p = 0.532$), 3 ($p = 0.704$), 4 ($p = 0.968$), 7 ($p = 0.105$). Puis le poids des rats soumis à EI est presque différent de celui des rats sédentaires le jour 5 ($p = 0.062$) et le jour 9 ($p = 0.068$). Au cours du jour 6 ($p = 0.034$), jour 8 ($p = 0.012$), jour 10 ($p = 0.009$), jour 11 ($p = 0.013$) aussi bien que du jour 12 jusqu'à 21 ($p < 0.0001$) le poids des rats soumis à l'EI est inférieur à celui enregistré chez les rats sédentaires (Fig. 40).

De plus, ce test révèle que pour les rats sédentaires, durant les 4 premiers jours de leur exposition à l'HI (jour 1 : $p = 0.339$, jour 2 : $p = 0.543$, jour 3 : $p = 0.568$, jour 4 : $p = 0.962$), leur poids est non différent de leur poids enregistré au jour 0. Puis au jour 5 d'exposition à l'HI ($p = 0.009$), jour 6, 7 ($p = 0.001$) et du jour 8 jusqu'au jour 21 ($p < 0.0001$) le poids des rats sédentaires voient une augmentation par rapport à leur poids initial au jour 0.

Quant aux rats soumis à EI, leur poids ne voit pas de changement les jours : 1 ($p = 0.560$), 2 ($p = 0.938$), 3 ($p = 0.919$), 4 ($p = 0.921$), 5 ($p = 0.310$), 6 ($p = 0.140$), et 10 ($p = 0.103$) par rapport à leur poids au jour 0. En revanche, au cours des jours : 7 ($p = 0.050$), 8 ($p = 0.037$), 9 ($p = 0.0005$) le poids de ces rats subit une élévation par rapport à leur poids enregistré au jour 0. Puis à partir

du jour 11 ($p = 0.034$) et du jour 12 jusqu'au jour 21 ($p < 0.0001$) le poids des rats soumis à EI est supérieur à leur poids enregistré au jour 0 (Fig. 40).

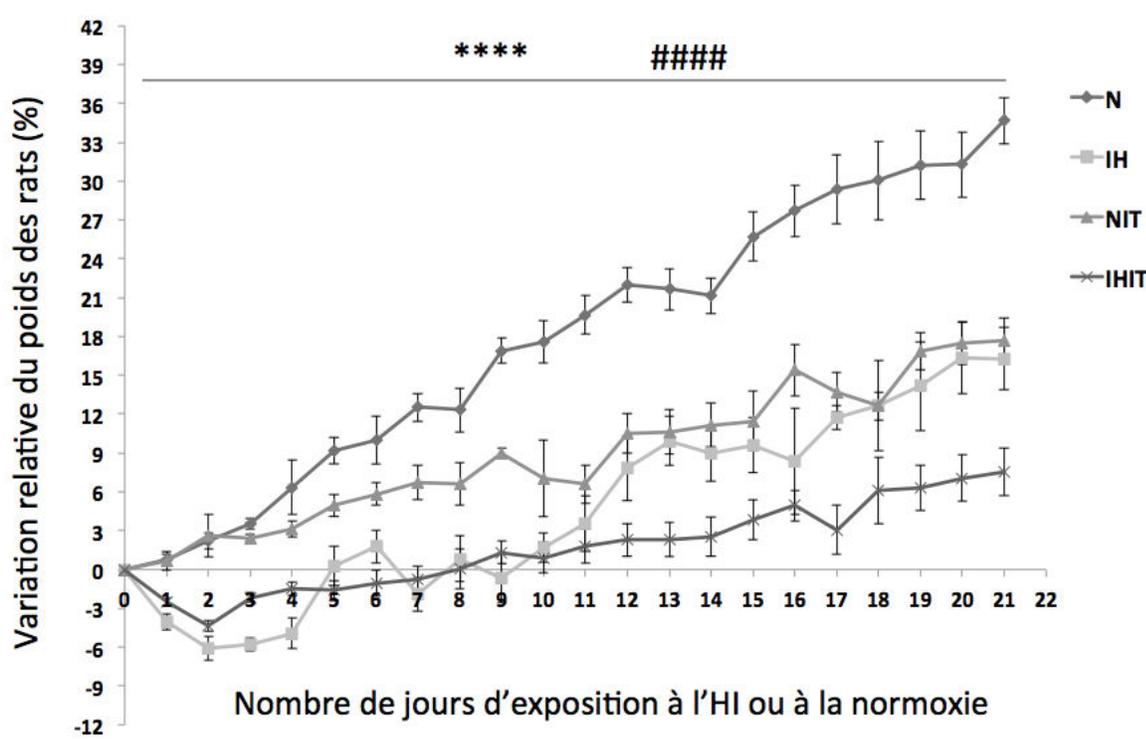


Figure 40 : Variation relative du poids des rats durant les 21 jours d'exposition à l'hypoxie intermittente, pour les 4 groupes (N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif). Les variations du poids sont calculées en % de variation de masse par rapport à la masse initiale au jour 0 de l'exposition à l'HI ou la normoxie.

Interprétation- hypothèse :

Comme les résultats ci-dessus le montre, l'HI induit une perte du poids des rats au cours des 4-5 premiers jours d'exposition, et l'EI réduit la prise du poids de ces rats tout au long de la durée d'exposition. Ceci révèle, que les rats ont bien répondu à l'HI et à l'EI. Quels seront donc leurs effets sur les autres paramètres physiologiques ? Pour répondre à cette question, nous avons mesuré la pression artérielle, la fréquence cardiaque et l'hématocrite des rats soumis ou non à l'HI et à l'EI.

V.1.2. Pression artérielle

En ce qui concerne la pression artérielle, le traitement de 21 jours en HI induit globalement une élévation significative de la pression artérielle, indépendante du niveau d'exercice physique (ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées). Ceci est vrai aussi bien pour les pressions artérielles systolique ($p = 0,0007$) (Fig. 41 B), moyenne ($p < 0,0001$) (Fig. 41 A), que diastolique ($p < 0,0001$) (Fig. 41 C). L'exercice physique induit, quant à lui, une diminution globale des pressions artérielles systolique ($p = 0,0001$) (Fig. 41 B) et moyenne ($p = 0,0297$) (Fig. 41 A), mais pas diastolique ($p = 0,5555$) (Fig. 41 C), indépendamment du traitement HI/N. Curieusement, il est aussi à noter que l'exercice physique tend à accroître l'élévation de la pression systolique induite par l'HI, en limite de significativité (interaction HI xEI : $p = 0,0565$).

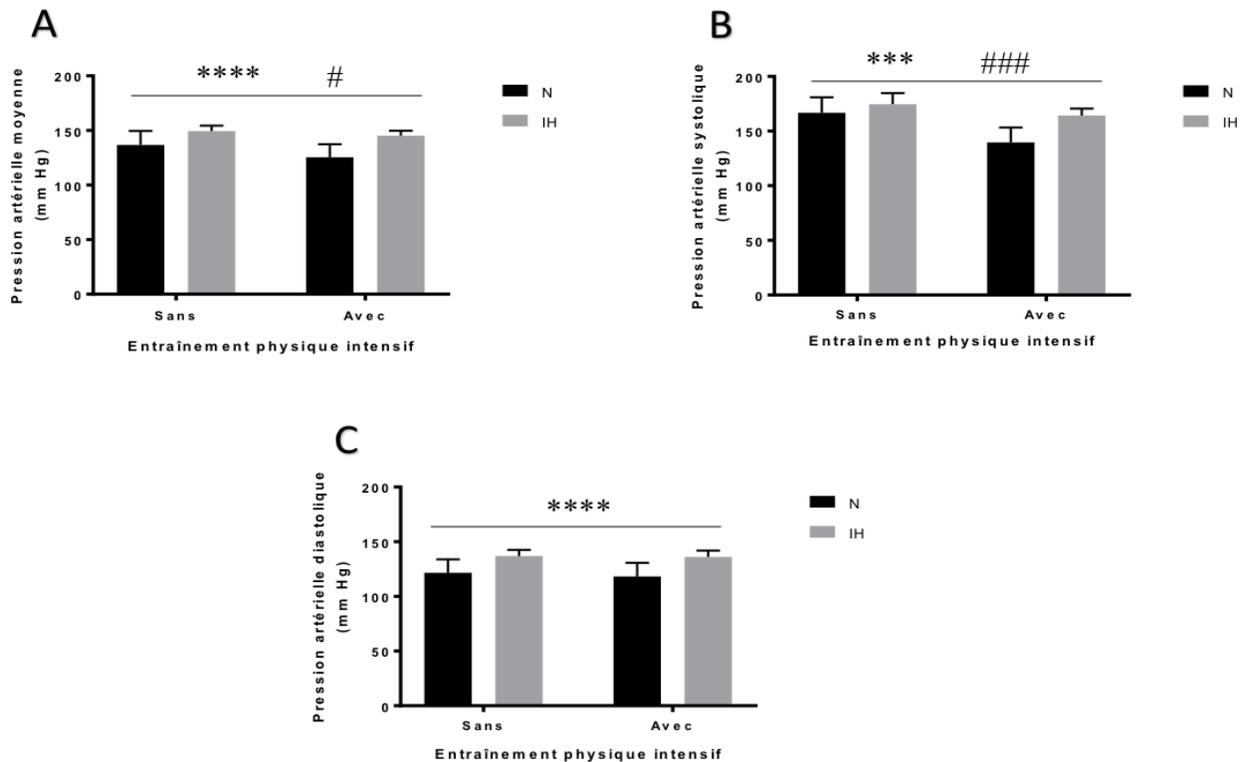


Figure 41 : Les pressions artérielles des 4 groupes étudiés de rats (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente en présence ou non de l'entraînement physique intensif). A, B et C présentent respectivement les pressions sanguines moyennes, systoliques et diastoliques. Tous les résultats sont exprimés en mm Hg. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur les graphiques comme **** pour $p \leq 0,0001$ et comme *** pour $p \leq 0,001$. L'effet significatif global de l'entraînement intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté sur les graphiques par # pour $p \leq 0,05$ et par ### pour $p \leq 0,001$.

Interprétation- hypothèse :

L'augmentation de la pression artérielle systolique, diastolique et moyenne des rats suite à leur exposition à l'HI présentée dans les résultats ci-dessus, peut être médiée par des mécanismes multiples. Parmi ces mécanismes, l'HI peut induire des changements de l'activation sympathique, un remodelage vasculaire suite à une augmentation de l'épaisseur intima-média des vaisseaux ou des modifications de la contractilité des muscles lisses constituant ces vaisseaux. Nous avons testé ces hypothèses dans la suite de notre travail. D'autre part, l'EI limite l'effet de l'HI et la pression artérielle systolique, diastolique et moyenne, probablement en affectant les mêmes mécanismes altérés par l'HI.

V.1.3. Fréquence cardiaque

Quant à la fréquence cardiaque (FC), les résultats montrent que l'HI induit globalement son élévation (ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées) ($p < 0,0001$) indépendamment du niveau d'exercice (interaction non-significative : $p = 0,39$) (Fig. 42).

D'autre part, deux semaines d'EI font diminuer globalement la FC des rats ($p = 0,0038$) en présence et en absence de l'exposition à l'HI (Fig. 42).

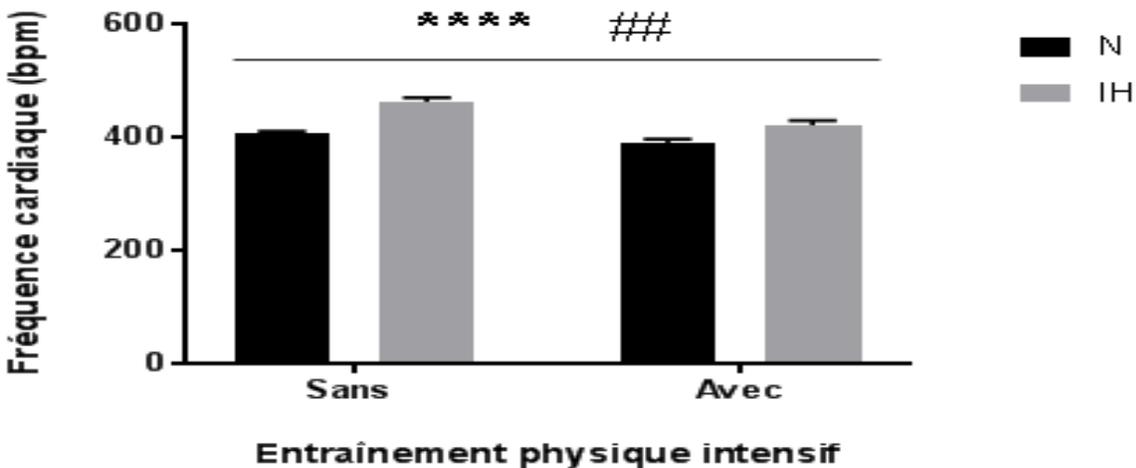


Figure 42 : Fréquence cardiaque des 4 groupes de rats étudiés (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente en présence ou non de l'entraînement physique intensif). Les résultats sont exprimés en nombre de battements par minute (bpm). Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur les graphiques comme **** pour $p \leq 0,0001$ et un effet significatif global de l'entraînement intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté sur les graphiques par ## pour $p \leq 0,01$.

Interprétation- hypothèse :

L'augmentation de la fréquence cardiaque des rats, observée ci-dessus suite à l'exposition à l'HI, peut être un phénomène de compensation par lequel l'organisme s'oppose à la diminution de l'oxygène en augmentant le rythme respiratoire et la fréquence des battements cardiaques. Quant à l'EI, il s'oppose à cette augmentation de la fréquence cardiaque en améliorant la capacité respiratoire des rats après les sessions d'exercice intensif. Un autre mécanisme de compensation du manque d'oxygène dans l'organisme peut probablement se mettre en place, est l'augmentation du taux d'hématocrite. Pour cela nous avons testé si l'HI et l'EI vont induire une variation du taux de l'hématocrite des rats.

V.1.4. Hématocrite

Le paramètre physiologique suivant mesuré est l'hématocrite. Les résultats révèlent que 21 jours d'exposition à l'HI induisent globalement une augmentation significative de l'hématocrite (ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées) ($p < 0,0001$), d'une façon indépendante du niveau d'exercice (interaction non-significative : $p = 0,736$) (Fig. 43).

Quant à l'EI, ce dernier n'affecte pas l'hématocrite des rats, en présence ou en absence d'HI ($p = 0,2021$) (Fig. 43).

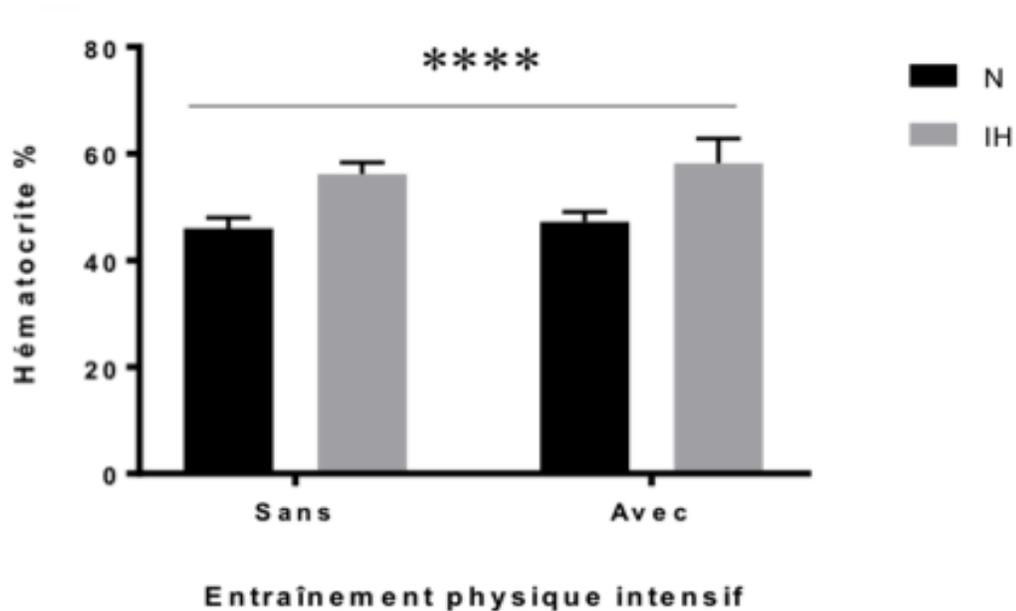


Figure 43 : Hématocrite des 4 groupes de rats étudiés (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l’hypoxie intermittente soumis à l’hypoxie intermittente en présence ou non de l’entraînement physique intensif). Les résultats représentent la mesure de l’hématocrite exprimée en pourcentage de volume des globules rouges dans un échantillon de sang donné. Un effet significatif global de l’hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur les graphiques comme **** pour $p \leq 0,0001$ et un effet significatif global de l’entraînement intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté sur les graphiques par ## pour $p \leq 0,01$.

Interpretation- hypothèse :

Les résultats de la mesure du taux d’hématocrite ci-dessus, valident notre hypothèse quant à la réponse compensatoire de l’organisme vis-à-vis la diminution du taux d’oxygène suite à 21 jours d’exposition à l’HI. Quant à l’EI, il n’a pas impacté le taux d’hématocrite, ceci pouvant être associé à la durée de l’entraînement physique intensif suivi. Ainsi, pour vérifier que les rats ont bien répondu au protocole de l’EI suivi dans notre travail, nous avons réalisé dans ce qui suit, une mesure de l’activité enzymatique de la citrate synthase.

V.1.5. Activité enzymatique de la Citrate Synthase

Le dernier paramètre physiologique étudié est l'activité enzymatique de la citrate synthase (CS). L'activité de la CS est classiquement utilisée comme un indicateur du métabolisme cellulaire en aérobie (Larsen S., 2012). Nous avons réalisé cette expérience pour nous assurer que les rats ont bien répondu à l'entraînement physique intensif qu'ils ont subi. L'étude a été réalisée sur le muscle gastrocnémien.

Nos résultats montrent que l'HI n'affecte pas l'activité de la CS, alors que l'EI induit une augmentation globale importante de cette activité (ANOVA à deux facteurs sans mesures répétées) ($p < 0,0001$) chez les rats hypoxiques et normoxiques pris ensemble (Fig. 44).

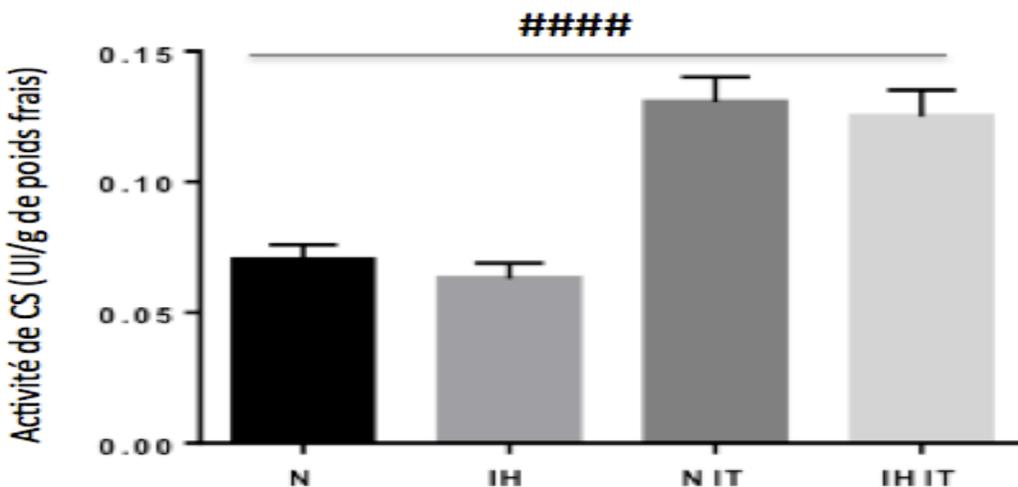


Figure 44 : Activité de la citrate synthase (CS) mesurée dans les 4 groupes de rats étudiés (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif). Les résultats représentent la mesure de l'activité enzymatique de la CS exprimée en unité internationale (UI) par gramme de poids frais de muscle squelettique (gastrocnémien). Un effet significatif global de l'entraînement intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté sur les graphiques par #### pour $p \leq 0,0001$.

Interprétation- hypothèse :

Une augmentation de l'activité enzymatique de la citrate synthase a été bien enregistrée chez les rats qui ont suivi l'EI indépendamment de leur soumission à l'HI. Ceci révèle que les rats ont bien répondu au protocole de l'EI vu l'augmentation du métabolisme cellulaire en aérobie de leurs muscles. Ensuite, et comme déjà mentionné dans la partie de la pression artérielle, nous avons voulu étudié le mécanisme sous-jacents à l'augmentation de la pression artérielle. Pour cela, nous avons commencé par répondre à la première question posée : est ce que l'augmentation de la pression artérielle induite par l'HI est due à un remodelage vasculaire ?

V.2. Remodelage vasculaire

Les mesures de l'épaisseur intima-média (IM) artérielle ont été largement utilisées comme critère principal pour étudier la morbidité cardiovasculaire et pour étudier les effets de nouvelles interventions comme traitements alternatifs de ces morbidités (Manco M. et coll., 2017) (Terentes-Printzios D. et coll., 2017) (Huang YQ. et coll., 2017) (Demir AM. et coll., 2016). Aussi, nous nous sommes intéressés à la mesure de l'épaisseur intima-média au niveau de 4 différentes artères prélevées sur nos rats : ceci afin d'évaluer le remodelage vasculaire induite par l'HI et vérifier si les sessions d'entraînement physique intensif peuvent prévenir ce remodelage.

Nous avons fait cette mesure sur l'artère carotide, l'artère pulmonaire, l'aorte thoracique (aorte ascendante et la crosse aortique), et la partie inférieure de l'aorte abdominale. Ces artères diffèrent aussi bien au niveau de leurs structures que de leurs fonctions.

Nos résultats montrent que, dans l'artère carotide, l'EI induit globalement une diminution significative de l'épaisseur IM (ANOVA deux facteurs sans mesures répétées) ($p < 0,0001$), alors que l'HI fait augmenter globalement cet épaisseur IM ($p = 0,0004$) (Fig. 45-I A et 45-II E). Il faut noter que, d'une manière intéressante, l'élévation de l'épaisseur IM induite par l'HI est beaucoup plus faible chez les rats entraînés par rapport aux rats sédentaires (interaction significative EI x HI : $p = 0,0013$) (Fig. 45-I A et 45-II E).

Dans l'artère pulmonaire, l'HI ($p = 0,0036$) aussi bien que l'EI ($p < 0,0001$) induisent globalement une élévation significative de l'épaisseur IM (Fig. 45-I B et 45-II F). Il est à noter que, comme dans l'artère carotide, l'élévation induite par l'HI est très faible chez les rats entraînés par comparaison aux rats sédentaires (interaction significative EI x HI : $p = 0,0036$) (Fig. 45-I B et 45-II F).

Au niveau de l'aorte thoracique, nos résultats révèlent que l'EI diminue globalement l'épaisseur IM ($p = 0,0296$) chez les rats normoxiques et les rats soumis à l'HI pris ensemble (Fig. 45-I C et 45-II G). Quant à l'HI, son effet est dépendant de l'EI (interaction significative HI x EI : $p = 0,0144$). Ainsi nous trouvons, qu'en absence de l'EI, l'HI fait diminuer l'épaisseur IM chez les rats sédentaires ($p = 0,0326$, ANOVA à un facteur), alors que l'écart entre rats normoxiques et soumis à l'HI n'est pas significatif chez les rats entraînés ($p = 0,632$, ANOVA à un facteur). Il est à signaler que l'interaction HIxEI affecte aussi l'EI ou son effet est fort pour les normoxiques alors qu'il est faible pour les hypoxiques intermittents (Fig. 45-I C et 45-II G).

Enfin, au niveau de l'aorte abdominale ni l'HI ni l'EI n'ont d'effet significatif sur l'épaisseur IM, même si l'HI est en limite d'avoir un effet significatif augmentant l'épaisseur IM (HI : $p = 0,0744$ et EI : $p = 0,2745$) (Fig. 45-I D et 45-II H).

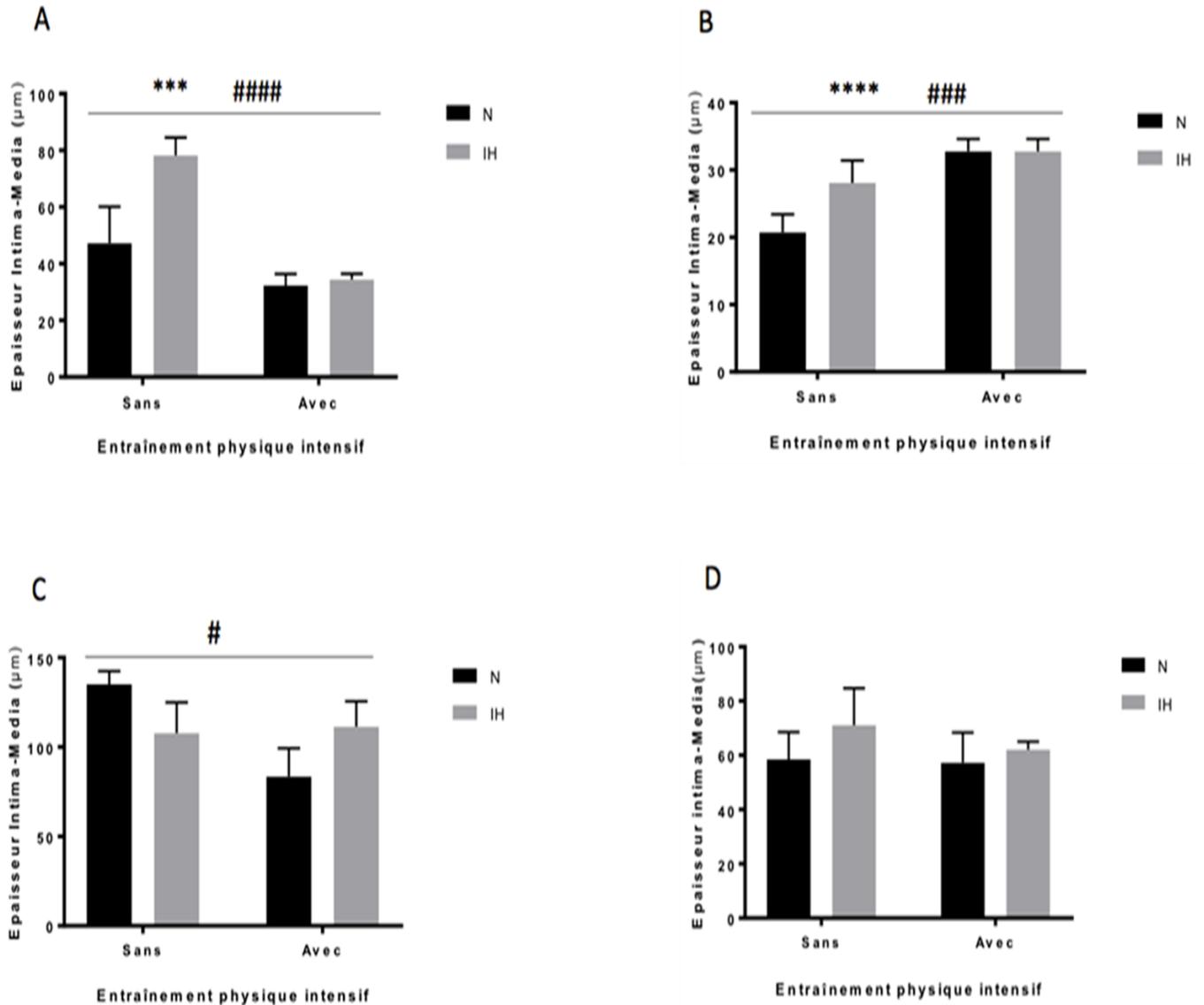


Figure 45-I : Mesure de l'épaisseur de l'intima-média sur des coupes histologiques de 8 μm d'épaisseur d'artères des 4 groupes de rats étudiés (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente soumis ou non à l'entraînement physique intensif) de quatre artères: A) Artère carotide, B) Artère pulmonaire C) Aorte thoracique D) Aorte abdominale. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$, par ### pour $p \leq 0,001$ par # pour $p \leq 0,05$. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par *** pour $p \leq 0,001$ et par **** pour $p \leq 0,0001$.

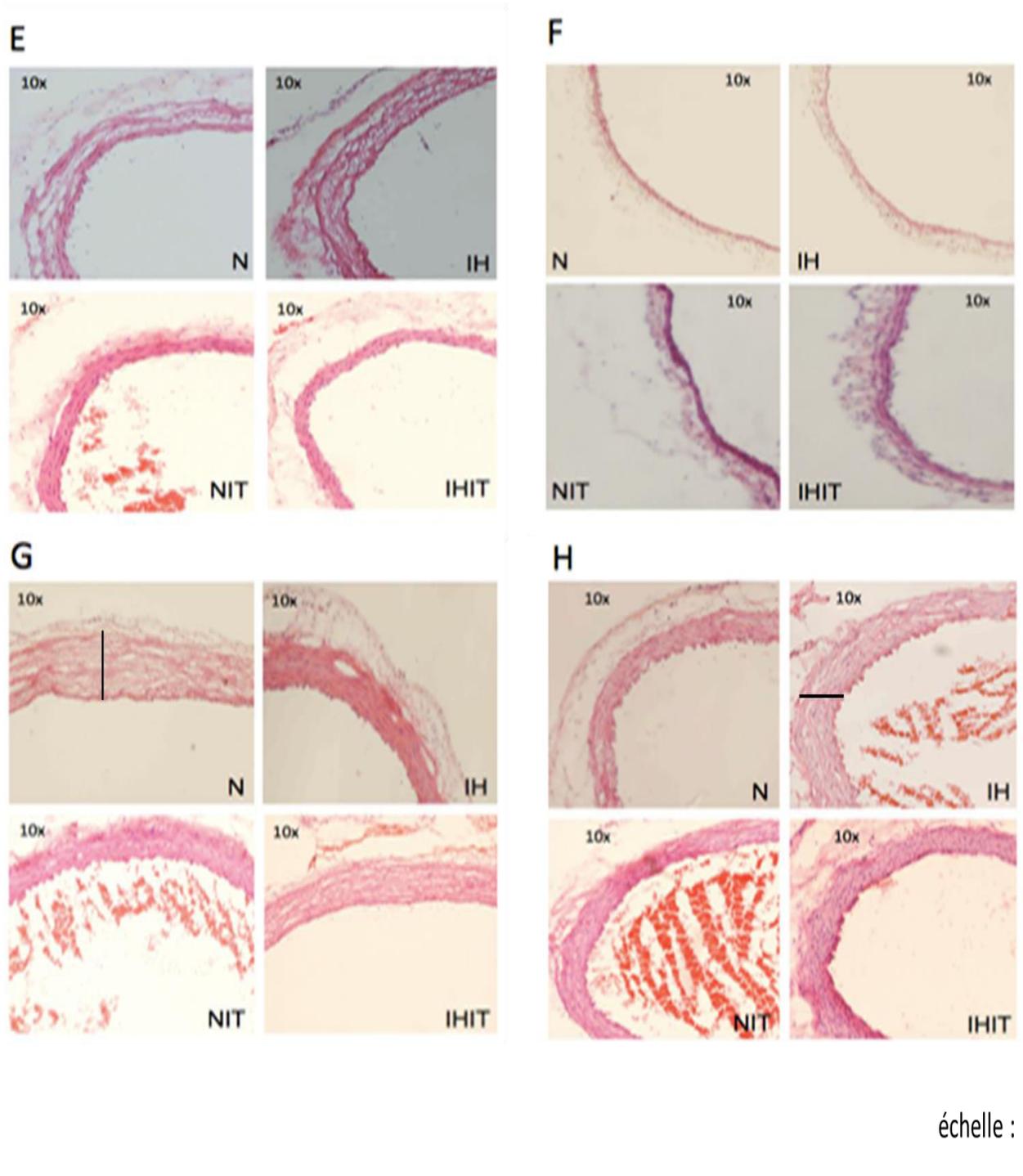


Figure 45-II : Les images obtenues après la coloration des coupes histologiques par l'hématoxyline / éosine extraites des 4 groupes de rats étudiés (N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif) de quatre artères: E) pour l'artère carotide, F) pour l'artère pulmonaire, G) pour l'aorte thoracique et H) pour l'aorte abdominale.

Interprétation- hypothèse :

Comme montré ci-dessus, l'HI est responsable d'une augmentation de l'épaisseur intima-média de l'artère carotide et l'artère abdominale, qui est probablement responsable, en partie, de l'élévation de la pression artérielle suite à la diminution des diamètres des vaisseaux contenant le sang circulant. D'autre part, l'EI s'est révélé capable de limiter cet épaissement de l'artère carotide et par conséquent, il peut réduire potentiellement l'augmentation de la pression artérielle résultante.

Pour aller plus loin, et pour valider cette hypothèse, nous avons ensuite étudié l'effet de l'HI et de l'EI sur la réactivité vasculaire en présence des agents vaso-actifs.

V.3. L'artériographie de tension

Après l'évaluation des effets de l'hypoxie intermittente et de l'entraînement physique sur le remodelage vasculaire, nous avons étudié leurs effets sur la réactivité vasculaire en utilisant la technique d'artériographie de tension sur des anneaux d'aortes prélevés sur des rats de chacun des 4 groupes (N, IH, NIT et IHIT). Nous avons utilisé trois agonistes pharmacologiques différents : la phényléphrine (PE), l'endothéline-1 (ET-1) et l'acétylcholine (ACh). La PE est un agent vasoconstricteur activant les récepteurs α -adrénergiques des CMLV (Gonzales RJ. et coll., 2000), l'ET-1 est le vasoconstricteur le plus puissant dans le corps humain et est sécrété par les cellules endothéliales. En se fixant sur les récepteurs ET_A et ET_B dans les cellules musculaires lisses vasculaires, il exerce son effet biologique essentiel qui est la régulation du tonus vasculaire (Ivey ME. et coll., 2008). Quant à l'ACh, c'est un vasodilatateur agissant sur les récepteurs cholinergiques parasympathiques des CMLV, qui induisent une relaxation dépendante de l'endothélium. Celle-ci implique la synthèse et la libération du monoxyde d'azote (NO), qui est un agent diffusible agissant comme relaxant musculaire, par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins (Landry Y. et coll., 2009). La réactivité vasculaire des anneaux d'aorte est étudiée en réponse à des concentrations croissantes de ces agents vasoconstricteurs et vasodilatateurs.

L'analyse de nos résultats par une ANOVA à 3 facteurs (HI, EI, dose) montre qu'en réponse à des doses croissantes de PE, l'HI n'affecte pas la tension de l'aorte produite en réponse à la PE

($p = 0,4841$). En revanche, l'EI diminue globalement la tension produite par les anneaux de l'aorte ($p < 0,0001$), d'une façon indépendante de l'HI (interaction non-significative EI x HI : $p = 0,134$). Cet effet est dépendant de la concentration de PE (interaction significative EI x dose : $p < 0,0001$). Ainsi, les tests post hoc LSA montrent qu'à 10^{-11} mol/L de PE, l'effet de EI n'est pas significatif ($p = 0,4601$), alors qu'à partir de 10^{-10} mol/L, l'effet de l'EI est significatif et devient plus important l'augmentation de la concentration (PE de 10^{-10} mol/L \rightarrow 10^{-6} mol/L : $p = 0,001$ et PE à 10^{-5} mol/L et 10^{-4} mol/L : $p < 0,0001$) (Fig. 46).

De même, en réponse à l'ET-1, une ANOVA à 3 facteurs (HI, EI, dose) montre que l'effet de l'HI sur la tension de l'aorte est absent ($p = 0,2654$) (Fig. 47). En revanche, l'EI diminue globalement la force développée par les anneaux de l'aorte ($p < 0,0001$) chez les rats soumis à la normoxie et à l'HI (Fig. 47). De plus, l'effet de l'EI dépend de la concentration de l'ET : interaction EI x dose : $p < 0,0001$. En effet, les tests post hoc LSD montrent qu'à la plus faible concentration d'ET-1 (10^{-12} mol/L), la différence entre la tension de l'aorte produite chez les rats sédentaires et les rats entraînés n'est pas significative $p = 0,1099$. En revanche, à partir de la concentration 10^{-11} mol/L d'ET-1 l'effet de l'EI est significatif ($p = 0,0349$) et devient plus important avec l'augmentation de la concentration ($p = 0,009$ pour 10^{-10} mol/L \rightarrow 10^{-8} mol/L d'ET-1 et $p < 0,0001$ pour 10^{-7} mol/L \rightarrow 10^{-5} mol/L d'ET-1) (Fig. 47).

D'autre part, concernant la réponse à l'ACh, l'ANOVA à 3 facteurs (HI, EI, dose) montre que l'HI n'induit aucun changement significatif global. En revanche, l'EI fait augmenter globalement la vasodilatation induite par l'ACh, en valeurs brutes et en pourcentages (Fig. 48 A et B) ($p < 0,0001$), indépendamment de l'HI (interaction HI x EI : $p = 0,1973$) et de la dose (interaction EI x dose : $p = 0,06$). Cependant, cette valeur limite ($p = 0,06$) pour l'interaction EI x dose indique une tendance à un effet de l'EI augmentant avec la dose d'ACh, comme cela peut être observé dans la figure 48 B.

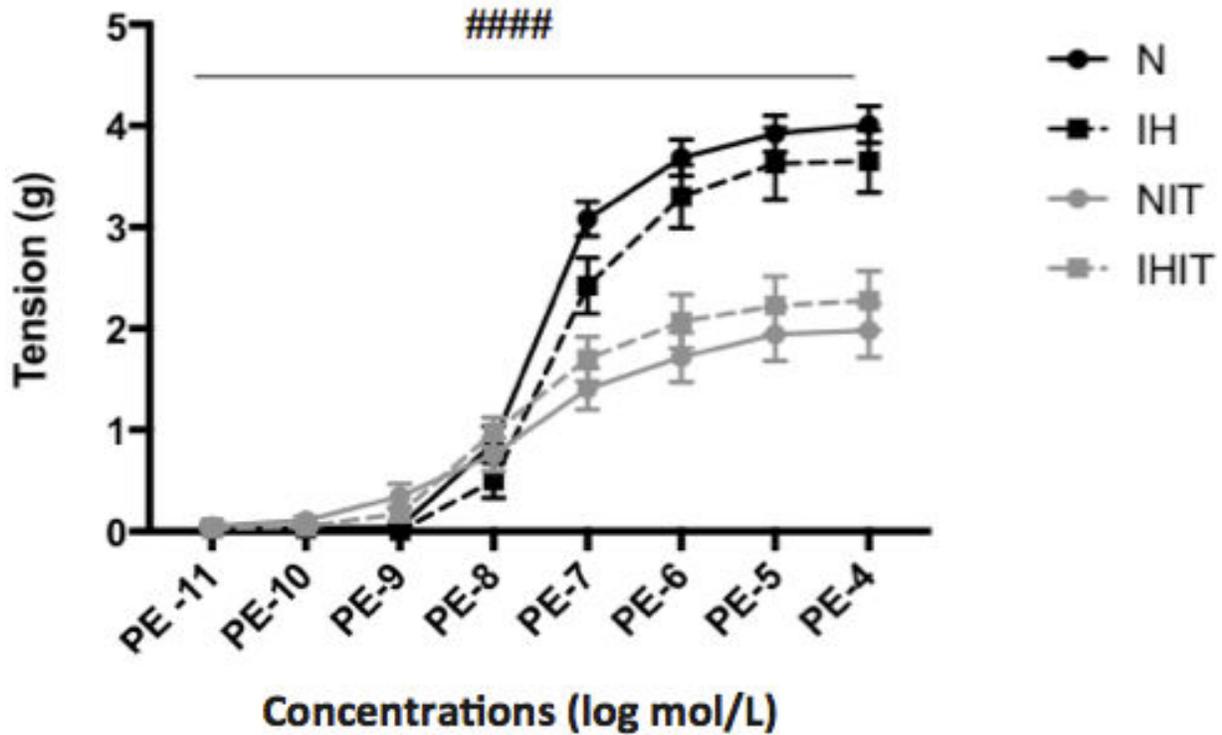


Figure 46 : Courbes représentant les réponses cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés: (N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif) en réponse à la phényléphrine (PE). Les données sont exprimées comme la tension des anneaux de l'aorte en g. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

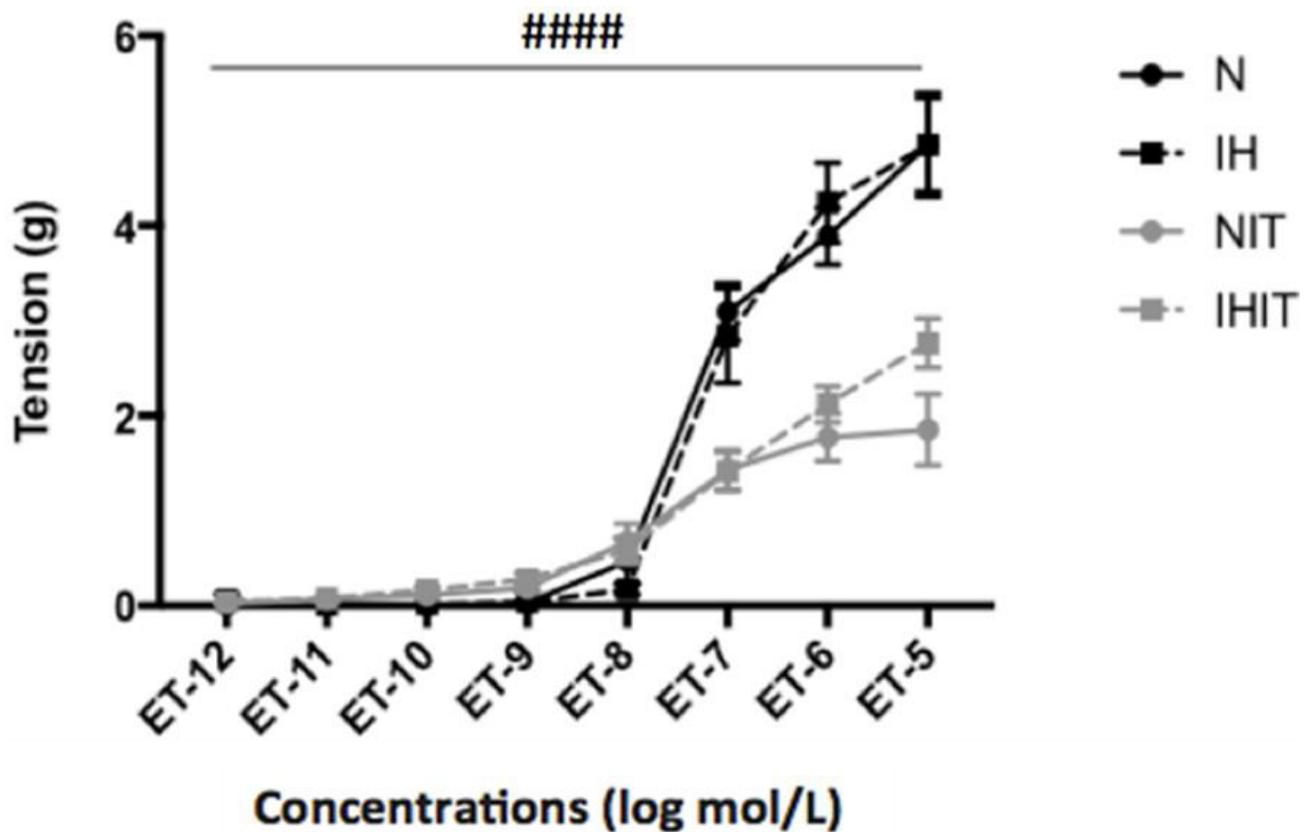


Figure 47 : Courbes représentant les réponses cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés : (N : rats sédentaires soumis à la normoxie, IH : rats sédentaires soumis à une hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif) en réponse à l'endothéline-1 (ET-1). Les données sont exprimées comme la tension des anneaux de l'aorte en g. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté par #### pour $p \leq 0,0001$.

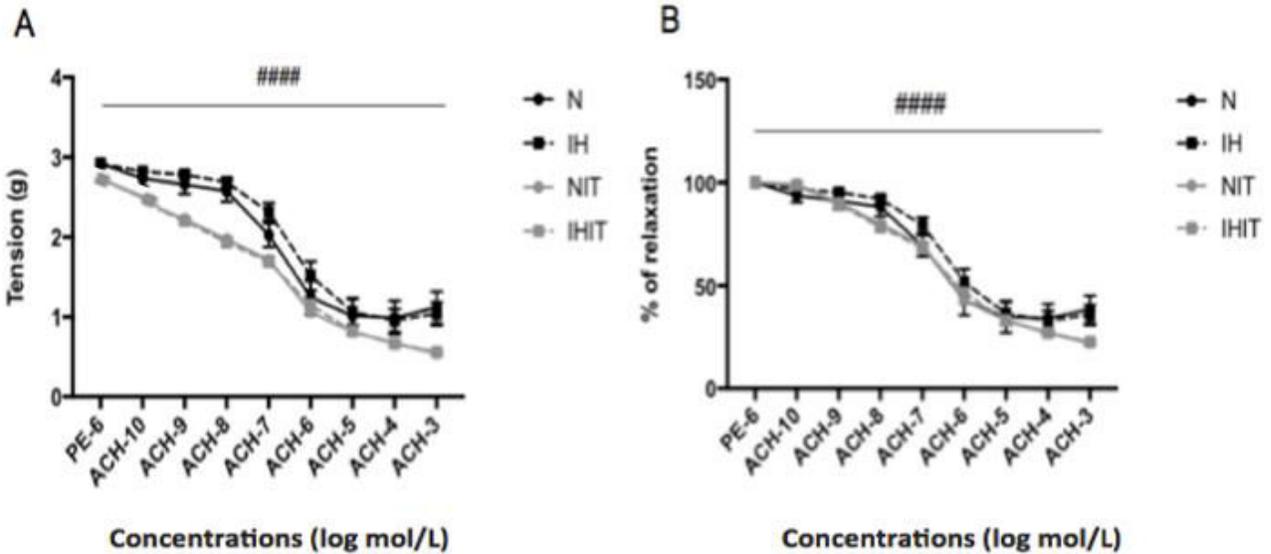


Figure 48 : Courbes cumulées concentration-tension des anneaux d'aorte extraits des 4 groupes de rats étudiés (N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif) en réponse à l'acétylcholine (ACh) après pré-contraction avec 10^{-6} mol / L de phényléphrine (PE). Les données sont exprimées comme la tension en g des anneaux soumis à l'ACh (A) ou comme le % de relaxation par rapport à la précontraction initiale induite par 10^{-6} mol / L de PE (B). Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats normoxiques et hypoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'HI n'a pas d'effet sensible sur la réponse aortique à l'ACh. Cependant, l'EI est capable de réguler la réactivité vasculaire de l'aorte en favorisant la relaxation endothélium-dépendant en réponse à l'ACh, et en réduisant la vasoconstriction en réponse à l'ET-1 et à la PE, aussi bien sur l'aorte issue d'animaux normoxiques que ceux ayant subi une HI.

Les changements de la vasoréactivité de l'aorte sont associés principalement à des changements dans la contraction musculaire. Comme la voie de signalisation du calcium est le régulateur clé de la contraction musculaire, en particulier des mécanismes de couplage excitation-contraction (Hill-Eubanks DC. et coll., 2011) (Chalmers S. et coll., 2007), nous avons donc choisi d'étudier les processus sous-jacents de la contractilité du muscle lisse de l'aorte en considérant les variations de la concentration du calcium intracellulaire des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) de l'aorte.

Interprétation- hypothèse :

Les résultats ci-dessus révèlent que l'EI fait diminuer la réponse contractile de l'aorte des rats en réponse aux agents vasoconstricteurs (PE, ET-1), alors qu'il améliore la vasodilatation de leurs aortes en réponse à l'ACh. L'effet de l'HI n'était pas significatif sur la vasoreactivité des aortes. Nous avons donc ensuite passé à examiner si les effets de l'EI et de l'HI sont associés à des changements de la gestion du calcium dans les cellules musculaires lisses vasculaires constituant les aortes.

V.4. La signalisation calcique dans les CMLV

Le calcium des CMLV peut provenir des réserves intracellulaires ou du milieu extracellulaire. Il est bien documenté que la libération du calcium des réserves intracellulaires des CMLV est principalement opérée par deux types de canaux-récepteurs de calcium : les récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR) et le récepteur sensible au 1, 4,5 Inositol triphosphate (IP3R) (Santulli G. et coll., 2017) (Reddish FN. et coll., 2017) (Johny JP. et coll., 2017). Pour suivre la libération du calcium par ces récepteurs, nous avons utilisé le Fluo-4 AM, un indicateur fluorescent spécifique du calcium. Après avoir pénétré dans les CMLV, l'intensité de la fluorescence émise par le Fluo-4, visualisée par microscope à épifluorescence, sera dépendante de la concentration du calcium dans le cytosol de la CMLV.

Dans de telles études, la caféine, qui est un agoniste connu pour activer les RyR, est utilisée pour déclencher la libération de calcium des réserves intracellulaires (Sugimachi S. et coll., 2016) (Malgaroli A. et coll., 1990). Nous avons testé les effets de 5 différentes concentrations de caféine : 1, 2, 5, 10 et 20 mM et nous avons retenu pour les expériences ultérieures la dose de 10mM qui permet une libération maximale du calcium intracellulaire des CMLV prélevées dans tous les groupes de rats.

Nos résultats sont représentés comme le rapport de $\Delta F / F_0$, avec :
(ΔF) = Δ fluorescence = FMax - F0;

FMax : est l'intensité maximale de la fluorescence atteinte après addition des 10 mM de caféine.

F0 : est l'intensité basale de fluorescence enregistrée avant l'ajout des 10 mM de caféine.

Cette méthodologie de calcul de normalisation, validée par Maravall (Maravall M. et coll., 2000), représente l'amplitude du signal pour une condition donnée et calcule sa variation en éliminant les différences entre les niveaux de fluorescence basaux de chaque cellule.

Nous avons aussi mené une série d'expériences afin de vérifier dans quelle mesure les canaux récepteurs RyR et IP3R sont impliqués respectivement dans la réponse calcique observée. Pour ce faire, nous avons utilisé des antagonistes spécifiques de ces récepteurs :

- 1- le dantrolène (10 μ M) : antagoniste spécifique des RyR : il agit sur RyR1 et RyR3 : (Zhao F. et coll., 2001) (Keshavarz M. et coll., 2016) (Liou B. et coll., 2016).
- 2- la xestospongine C (10 μ M) : antagoniste spécifique de l'IP3R (Saleem H. et coll., 2014) (Oka T. et coll., 2002).

Les analyses de nos résultats par des tests ANOVA à deux facteurs (HI et EI) sans mesures répétées montrent que l'HI induit une augmentation globale des flux de calcium libérée du RS ($p = 0,007$), chez les rats sédentaires aussi bien que chez les rats entraînés, après stimulation des cellules par 10 mM de caféine (Fig. 49 A). De même l'EI augmente globalement la libération de calcium du RS ($p = 0,042$), chez les rats normoxiques et hypoxiques (Fig. 49 A). Il est à noter que les effets de l'HI et de l'EI sont indépendants l'un de l'autre (interaction non-significative HI x EI : $p = 0,841$).

Lorsque les CMLV sont pré-incubées avec le dantrolène (inhibant l'action des isoformes RyR1 et RyR3) et après leur stimulation par 10 mM de la caféine, une libération de calcium est toujours enregistrée (Fig. 49 B). Ceci révèle que l'isoforme RyR2, non-inhibée par le dantrolène joue un rôle important dans la libération de calcium intracellulaire. De plus, nous remarquons que la quantité de calcium libérée après stimulation par la caféine, au niveau des cellules pré-incubées avec le dantrolène, est inférieure à celle qui est libérée par les cellules non-traitées par le dantrolène (Fig. 49 A et B). Cette diminution de la quantité de calcium est d'ordre de 40% dans le groupe N, de 33% dans le groupe IH, de 22% dans le groupe NIT et de 26% dans le groupe IHIT (test Anova 1 facteur) (Fig. 49 A et B). Ceci révèle que les isoformes RyR1 et RyR3 participent aussi à cette libération de calcium du RS. En outre, dans les CMLV pré-incubées avec la dantrolène, l'EI exerce toujours son effet significatif global ($p = 0,0345$) en augmentant la quantité de calcium libérée aussi bien chez les rats hypoxiques que chez les

normoxiques (Fig. 49 B). L'HI ne montre cependant plus d'effet significatif, mais seulement une tendance à élever la quantité de calcium libérée ($p = 0,0888$).

Finalement, nous avons utilisé la xestospongine C, pour vérifier si l'IP3R participe aussi à la libération de calcium induite par la caféine. En comparant les résultats obtenus avec (Fig. 49 A) et sans (Fig. 49 C) pré-incubation avec la xestospongine C, nous constatons que la quantité de calcium libérée est réduite par la xestospongine C chez tous les groupes de rats avec un pourcentage de 20% chez les rats N, de 38% chez les rats IH, de 42% chez les rats NIT et de 35% chez les rats IHIT (test Anova 1 facteur). Ceci a lieu en absence de tout effet de l'HI ($p = 0,657$) et de l'EI ($p = 0,7166$) (Fig. 49 A et C). La quantité de calcium ainsi libérée (Fig. 49 C) correspond à la part de calcium non-libérée par les IP3R. Ceci indique donc que l'IP3R participe aussi à la libération du calcium intracellulaire du RS induite par la caféine.

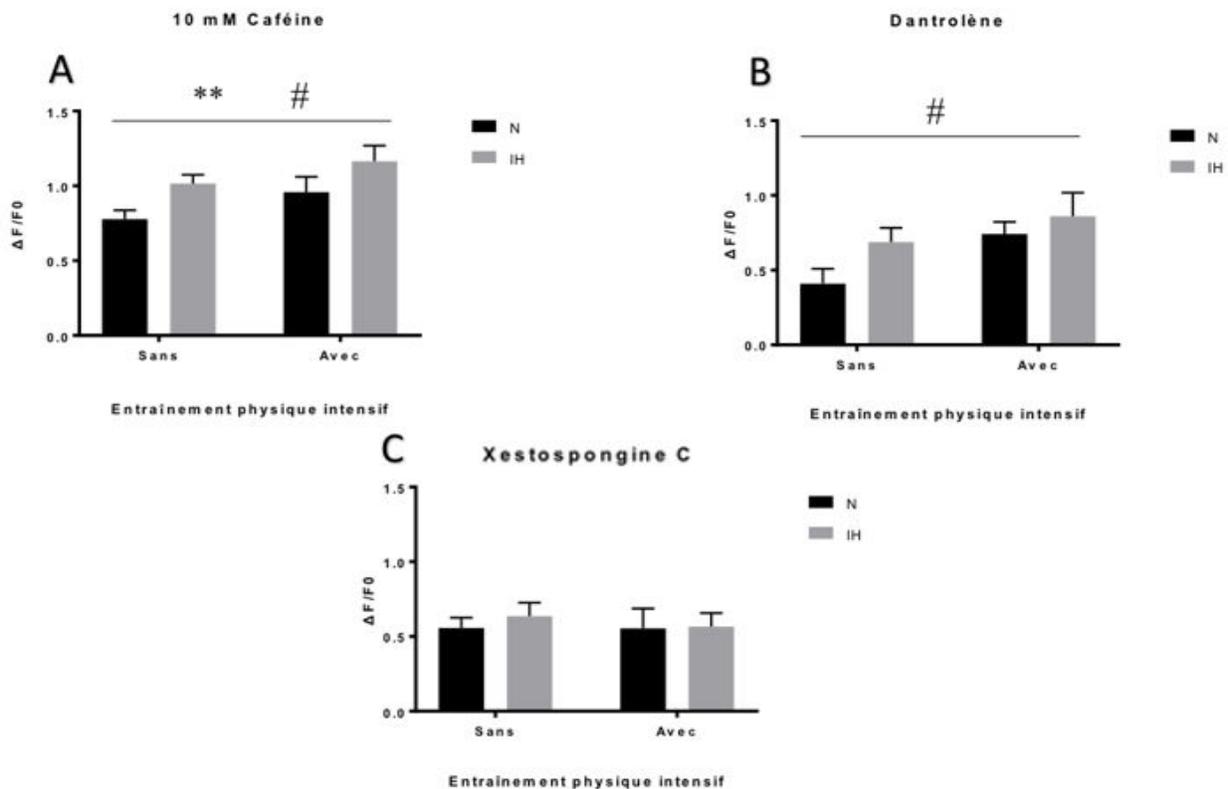


Figure 49 : Amplitude de la réponse calcique des cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV) à 10 mM de caféine, sans pré-incubation (A), pré-incubées avec 10 μ M de dantrolène (B) ou pré-incubées avec 10 μ M xestospongine (C), observées par microscopie à épifluorescence après incubation cellulaire avec le Fluo-4 AM. N : rats en normoxie, IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente soumis ou non à l'entraînement physique intensif. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par ** pour $p \leq 0,01$. Un effet significatif global de l'entraînement intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté sur le graphique par # pour $p \leq 0,05$.

Interprétation- hypothèse :

Nos résultats de l'imagerie calcique, montrent que l'HI et l'EI induisent une augmentation de la libération du calcium du réticulum sarcoplasmique des cellules musculaires lisses vasculaires des l'aorte des rats. Ces changements peuvent expliquer en partie l'effet de l'EI sur la réactivité vasculaire, et en partie l'effet de l'HI sur la pression artérielle des rats. Les changements des taux du calcium intracellulaire enregistrés sont probablement associés à une suractivation des canaux calciques, soit à une surexpression de ces canaux. Nous avons testé dans la suite la possibilité de l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des canaux, récepteurs et pompes calciques par Q-PCR.

V.5. PCR en temps réel (Q-PCR)

Nous avons étudié les niveaux d'expression des ARNm et des protéines exprimés par les gènes les plus susceptibles d'influencer la voie de signalisation du calcium à différents niveaux du système vasculaire (artères élastiques -aorte thoracique, aorte abdominale- et artères musculaires - artères mésentériques), pour examiner si les différences de structures et de fonctions artérielles étaient liées à une expression protéique différente en réponse à l'HI et l'EI. Les récepteurs, canaux et pompes à calcium étudiés sont :

- le canal calcique TRPV4 : canal membranaire de la famille TRPV facilitant l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytosol) (Randhawa PK. et coll, 2015),
- les récepteurs-canaux RyR1, RyR2 et RyR3 : trois isoformes du récepteur de la ryanodine (Meissner G., 2017),
- les pompes SERCA1 et SERCA2 : 2 isoformes de la pompe sarco (endo) réticulum plasmique Ca^{2+} -ATPase (Chemalya R. et coll, 2018),
- les récepteurs-canaux IP3R1 et IP3R3 : les isoformes 1 et 3 du récepteur de l'inositol 1, 4,5 triphosphate qui gèrent la libération de calcium intracellulaire et l'absorption à partir de et dans le réticulum sarcoplasmique) (Lin Q. et coll, 2016).

Le niveau d'expression relatif des ARNm de ces gènes d'intérêt (listé ci-dessus) est calculé en fonction de la moyenne du niveau d'expression en ARNm de 3 gènes de références : la bêta – actine (Actb), le TATA box binding – protein (Tbp) et la cyclophiline A (Ppia).

V.5.1. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant pour les canaux-récepteurs et pompes calciques des tissus vasculaires

Les résultats de Q-PCR montrent que les gènes Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itrp1 codant respectivement pour les protéines RyR1, RyR2, RyR3, TRPV4, SERCA1, SERCA2 et IP3R1 sont bien exprimés dans les 3 tissus vasculaires étudiés : l'aorte thoracique (Fig. 50), l'aorte abdominale (Fig. 51) et les artères mésentériques (Fig. 52). En revanche, le gène Itrp3 codant pour la protéine IP3R3 n'est pas exprimé dans ces tissus (Fig. 50-52).

La méthode de calcul adoptée dans nos résultats ($2^{-\Delta Ct}$) nous permet de comparer le niveau d'expression de chaque gène d'intérêt (selon leur taux d'ARNm mesuré) entre les groupes témoins (N) de chacun des tissus étudiés.

Avant l'évaluation de l'effet de chaque facteur HI et/ou EI sur l'expression de ces différents gènes, nous avons voulu savoir si leurs expressions diffèrent en fonction du tissu vasculaire étudié. Pour tester cette hypothèse, nous avons effectué un test ANOVA 2 facteurs sans mesures répétées (gène, tissu) en prenant en considération uniquement les groupes de rats contrôles (N). Les résultats de ce test révèlent que le gène ($p < 0,0001$) aussi bien que le tissu étudié ($p < 0,0001$) affectent globalement le taux d'ARNm des gènes étudiés. De plus l'effet de l'un dépend de l'autre : interaction significative : gène x tissu ($p < 0,0001$). Pour cela nous avons réalisé des tests ANOVA 1 facteur sans mesures répétées (tissu) sur chacun de ces gènes. Ainsi, on trouve que le niveau d'expression relatif des ARNm des 3 isoformes de RyR (Ryr1, Ryr2 et Ryr3) prises ensemble, est trois fois inférieur dans les artères musculaires (mésentériques) (Fig. 52) par rapport aux artères systémiques : l'aorte thoracique ($p < 0,0001$) (Fig. 50) et l'aorte abdominale ($p < 0,0001$) (Fig. 51). De même, le taux d'ARNm relatif du Trpv4 est 5 fois plus faible dans les artères mésentériques (Fig. 52) par rapport à l'aorte thoracique ($p = 0,0001$) (Fig. 50) et l'aorte abdominale ($p = 0,0015$) (Fig. 51). En revanche, le taux d'ARNm des gènes (Atp2a1 et Atp2a2) prises ensemble du groupe N est 2 fois plus élevé au niveau de l'aorte abdominale (Fig. 51) par rapport à l'aorte thoracique ($p = 0,0003$) (Fig. 50) et 9 fois plus élevés par rapport aux artères mésentériques ($p = 0,0002$) (Fig. 52). De même, le taux d'ARNm du gène Itrp1 est 2 fois plus élevé chez le groupe N au niveau de l'aorte de l'aorte abdominale (Fig. 51) par rapport à l'aorte

thoracique ($p = 0,0005$) (Fig. 50) et 9 fois plus élevés par rapport aux artères mésentériques ($p = 0,0001$) (Fig. 52).

Pour évaluer ensuite l'effet de l'EI et de l'HI sur l'expression des gènes d'intérêt, nous avons réalisé des tests ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, et gène) pour chaque tissu à part. Tout d'abord, au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 50), l'analyse ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) montre que l'HI induit une augmentation significative globale ($p < 0,0001$) des taux relatifs de l'ARNm des différents gènes (effet significatif global du gène : $p < 0,0001$). Quant à l'EI, lui aussi induit une augmentation globale ($p < 0,0001$) des taux d'ARNm des gènes étudiés. Il est à noter que l'HI, l'EI et le gène ont des effets croisés : interactions significatives : HI x EI ($p < 0,0001$), HI x gène ($p < 0,0001$), EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Ce qui nous a permis de réaliser des tests ANOVA 2 facteurs pour chaque 2 facteurs séparément : (EI, HI), (HI, gène), et (EI, gène). Le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI, HI) réalisé pour chaque gène, révèle que l'HI induit une augmentation significative de l'expression de tous les gènes : Ryr1 ($p = 0,0001$), Ryr2 ($p = 0,0002$), Ryr3 ($p = 0,00012$), Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itpr1 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés. Quant à lui, l'EI encore fait augmenter le taux d'expression relatif des ARNm de tous les gènes : Ryr1, Ryr2, Ryr3 ($p < 0,0001$), Trpv4 ($p = 0,0004$), Atp2a1 ($p = 0,0002$), Atp2a2 ($p = 0,0001$), Itpr1 ($p = 0,0005$) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI. Etant donné l'interaction significative entre l'effet de l'HI et l'EI ($p < 0,0001$), on remarque que l'élévation du taux des ARNm induit par l'HI est plus importante chez les rats sédentaires par rapport aux rats entraînés (Fig. 50). En outre, le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, gène), révèle qu'au niveau de l'aorte thoracique, le gène Ryr3 est le plus sensible à l'effet de l'HI ($p = 0,0166$) suivi par Atp2a1, Ryr1, Itpr3, Trpv4, Ryr2 et Atp2a2 (Fig. 50). En revanche, le résultat du test ANOVA 2 facteurs (EI, gène), montre que le gène Atp2a2 est celui qui répond le plus à l'EI en terme d'expression d'ARNm ($p = 0,0172$) suivi par Itpr1, Ryr1, Trpv4, Ryr2, Ryr3 et Atp2a1 (Fig. 50).

Ensuite, au niveau de l'aorte abdominale (Fig. 51), l'analyse ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) révèle que l'HI induit une augmentation significative globale ($p < 0,0001$) des taux relatifs de l'ARNm des différents gènes (effet significatif global du gène : $p < 0,0001$). De même, l'EI induit une augmentation globale ($p < 0,0001$) des taux d'ARNm des gènes étudiés. Il est à noter que l'HI, l'EI et le gène ont des effets croisés : interactions significatives :

HI x EI ($p = 0,0001$), HI x gène ($p = 0,0001$), EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Nous avons donc réalisé des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée pour chaque 2 facteurs séparément : (EI, HI), (HI, gène), et (EI, gène). Le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI, HI) réalisé pour chaque gène, révèle que l'HI provoque une élévation significative des taux d'ARNm de tous les gènes étudiés : Ryr1, Ryr2, Ryr3 ($p < 0,0001$), Trpv4 ($p = 0,0002$), Atp2a1 ($p = 0,0004$), Atp2a2 ($p = 0,0003$) et Itp1 ($p = 0,00016$) chez les rats sédentaires et entraînés. De même, l'EI induit une augmentation du taux d'expression relatif des ARNm de tous les gènes : Ryr1, Ryr2 ($p = 0,0001$), Ryr3, Trpv4 ($p < 0,0001$), Atp2a1 ($p = 0,0003$), Atp2a2 ($p = 0,0002$), Itp1 ($p = 0,0002$) chez les rats normoxiques et les rats soumis à l'HI. Il est à noter que l'effet de l'HI sur l'augmentation du taux de l'ARNm des gènes étudiés est plus remarquable chez les rats sédentaires que chez les rats entraînés (Fig. 51). De plus, le test ANOVA 2 facteurs (HI, gène), révèle qu'au niveau de l'aorte abdominale, le Ryr1 est le gène le plus sensible à l'effet de l'HI ($p < 0,0001$) suivi par Ryr3, Itp1, Atp2a2, Atp2a1, Trpv4 et Ryr2 (Fig. 51). En revanche, quand on a réalisé le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI, gène), le gène Ryr2 s'est révélé le plus sensible à l'EI en terme d'expression d'ARNm ($p = 0,0003$) suivi par Atp2a1, Atp2a2, Itp1, Trpv4, Ryr1 et Ryr3 (Fig. 51).

Enfin, au niveau des artères mésentériques (Fig. 52), le test ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) montre que 21 jours d'exposition à l'HI provoquent une élévation significative globale ($p = 0,0001$) des taux relatifs de l'ARNm des différents gènes (effet significatif global du gène : $p = 0,0001$). De la même manière, l'EI induit une augmentation globale ($p < 0,0001$) de l'expression en ARNm des gènes étudiés. Ce test (ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée) révèle aussi que les effets de l'HI, l'EI et du gène sont croisés : interactions significatives : HI x EI ($p = 0,0001$), HI x gène ($p = 0,0001$), EI x gène ($p = 0,0001$) et HI x EI x gène ($p = 0,0001$). Pour mieux savoir l'effet de chaque facteur sur chaque gène, des tests ANOVA 2 facteurs (pour chaque 2 facteurs séparément) sont ensuite appliqués : (EI, HI), (HI, gène), et (EI, gène). Le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI, HI) réalisé pour chaque gène, montre que 21 jours d'exposition à l'HI font augmenter significativement l'expression de tous les gènes étudiés : Ryr1 ($p < 0,0001$), Ryr2, Ryr3 ($p = 0,0001$), Trpv4 ($p = 0,0005$), Atp2a1 ($p = 0,0002$), Atp2a2 ($p = 0,0004$) et Itp1 ($p = 0,0003$) chez les rats sédentaires et soumis à l'EI. Pareillement, l'EI induit une élévation du taux d'expression relatif des ARNm de tous les gènes : Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4 ($p < 0,0001$), Atp2a1 ($p = 0,0001$), Atp2a2 ($p = 0,0003$), Itp1 ($p =$

0,0002) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI. De plus, l'interaction significative entre l'effet de l'HI et l'EI ($p < 0,0001$), nous laisse constater que l'augmentation du taux relatif des ARNm induit par l'HI est plus remarquable chez les rats sédentaires par rapport aux rats entraînés (Fig. 52). D'autre part, le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, gène), révèle que dans ces artères mésentériques, le gène *Atp2a2* est le plus sensibles à l'effet de l'HI ($p = 0,004$) suivi par *Itpr1*, *Ryr3*, *Ryr1*, *Atp2a1*, *Trpv4* et *Ryr2* (Fig. 52). En outre, le résultat du test ANOVA 2 facteurs (EI, gène), montre que le gène *Trpv4* répond le plus à l'effet de l'EI ($p = 0,0016$), suivi par *Trpv4*, *Ryr3*, *Atp2a2*, *Ryr2*, *Atp2a1*, *Itpr1* et *Ryr1* (Fig. 52).

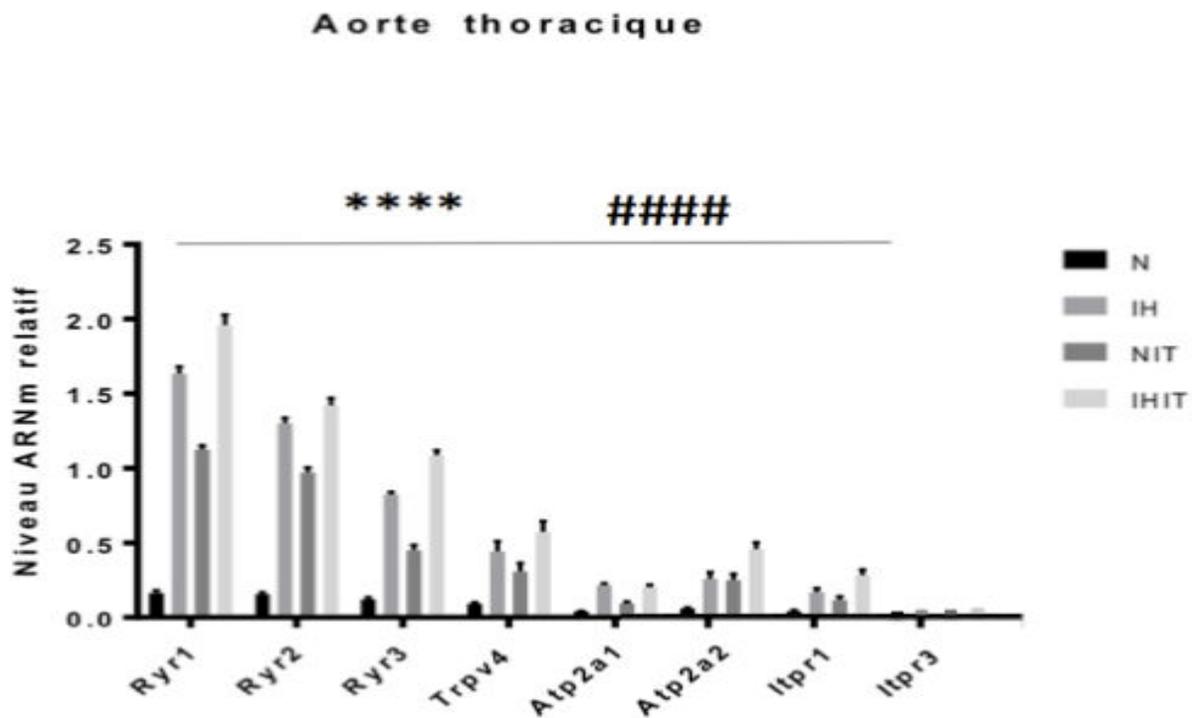


Figure 50 : Variations de l'expression de 8 gènes codant pour les récepteurs, canaux et pompes du calcium (*Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*, *Trpv4*, *Atp2a1*, *Atp2a2*, *Itpr1* et *Itpr3*) dans le tissu vasculaire de l'aorte thoracique extraites des 4 groupes de rats: N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (*Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*, *Trpv4*, *Atp2a1*, *Atp2a2*, *Itpr1* et *Itpr3*) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence: *Actb*, *Tbp* et *Ppia*. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par #### pour $p \leq 0,0001$.

Aorte abdominale

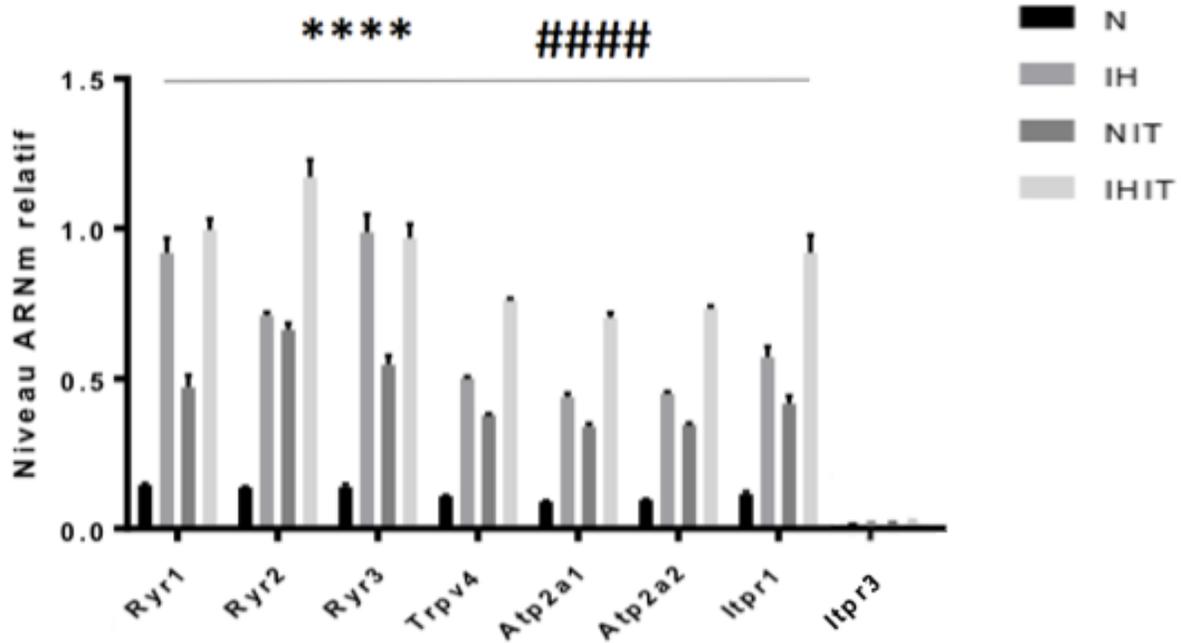


Figure 51 : Graphique montrant la variation d'expression de 8 gènes codant pour les récepteurs, canaux et pompes de calcium (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itpr1) dans le tissu vasculaire de l'aorte abdominale extraites des quatre groupes de rats, N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Itpr1 et Itpr3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Artère mésentérique

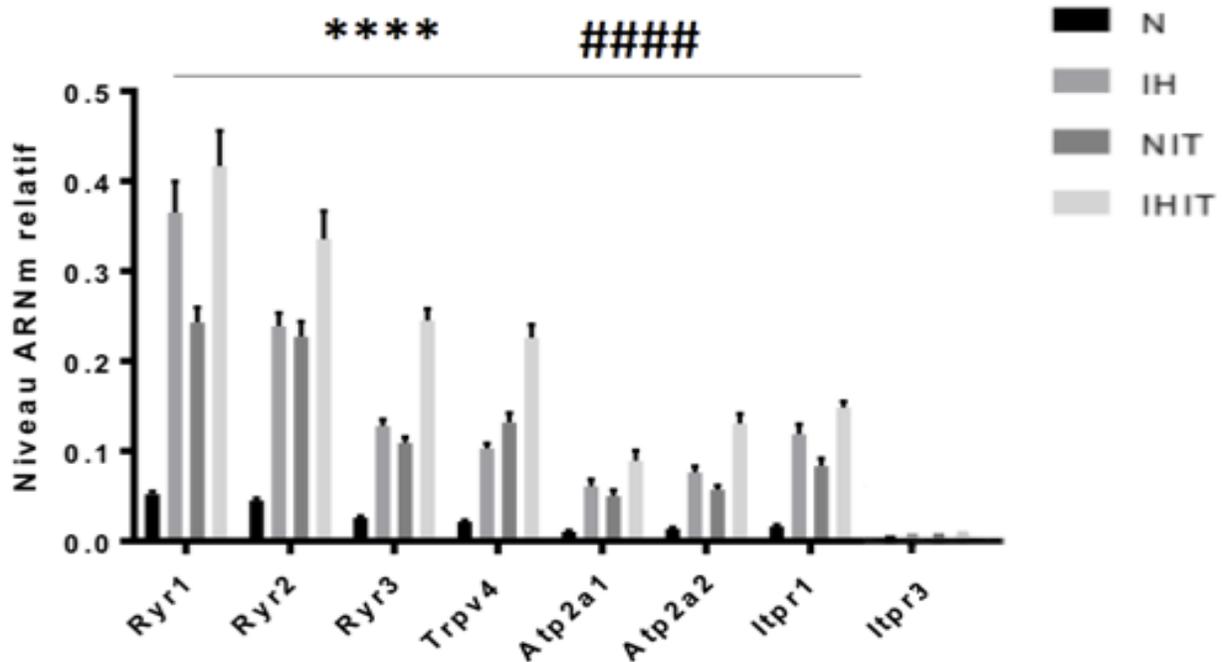


Figure 52 : Graphique montrant la variation d'expression de 8 gènes récepteurs de calcium, canaux et pompes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) dans le tissu vasculaire des artères mésentériques extraites des quatre groupes de rats N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence: Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Interprétation- hypothèse :

Nos résultats de Q-PCR ci-dessus, révèlent que dans trois différents tissus vasculaires (aorte thoracique et abdominale et artères mésentériques), l'HI aussi bien que l'EI induisent une augmentation significative de l'expression en ARNm des gènes codant pour les récepteurs-canaux et pompes calciques responsables de la gestion calcique dans les cellules vasculaires. Ce qui nous amène à proposer que l'HI et l'EI peuvent potentiellement affecter la contraction

musculaire des vaisseaux sanguins. Pour cela, nous avons ensuite étudié l'effet de ces deux facteurs sur l'expression des protéines effectrices de la contraction musculaire lisse.

V.5.2. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant les protéines responsables du couplage excitation-contraction au niveau des tissus vasculaires

Les changements observés au niveau de la voie de signalisation calcique, qui joue un rôle crucial dans le contrôle de la contraction vasculaire, implique des variations au niveau des protéines actrices de la contraction musculaire. Pour cela, dans la deuxième série d'expériences de Q-PCR, nous avons étudié l'expression de gènes codant pour les protéines régulant l'excitation-contraction dans le tissu vasculaire : le complexe tropomyosine-calmoduline et leurs isoformes. Nos résultats montrent que les gènes codant pour les 4 isoformes de la tropomyosine (Tpm1-4) aussi bien que les gènes codant pour les 3 isoformes de la calmoduline (Calm1-3) sont exprimés au niveau des 3 tissus vasculaires étudiés : l'aorte thoracique (Fig. 53), l'aorte abdominale (Fig. 54), et les artères mésentériques (Fig. 55).

En premier lieu, pour étudier l'effet du tissu sur l'expression de l'ARNm de ces gènes, nous avons comparé le niveau d'expression des gènes codant pour les 4 isoformes de la tropomyosine (Tpm1-4) aussi bien que les gènes codant pour les 3 isoformes de la calmoduline (Calm1-3) chez les groupes contrôle (N) dans les trois tissus vasculaires étudiés. Pour cela, nous avons fait un test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (gène, tissu), qui a montré que le taux d'expression en ARNm de ces gènes est tissu-dépendant (effet significatif du tissu : $p < 0,0001$) et gène-dépendant (effet significatif du gène : $p < 0,0001$). De plus l'effet de ces deux facteurs est croisé : interaction significative gène x tissu ($p < 0,0001$), pour cela nous avons réalisé des tests ANOVA 1 facteur (tissu) pour chaque gène. En effet, ces tests révèlent qu'au niveau de l'aorte thoracique, l'isoforme 3 de la tropomyosine (Tpm3) ($p = 0,0001$) et l'isoforme 1 de la calmoduline (Calm1) ($p = 0,0005$) ont les niveaux d'expression relatif en ARNm les plus élevés (Fig. 53). En outre, au niveau de l'aorte abdominale, l'isoforme 2 de la tropomyosine (Tpm2) (p

= 0,0025) aussi que l'isoforme 1 de la calmoduline (Calm1) ($p < 0,0001$) (Fig. 54). Pareillement, au niveau des artères mésentériques, le Tpm2 ($p < 0,0001$) et le Calm1 ($p < 0,0001$) (Fig. 55).

Ensuite, pour évaluer l'effet de l'HI, de l'EI et du gène sur l'expression relatif en ARNm des gènes étudiés, nous avons effectué des tests ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) dans chaque tissu vasculaire séparément. Dans l'aorte thoracique (Fig. 53), l'analyse ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) révèle que HI ($p < 0,0001$) et EI ($p < 0,0001$) exerce un effet significatif global (en diminuant / ou augmentant) sur le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés. En revanche, ces effets (de HI et EI) sont dépendants du gène : interactions significatives : EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x gène ($p < 0,0001$). De même, l'effet de l'un dépendant de l'autre : interaction significative EI x HI ($p < 0,0001$) et du gène : interaction significative HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Donc, pour mieux décrire l'effet de chaque facteur sur l'expression des gènes d'intérêt, nous avons réalisé ensuite des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée : (EI x HI) pour chaque gène, (HI x gène) et (EI x gène). Tout d'abord, en ce qui concerne l'effet de l'HI au niveau de l'aorte thoracique, l'allure du graphique (Fig. 53) révèle que l'effet de l'HI sur les isoformes de Tpm est semblable, alors qu'il est différent de celui chez les isoformes de Calm. Les résultats des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) confirme (en partie) l'allure du graphe (Fig. 53) et révèlent que 21 d'exposition à l'HI induisent une diminution significative du taux de l'expression de l'ARNm des isoformes Tpm3 ($p < 0,0001$), Tpm4 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires, alors qu'ils induisent une augmentation significative de ce taux chez ces mêmes gènes chez les rats entraînés : interaction significative EI x HI ($p < 0,0001$ pour Tpm3) et ($p < 0,0001$ pour Tpm4). Le même effet de l'HI est observé sur les isoformes Tpm1 et Tpm2 mais sans être significatif ($p = 0,102$ pour Tpm) et ($p = 0,442$ pour Tpm2). Quant aux isoformes de Calm, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée indiquent que l'exposition à l'HI induit une augmentation significative du taux d'ARNm relatif des isoformes Calm1 ($p = 0,0002$) et Calm2 ($p = 0,0007$) chez les rats sédentaires aussi bien que chez les rats entraînés (interaction significative EI x HI : $p = 0,0005$ pour Calm1, et $p = 0,0013$ pour Calm2). En outre, le même effet d'HI est observé pour le Calm3 mais sans être significatif ($p = 0,270$) (Fig. 53).

Ensuite, quant à lui, l'EI induit une diminution significative du taux d'ARNm de l'isoforme Tpm1 ($p < 0,0001$) et Tpm4 ($p < 0,0001$) chez les rats normoxiques et soumis à l'HI. En outre, l'EI fait diminuer le taux d'ARNm relatif de l'isoforme Tpm3 ($p < 0,0001$) chez les rats en

normoxie alors qu'il fait augmenter ce taux chez les rats soumis à l'HI. Le même effet de EI sur Tpm3 est observé sur Tpm2 mais sans être significatif ($p = 0,214$) (Fig. 53). Quant aux isoformes de Calm, l'EI induit une diminution significative du taux d'ARNm de Calm 1 ($p < 0,0001$), Calm2 ($p < 0,0001$) et Calm3 ($p < 0,0001$) chez les rats hypoxiques et normoxiques.

Au niveau de l'aorte abdominale (Fig. 54), les résultats de l'analyse ANOVA 3 facteurs sans mesures répétées (HI, EI, gène) révèle que HI ($p < 0,0001$) exerce un effet significatif global (en diminuant / ou augmentant) sur le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés. En revanche, l'EI induit une diminution significative globale ($p = 0,0197$) de l'expression relative en ARNm de tous les gènes étudiés. Il est important à noter que le test révèle aussi que les effets de HI et EI sont dépendants du gène : interactions significatives : EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x gène ($p < 0,0001$). De même, l'effet de l'un dépend de l'autre : interaction significative EI x HI ($p = 0,0018$) et du gène : interaction significative HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Nous avons réalisé ensuite des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée : (EI x HI) pour chaque gène, (HI x gène) et (EI x gène) pour investiguer l'effet de chaque facteur sur l'expression des gènes d'intérêt. Les résultats des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) montrent que l'HI induit une diminution significative du taux de l'expression de l'ARNm des isoformes Tpm2 ($p = 0,0002$) et Tpm4 ($p = 0,0034$) chez les rats sédentaires, alors qu'elle provoque une augmentation significative du taux de l'ARNm de ces isoformes (Tpm2 et Tpm4) chez les rats entraînés (interaction significative EI x HI : $p = 0,0019$ pour Tpm2, $p = 0,049$ pour Tpm4). En outre, l'HI induit une diminution significative du taux d'expression relatif en ARNm de Tpm3 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés. Il est à signaler que la chute du taux d'ARNm du Tpm3 induite par l'HI est plus importante chez les rats sédentaires que chez les entraînés (interaction significative EI x HI : $p = 0,0003$). En ce qui concerne les isoformes de Calm, 21 jours d'exposition à l'HI induisent une élévation du taux relatif d'ARNm de Calm1 ($p = 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés (interaction non significative HI x EI : $p = 0,096$). En revanche, l'HI n'exerce pas d'effet significatif sur l'expression de Calm2 ($p = 0,138$), ni de Calm3 ($p = 0,489$) (Fig. 54). Quant à l'effet de l'EI, nos résultats montrent qu'il induit une diminution du niveau d'expression en ARNm de Tpm1 ($p < 0,0001$) chez les rats hypoxiques et normoxiques (interaction non significative EI x HI : $p = 0,145$). En outre, l'EI induit une diminution significative du taux d'ARNm de Tpm2 ($p < 0,0001$) et Tpm3 ($p = 0,0001$) chez les rats en normoxie, alors qu'il fait augmenter ce taux chez les rats soumis à l'HI (interaction

significative EI x HI : $p = 0,0019$ pour Tpm2 et $p = 0,0003$ pour Tpm3). De même, l'exercice physique fait diminuer l'expression des gènes Tpm4 ($p = 0,0027$) chez les rats en normoxie et soumis à l'HI. Il reste à noter que l'effet de l'EI sur l'expression de Tpm4 est plus important chez les rats en normoxie que chez les rats hypoxiques (interaction significative EI x HI : $p = 0,651$) (Fig. 54). Quant aux isoformes de la Calm, l'EI fait réduire significativement le niveau d'ARNm de Calm1 ($p < 0,0001$) Calm2 ($p = 0,0001$) et Calm3 ($p < 0,0001$) chez les rats en normoxie et en hypoxie intermittente (interaction non significative EI x HI : $p = 0,095$ pour Calm1, $p = 0,991$ pour Calm2 et $p = 0,324$ pour Calm3) (Fig. 54).

Finalement, au niveau des artères mésentériques (Fig. 55), le test ANOVA 3 facteur sans mesure répétée (EI, HI, gène) montre que l'EI fait diminuer globalement ($p = 0,0109$) le niveau relatif d'ARNm de tous les gènes étudiés. De même l'HI exerce un effet significatif global ($p < 0,0001$) sur l'expression de ces gènes (soit en augmentant soit en diminuant le taux relatif de leur ARNm). Il est important à signaler que l'effet de l'HI dépend du gène et de l'EI, de même l'effet de l'EI dépend du gène : interaction significatives EI x HI ($p < 0,0001$), EI x gène ($p < 0,0001$), HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Pour examiner l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression ARNm des isoformes de Tpm et de Calm, nous avons réalisé des ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) pour chaque gène. Les résultats de ces tests révèlent que l'HI induit une diminution du niveau d'ARNm relatif des gènes codant pour Tpm1 ($p = 0,028$), Tpm2 ($p = 0,050$), et Tpm4 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires (Fig. 55). En revanche, en présence de l'EI, l'HI induit une élévation significative du taux d'ARNm de ces mêmes gènes (Tpm1, Tpm2 et Tpm4) chez les rats entraînés. Ceci étant dû à l'interaction significative des effets HI x EI : $p < 0,0001$ pour Tpm1, $p < 0,0001$ pour Tpm2, et $p = 0,0005$ pour Tpm4. Quant au Tpm3, l'HI induit une diminution significative ($p = 0,0002$) de son taux d'ARNm chez les rats sédentaires et entraînés avec un effet plus important de HI chez les rats entraînés (interaction HI x EI : $p = 0,0095$). En ce qui concerne les isoformes de Calm, on remarque que l'HI fait augmenter le taux d'ARNm du gène Calm1 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés. Il est à noter que l'augmentation du taux d'ARNm de Calm1 induit par l'HI est plus important chez les rats entraînés que chez les sédentaires (interaction significative EI x HI : $p = 0,0008$). En revanche l'élévation du taux d'ARNm de Calm 2 ($p = 0,356$) et Calm3 ($p = 0,317$) induite par l'HI n'est pas significative (Fig. 55). D'autre part, comme l'effet de l'EI est dépendant de l'HI et du gène, on trouve que

l'exercice physique intensif induit une diminution significative du taux d'ARNm relatif de Tpm3 ($p < 0,0001$), Tpm4 ($p < 0,0001$), Calm1 ($p < 0,0001$), Calm2 ($p = 0,0001$) et Calm3 ($p < 0,0001$) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI (Fig. 55), mais d'une façon plus importante chez les rats normoxiques par rapport au rats HI (Fig. 55). De même, l'EI fait baisser le taux d'ARNm relatif des Tpm1 ($p = 0,0008$) Tpm2 ($p = 0,0019$), chez les rats normoxiques alors qu'il le fait augmenter chez les rats soumis à l'HI (Fig. 55).

Aorte thoracique

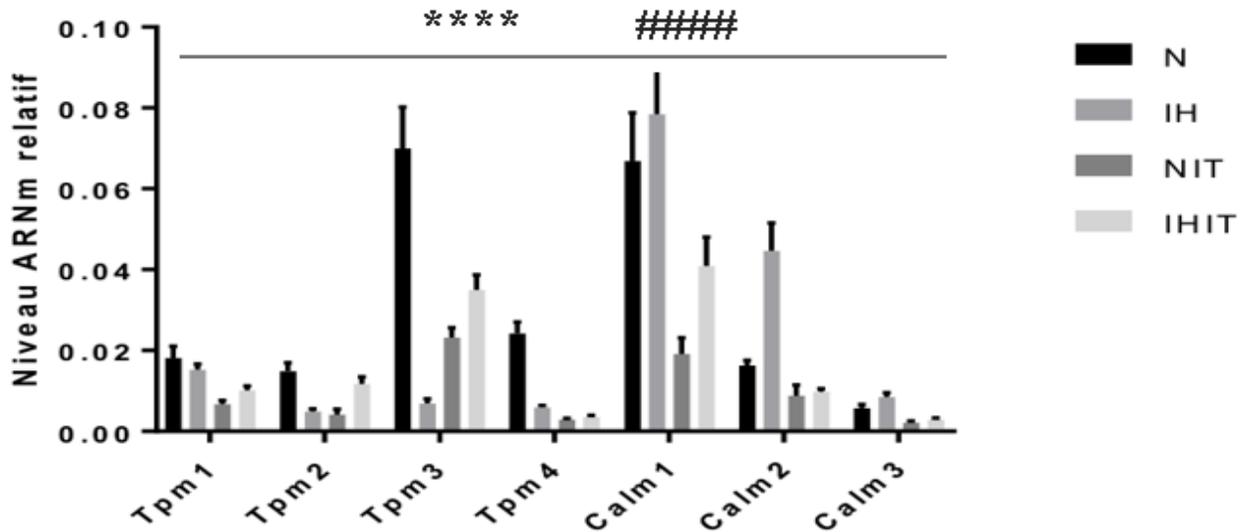


Figure 53 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans l'aorte thoracique extraite des quatre groupes de rats étudiés; N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau d'ARNm relatif des gènes d'intérêt (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Aorte abdominale

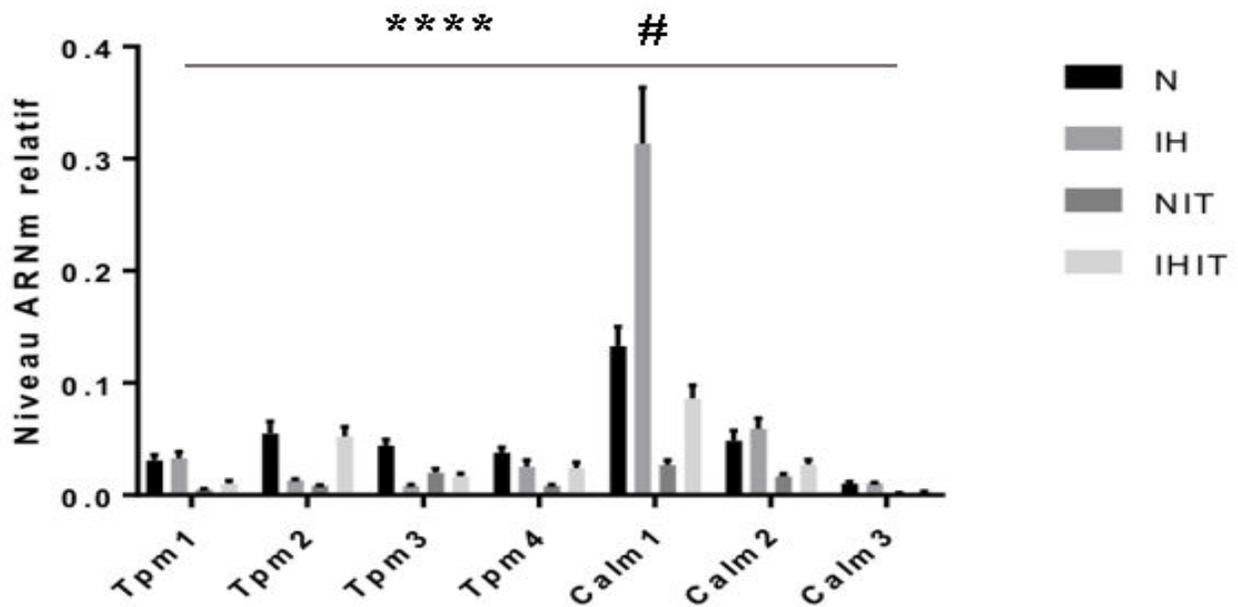


Figure 54 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans l'aorte abdominale extraite des quatre groupes de rats étudiés; N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau d'ARNm relatif des gènes d'intérêt (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par # pour $p \leq 0,05$.

Artère mésentérique

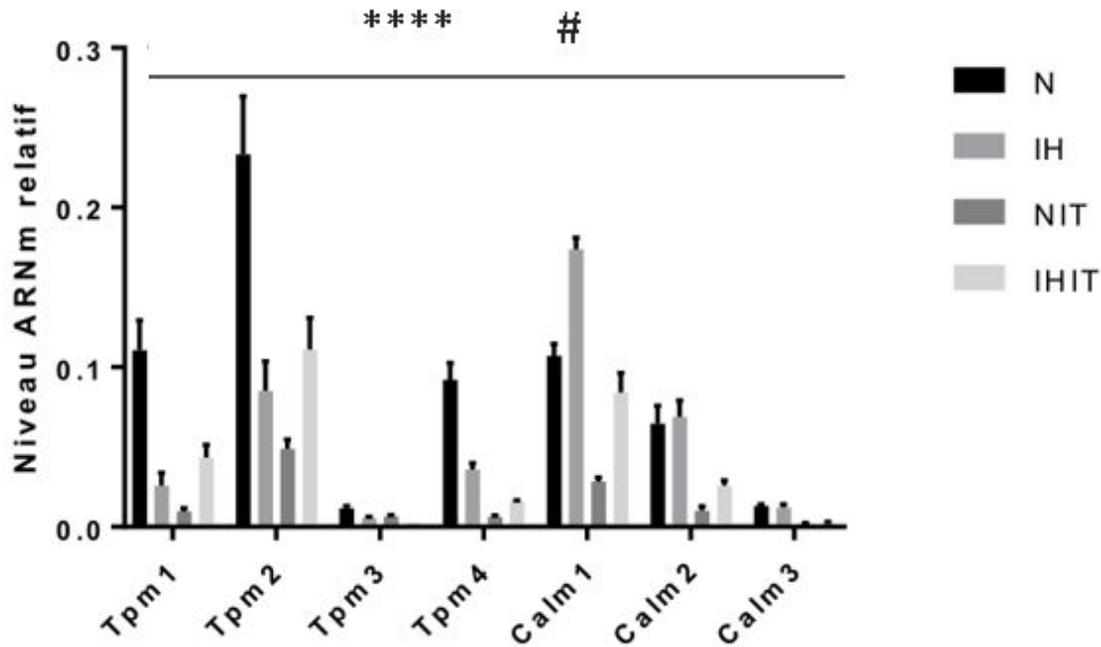


Figure 55 : Variation d'expression de 7 gènes codant les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) dans les artères mésentériques extraites des quatre groupes de rats étudiés N : rats sédentaires en normoxie, IH : rats sédentaires soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats en normoxie soumis à l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à l'entraînement physique intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau d'ARNm relatif des gènes d'intérêt (Tpm 1, Tpm 2, Tpm 3, Tpm 4, Calm 1, Calm 2 et Calm 3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par # pour $p \leq 0,05$.

Interprétation- hypothèse :

Les résultats de Q-PCR ci-dessus, révèlent que l'HI induit une augmentation de l'ARNm des gènes codant aux protéines favorisant la contraction musculaire vasculaire (Tpm 1-4) alors que l'EI favorise l'expression de l'ARNm des gènes codant à des protéines régulatrices des Tpm et ayant la capacité de favoriser la vasodilatation (Calm 1-3).

L'effet de l'HI, conséquence majeure du SAOS, est largement étudié au niveau du muscle cardiaque. Et malgré l'évidence de son effet au niveau des muscles squelettiques, rares sont les études qui se sont intéressées par l'effet de l'HI dans le cadre du SAOS sur la contractilité des muscles squelettiques. Pour cela, nous avons étudié par la suite, l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des mêmes canaux, récepteurs et pompes calciques au niveau des muscles squelettiques des rats.

V.5.3. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant pour les canaux et les pompes calciques au niveau des muscles squelettiques

Dans la deuxième partie de nos expériences en Q-PCR, nous avons voulu choisir un autre type de muscle directement sollicité lors de l'entraînement des rats : le muscle squelettique. Nous avons ainsi prélevé différents muscles squelettiques de la partie postérieure des pattes des rats : le muscle gastrocnémien, le muscle soléaire et le muscle plantaire. Nous avons ainsi examiné les niveaux d'expression des mêmes gènes responsables de la signalisation de calcium (étudiés au niveau des muscles lisses vasculaires) dans ces nouveaux tissus. Nos résultats montrent que les gènes *Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*, *Trpv4*, *Atp2a1*, *Atp2a2* et *Itrp1* codant respectivement pour les protéines RyR1, RyR2, RyR3, TRPV4, SERCA1, SERCA2 et IP3R1 sont bien exprimés dans les 3 muscles squelettiques étudiés : le muscle gastrocnémien (Fig. 56), le muscle plantaire (Fig. 57) et le muscle soléaire (Fig. 58). En revanche, le gène *Itrp3* codant pour la protéine IP3R3 n'est pas exprimé dans ces tissus (Fig. 56, 57, 58). Comme dans les tissus vasculaires, nous avons réalisé au début, un test ANOVA 2 facteurs (gène, tissu) dans le but de comparer le niveau d'expression des gènes dans les groupes de rats contrôles (N). Les résultats de ce test révèlent que le gène ($p < 0,0001$) et le tissu étudié ($p < 0,0001$) affectent globalement le taux d'ARNm des gènes étudiés. Il est à noter que les effets de ces 2 paramètres (gène et tissu) sont dépendants l'un de l'autre : interaction significative (gène x tissu : $p < 0,0001$). Donc, nous avons réalisé par la suite des tests ANOVA 1 facteur (tissu) sur chacun des gènes d'intérêt. En effet, les résultats révèlent que le niveau d'expression relatif des ARNm des gènes codant pour

les pompes SERCA (Atp2a1 et Atp2a2 prises ensemble), est le plus important par rapport aux autres gènes au niveau du muscle gastrocnémien ($p = 0,0002$) (Fig. 56), du muscle plantaire ($p = 0,0006$) (Fig. 57) et du muscle soléaire ($p = 0,0005$) (Fig. 58). Il est à noter que le taux d'ARNm de Atp2a2 codant pour SERCA2 est supérieure au taux d'ARNm d'Atp2a1 codant pour SERCA1 dans le muscle gastrocnémien ($p = 0,05$), dans le muscle plantaire ($p = 0,009$) et soléaire ($p = 0,005$). En outre, et d'une manière intéressante, le niveau d'expression de Ryr3 en ARNm vient au deuxième lieu (après les Atp2a1 et Atp2a2) parmi les gènes les plus exprimés dans les groupes de rats contrôle (N) dans le muscle gastrocnémien ($p = 0,0013$) (Fig. 56), dans le muscle plantaire ($p = 0,003$) (Fig. 57) et dans le muscle soléaire ($p = 0,0009$) (Fig. 58). Ensuite, pour évaluer l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression de ces gènes, nous avons réalisé des tests ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) dans chacun des muscles étudiés (gastrocnémien, plantaire, soléaire).

En premier lieu, au niveau du muscle gastrocnémien (Fig. 56), les résultats du test ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (EI, HI, gène), révèlent que l'HI fait augmenter globalement ($p < 0,0001$) le taux d'ARNm de tous les gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itp1) chez les rats sédentaires et chez les rats entraînés. De même, l'EI lui aussi induit une augmentation significative globale ($p < 0,0001$) du taux d'ARNm de ces gènes chez les rats en normoxie aussi bien que chez les rats soumis à l'HI. Il est important de signaler que l'effet de l'HI est plus important chez les rats sédentaires par rapport aux rats entraînés ; ceci étant dû à une interaction significative EI x HI ($p < 0,0001$). En outre, les effets de EI, HI sont dépendants aussi des gènes : interactions significatives : HI x gène ($p < 0,0001$), EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x EI x gène ($p < 0,0001$).

Ceci nous a permis de faire des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée pour chaque 2 facteurs séparément (HI x gène), (EI x gène) et (EI, HI). Les résultats des tests (HI x EI) réalisés pour chaque gène, révèlent que l'HI induit une augmentation significative de l'expression de tous les gènes : Ryr1 ($p < 0,0001$), Ryr2 ($p = 0,0001$), Ryr3 ($p = 0,0002$), Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itp1 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés. De même, l'EI fait augmenter le taux d'expression relatif des ARNm de tous les gènes : Ryr1, Ryr2, Ryr3 ($p = 0,0001$), Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 ($p < 0,0001$), et Itp1 ($p = 0,0003$) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI (Fig. 56). De plus, les tests ANOVA 1 facteurs (HI), révèle qu'au niveau du muscle gastrocnémien, le gène Atp2a2 est le plus sensible à l'effet de l'HI ($p = 0,0032$) suivi par

Atp2a1 ($p = 0,0025$) (Fig. 56). De plus, le résultat du test ANOVA 1 facteur (EI), montre que le gène Trpv4 est celui qui répond le plus à l'EI en terme d'expression d'ARNm ($p = 0,0017$) suivi par Ryr2 ($p = 0,0022$) au niveau du muscle gastrocnémien (Fig. 56).

Ensuite, au niveau du muscle plantaire (Fig. 57), l'analyse ANOVA 3 facteurs (HI, EI, gène) révèle que l'HI induit une augmentation significative globale ($p < 0,0001$) des niveaux de l'ARNm de tous les gènes étudiés (effet significatif global du gène : $p < 0,0001$). De même, l'EI induit une augmentation globale ($p < 0,0001$) des taux d'ARNm des gènes étudiés. Il est à noter que l'HI, l'EI et le gène ont des effets croisés : interactions significatives : HI x EI ($p < 0,0001$), HI x gène ($p < 0,0001$). En revanche, l'effet de l'EI est le même quel que soit le gène : interaction non significative : EI x gène ($p = 0,562$) et HI x EI x gène ($p = 0,324$). Nous avons réalisé par la suite, des tests ANOVA 2 facteurs pour : (EI, HI) et (HI, gène). Le test ANOVA 2 facteurs (EI, HI) réalisé pour chacun des gènes d'intérêt, révèle que l'HI provoque une élévation significative des taux d'ARNm de tous les gènes étudiés : Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4 ($p = 0,0001$), Atp2a1, Atp2a2, et Itpr1 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et entraînés. En revanche, l'augmentation du taux d'expression relatif des ARNm induite par EI n'est significative que pour les gènes : Ryr3 ($p < 0,0001$), Atp2a1 ($p < 0,0001$), Atp2a2 ($p < 0,0001$), Itpr3 ($p = 0,0008$) chez les rats normoxiques et les rats soumis à l'HI. En revanche, l'élévation du taux d'ARNm par EI n'est pas significative pour les gènes Ryr1 ($p = 0,232$), Ryr2 ($p = 0,820$), et Trpv4 ($p = 0,271$). De plus, le test ANOVA 1 facteur (HI), révèle qu'au niveau du muscle plantaire, le gène Ryr1 est le plus sensible à l'effet de l'HI ($p = 0,0004$) suivi par Atp2a1 ($p = 0,0046$) puis Atp2a2 ($p = 0,0032$) (Fig. 57).

Finalement, au niveau du muscle soléaire (Fig. 58), le test ANOVA 3 facteurs (HI, EI, gène) montre que l'exposition à l'HI induit une élévation significative globale ($p < 0,0001$) des taux relatifs de l'ARNm des différents gènes (effet significatif global du gène : $p < 0,0001$). De la même manière, l'EI induit une augmentation globale ($p < 0,0001$) de l'expression en ARNm des gènes étudiés. Ce test (ANOVA 3 facteurs) révèle aussi que les effets de l'HI, l'EI et du gène sont croisés : interactions significatives : HI x EI ($p < 0,0001$), HI x gène ($p < 0,0001$), EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Pour mieux savoir l'effet de chacun de ces facteurs sur les gènes, nous avons fait des tests ANOVA 2 facteurs (pour chaque 2 facteurs séparément) : (EI, HI), (HI, gène), et (EI, gène). Les résultats des tests ANOVA 2 facteurs (EI, HI) réalisés pour chaque gène, révèlent que 21 jours d'exposition à l'HI font augmenter significativement

l'expression de tous les gènes étudiés : Ryr1, Ryr2, Ryr3 ($p < 0,0001$), Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itpr1 ($p = 0,0001$), chez les rats sédentaires et soumis à l'EI. De même, l'EI induit une augmentation du taux d'expression relatif des ARNm de tous les gènes : Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Itpr1 ($p < 0,0001$), Atp2a1, Atp2a2 ($p = 0,0001$) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI. De plus, l'interaction significative entre l'effet de l'HI et l'EI ($p < 0,0001$), nous laisse constater que l'augmentation du taux relatif des ARNm induit par l'HI est plus remarquable chez les rats sédentaires par rapport aux rats entraînés (Fig. 58). D'autre part, le test ANOVA 1 facteur (HI) réalisé sur chaque gène, révèle que dans ce muscle soléaire, le gène Atp2a2 est le plus sensibles à l'effet de l'HI ($p = 0,0035$) suivi par l'Itpr1 ($p = 0,021$) (Fig. 58). En outre, le résultat du test ANOVA 1 facteur (EI) réalisé sur chaque gène, montre que le gène Trpv4 répond le plus à l'effet de l'EI ($p = 0,0006$), suivi par le Ryr1 ($p = 0,0008$) (Fig. 58).

Muscle gastrocnémien

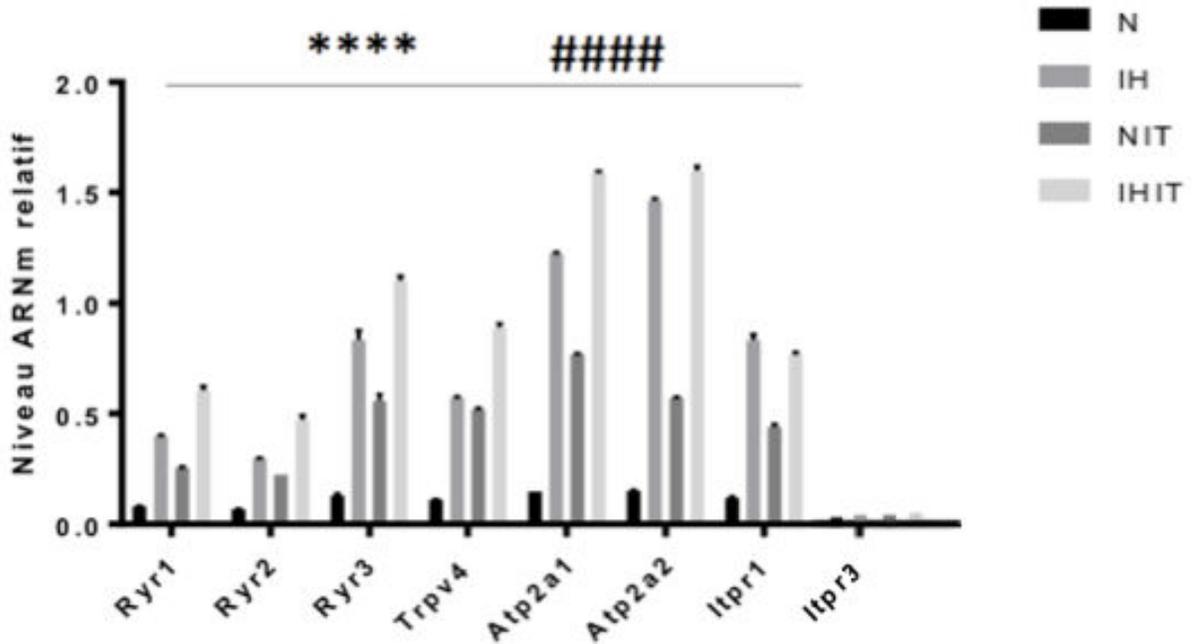


Figure 56 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle gastrocnémien extrait des 4 groupes de rats: N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à un entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un **** pour $p < 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p < 0,0001$.

Muscle plantaire

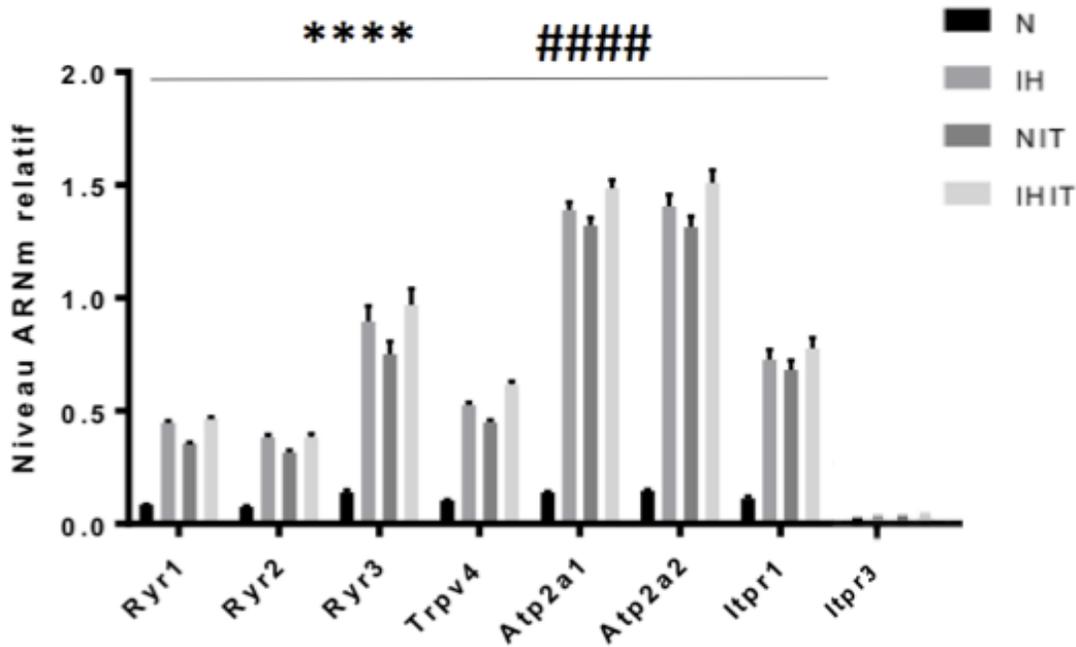


Figure 57 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Itp1 et Itp3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle plantaire extrait des 4 groupes de rats: N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à un entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Itp1 et Itp3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un **** pour $p < 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensive (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par #### pour $p < 0,0001$.

Muscle soléaire

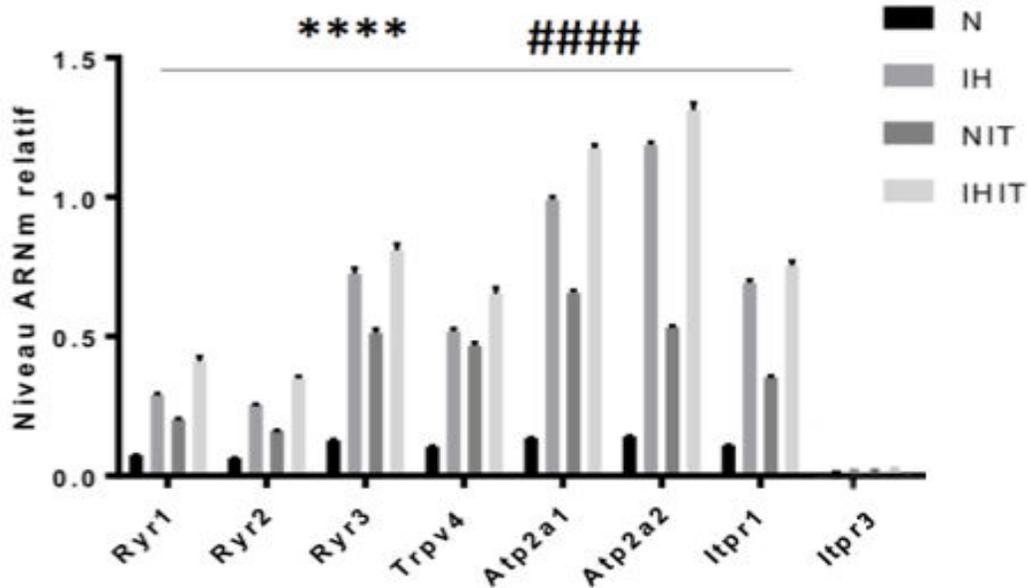


Figure 58 : Variation de l'expression des gènes (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) codant pour les récepteurs, canaux et pompes à calcium dans le muscle soléaire extrait des 4 groupes de rats : N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente et à un entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Iptr1 et Iptr3) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un **** pour $p < 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p < 0,0001$.

Après les études de l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant pour les protéines responsables de la gestion du calcium dans les muscles squelettiques, nous avons étudié les effets de ces 2 paramètres sur le complexe du couplage excitation-contraction dans ces mêmes tissus. Pour cela, nous avons évalué le niveau d'expression de la troponine et la tropomyosine et de leur isoformes au niveau des muscles gastrocnémien, soléaire et plantaire.

V.5.4. Effet de l'HI et de l'EI sur les gènes codant pour les isoformes du complexe troponine-tropomyosine au niveau des muscles squelettiques

Plusieurs protéines sont impliquées dans la régulation du couplage excitation-contraction au niveau des muscles squelettiques. Les changements observés au niveau des acteurs de la voie de signalisation calcique des muscles squelettiques, qui jouent un rôle essentiel dans le phénomène de contraction musculaire, vont potentiellement affecter les protéines actrices dans le couplage excitation-contraction. Pour tester cette hypothèse nous avons réalisé des Q-PCR sur les mêmes muscles squelettiques (gastrocnémien, plantaire et soléaire) pour évaluer l'expression en ARNm des gènes codant à la troponine et à la tropomyosine et leurs isoformes. Les résultats de cette série de Q-PCR montrent que les deux isoformes de la troponine (Tnnt1 et Tnnt3), aussi bien que les 4 isoformes de la Tropomyosine (Tpm 1-4) sont bien exprimés dans le muscle gastrocnémien (Fig. 59), le muscle plantaire (Fig. 60) et le muscle soléaire (Fig. 61). Tout d'abord, nous avons évalué l'effet du tissu sur l'expression de l'ARNm de ces gènes, en comparant le niveau d'expression des gènes codant pour deux isoformes de la troponine (Tnnt1 et Tnnt3), et des 4 isoformes de la tropomyosine (Tpm1-4) chez les groupes contrôle (N) dans les trois tissus vasculaires étudiés. Pour se faire, nous avons fait un test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (gène, tissu), qui a révélé une expression en ARNm de ces gènes qui est tissu-dépendant (effet significatif du tissu : $p = 0,001$) et gène -dépendant (effet significatif du gène : $p = 0,005$). De plus l'effet de ces deux facteurs est croisé : interaction significative gène x tissu ($p = 0,03$), pour cela nous avons réalisé des tests ANOVA 1 facteur (tissu) pour chaque gène. En effet, ces

tests révèlent qu'au niveau du muscle gastrocnémien, l'isoforme 1 de la tropomyosine (Tpm1) ($p = 0,0008$) et l'isoforme 1 de la troponine (Tnnt1) ($p = 0,0014$) ont les taux d'ARNm relatif les plus élevés (Fig. 59). De plus, au niveau du muscle plantaire, l'isoforme 1 de la troponine (Tnnt1) ($p = 0,027$) suivi par l'isoforme 3 de la de la troponine (Tnnt3) ($p = 0,011$) (Fig. 60). Pareillement, au niveau du muscle soléaire, le Tpm1 ($p = 0,045$) et le Tnnt3 ($p = 0,005$) sont les deux isoformes les plus exprimés en ARNm (Fig. 61).

Par la suite, nous avons évalué l'effet de l'HI, de l'EI et du gène sur l'expression relatif en ARNm des gènes étudiés, par des tests ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) dans chaque tissu vasculaire séparément. Tout d'abord, dans le muscle gastrocnémien (Fig. 59), l'analyse ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) montre que HI ($p < 0,0001$) et EI ($p < 0,0001$) exercent un effet significatif global (en diminuant / ou augmentant) sur le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés. En revanche, ces effets (de HI et EI) sont dépendants du gène : interactions significatives : EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x gène ($p < 0,0001$). De même, l'effet de l'un dépendant de l'autre : interaction significative EI x HI ($p < 0,0001$) et du gène : interaction significative HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Dans le but de décrire l'effet de chaque facteur sur l'expression des gènes d'intérêt, nous avons fait ensuite des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée : (EI x HI) pour chaque gène, (HI x gène) et (EI x gène). En premier lieu, dans le muscle gastrocnémien (Fig. 59), les résultats des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) révèlent que 21 d'exposition à l'HI induisent une augmentation significative du taux de l'expression de l'ARNm des isoformes Tnnt1 ($p < 0,0001$), Tnnt3 ($p = 0,024$) et Tpm1 ($p = 0,0087$) chez les rats sédentaires et chez les rats entraînés : interaction non significative EI x HI : ($p = 0,132$) pour Tnnt1 et ($p = 0,556$) pour Tnnt3 et ($p = 0,948$) pour Tpm1. Quant aux autres isoformes de Tpm, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée révèlent que l'exposition à l'HI induit une diminution significative du taux d'ARNm relatif des isoformes Tpm3 ($p = 0,031$) et Tpm4 ($p = 0,002$) chez les rats sédentaires, alors qu'elle fait augmenter ce taux chez les rats entraînés (interaction significative EI x HI : $p < 0,0001$ pour Tpm3, et $p = 0,018$ pour Tpm4). Quant à la Tpm2, l'HI induit une diminution significative du taux de son ARNm ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et les rats entraînés (Fig. 59). Il reste à noter que, du à l'interaction significative entre l'EI x HI sur l'expression de Tpm2 ($p = 0,0003$), on remarque que l'effet de l'HI est plus important chez les rats entraînés par rapport au rats sédentaires (Fig. 59). Quant à lui, l'EI induit une diminution significative du taux d'ARNm de

l'isoforme Tnnt1 ($p < 0,0001$), Tnnt3 ($p < 0,0001$), Tpm1 ($p < 0,0001$) et Tpm4 ($p < 0,0001$) chez les rats normoxiques et soumis à l'HI. En revanche, l'EI induit une augmentation du taux d'ARNm relatif de l'isoforme Tpm2 ($p = 0,0001$) chez les rats en normoxie et chez les rats soumis à l'HI (Fig. 59). Du fait de l'interaction significative de EI x HI sur le gène Tpm2 ($p = 0,0003$), on trouve que l'effet de l'EI est plus important chez les rats normoxiques (Fig. 59). Finalement, quant au Tpm3, l'EI fait diminuer le taux d'expression relatif de l'ARNm chez les rats normoxiques alors qu'il fait augmenter ce taux chez les rats soumis à l'HI (Fig. 59).

Ensuite, dans le muscle plantaire (Fig. 60), les résultats du test ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) montre que HI ($p < 0,0001$) exerce un effet significatif global (en diminuant / ou augmentant) sur le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés. De plus, l'EI induit une diminution significative globale du taux d'ARNm relatif de tous ces gènes ($p < 0,0001$). En revanche, ces effets (de HI et EI) sont dépendants du gène : interactions significatives : EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x gène ($p < 0,0001$), dépendants l'un de l'autre : interaction significative EI x HI ($p = 0,049$) et du gène : HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Pour évaluer l'effet de chaque facteur sur l'expression des gènes d'intérêt, nous avons fait ensuite des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée : (EI x HI) pour chaque gène, (HI x gène) et (EI x gène). Les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) révèlent que 21 d'exposition à l'HI induisent une augmentation significative du taux de l'expression de l'ARNm des isoformes Tnnt1 ($p < 0,0001$), Tnnt3 ($p = 0,033$), Tpm1 et Tpm2 ($p < 0,0001$) chez les rats sédentaires et chez les rats entraînés. Il est à noter que l'interaction est non significative entre EI x HI : ($p = 0,123$) pour Tnnt1 et ($p = 0,710$) pour Tnnt3 et ($p = 0,948$) pour cela on remarque que l'effet HI est pareil en présence ou non de l'EI. En revanche, l'interaction (EI x HI) est significative pour Tpm1 ($p < 0,0001$) et Tpm2 ($p < 0,0001$), ce qui rend l'effet de l'HI plus remarquable sur les rats sédentaires par rapport aux rats soumis à l'HI (Fig. 59). Quant aux autres isoformes de Tpm, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée révèlent que l'exposition à l'HI fait diminuer significativement le niveau d'ARNm relatif des isoformes Tpm3 ($p = 0,031$) et Tpm4 ($p = 0,002$) chez les rats sédentaires et chez les rats entraînés (interaction non significative EI x HI : $p = 0,125$ pour Tpm3, et $p = 0,095$ pour Tpm4) (Fig. 60).

En ce qui concerne l'EI, les tests ANOVA 2 facteurs (EI, HI) sans mesure répétée pour chaque gène révèlent que l'exercice physique intensif fait diminuer significativement le taux d'ARNm

relatif de tous les gènes Tnnt1 ($p = 0,05$) Tnnt3 ($p < 0,0001$), Tpm1 ($p < 0,0001$), Tpm2 ($p = 0,0001$), Tpm3 ($p < 0,0001$) et Tpm4 ($p = 0,0001$) (Fig. 60).

Enfin, au niveau du muscle soléaire (Fig. 61), le test ANOVA 3 facteurs sans mesure répétée (HI, EI, gène) montre que HI ($p < 0,0001$) et EI ($p = 0,0001$) exercent un effet significatif global (en diminuant / ou augmentant) sur le taux relatif d'ARNm des gènes étudiés. Ces effets (de HI et EI) sont dépendants du gène : interactions significatives : EI x gène ($p < 0,0001$) et HI x gène ($p < 0,0001$). De même, l'effet de l'un dépendant de l'autre : interaction significative EI x HI ($p = 0,01$) et du gène : interaction significative HI x EI x gène ($p < 0,0001$). Des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) pour chaque gène, (HI x gène) et (EI x gène) sont ensuite réalisés. Les résultats de ces tests révèlent que 21 d'exposition à l'HI induisent une augmentation significative du taux de l'expression de l'ARNm des isoformes Tnnt3 ($p = 0,042$), et Tpm2 ($p = 0,0006$) chez les rats sédentaires et chez les rats entraînés : interaction non significative EI x HI : ($p = 0,506$) pour Tnnt3 et ($p = 0,098$) pour Tpm2. De plus, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI, HI) montrent que l'HI induit une diminution significative du taux d'ARNm relatif des isoformes Tpm1 ($p = 0,05$) et Tpm3 ($p = 0,0001$) chez les rats sédentaires, alors qu'elle fait augmenter ce taux chez les rats entraînés (interaction significative EI x HI : $p = 0,02$ pour Tpm1, et $p < 0,0001$ pour Tpm3). Quant à la Tnnt1, l'HI induit une augmentation significative du taux de son ARNm ($p = 0,01$) chez les rats sédentaires, alors qu'elle fait diminuer ce taux chez les rats entraînés (interaction significative EI x HI : $p < 0,0001$) (Fig. 61). Il reste à noter que l'effet de l'HI n'est pas significative sur le Tpm4 ($p = 0,08$) (Fig. 61).

En ce qui concerne l'effet de l'EI, les résultats des tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (EI x HI) révèlent que l'exercice intensif induit une diminution significative du taux d'ARNm de l'isoforme Tnnt3 ($p = 0,0001$), Tpm1 ($p < 0,0001$), Tpm2 ($p = 0,0001$) et Tpm4 ($p = 0,0003$) chez les rats normoxiques et soumis à l'HI. En revanche, l'EI induit une augmentation du taux d'ARNm relatif de l'isoforme Tnnt1 ($p = 0,012$) chez les rats en normoxie, alors qu'il fait diminuer le taux d'ARNm relatif de Tnnt1 chez les rats soumis à l'HI (Fig. 61). Enfin, quant au Tpm3, l'EI fait diminuer le taux d'expression relatif de l'ARNm chez les rats normoxiques alors qu'il fait augmenter ce taux chez les rats soumis à l'HI ($p = 0,0001$) (Fig. 61).

Muscle gastrocnémien

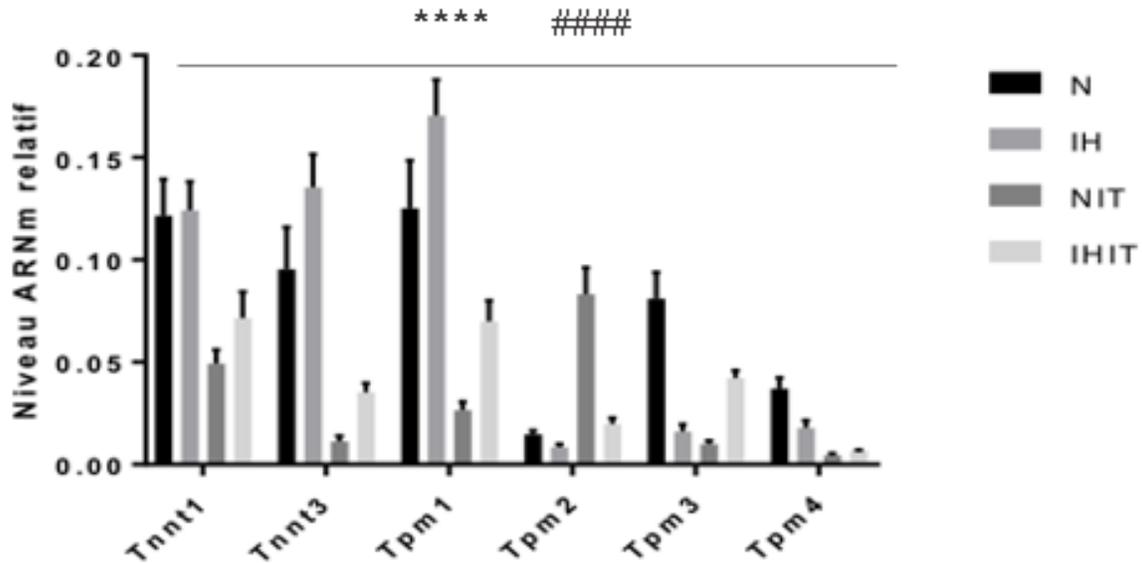


Figure 59 : Variation de l'expression de 6 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle gastrocnémien des 4 groupes de rats: N: rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH: rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec de l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Muscle Plantaire

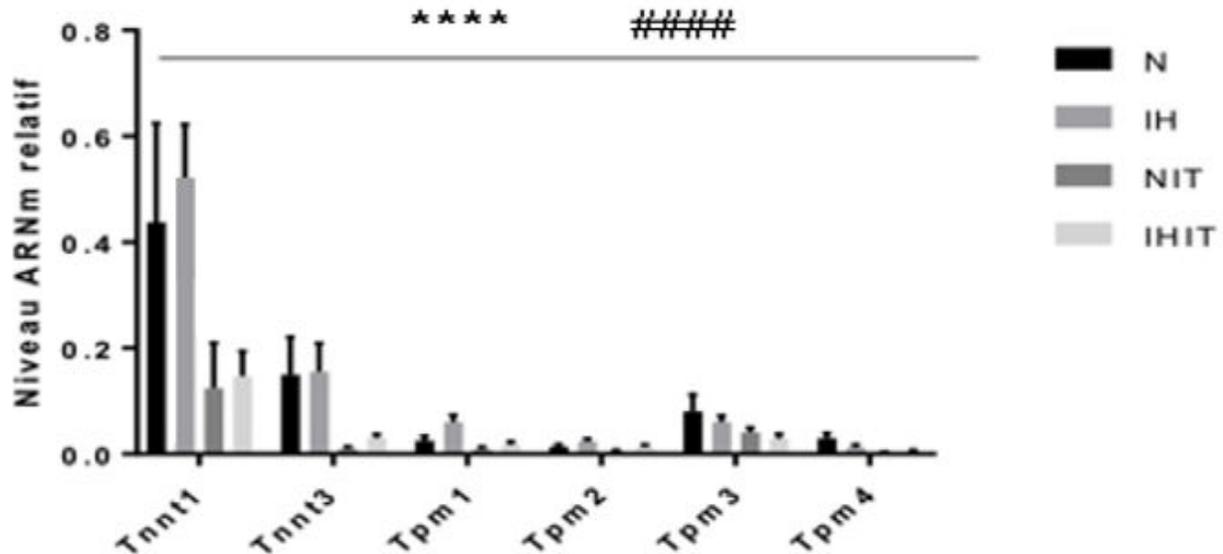


Figure 60 : Variation de l'expression de 6 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle plantaire des 4 groupes de rats: N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Muscle soléaire

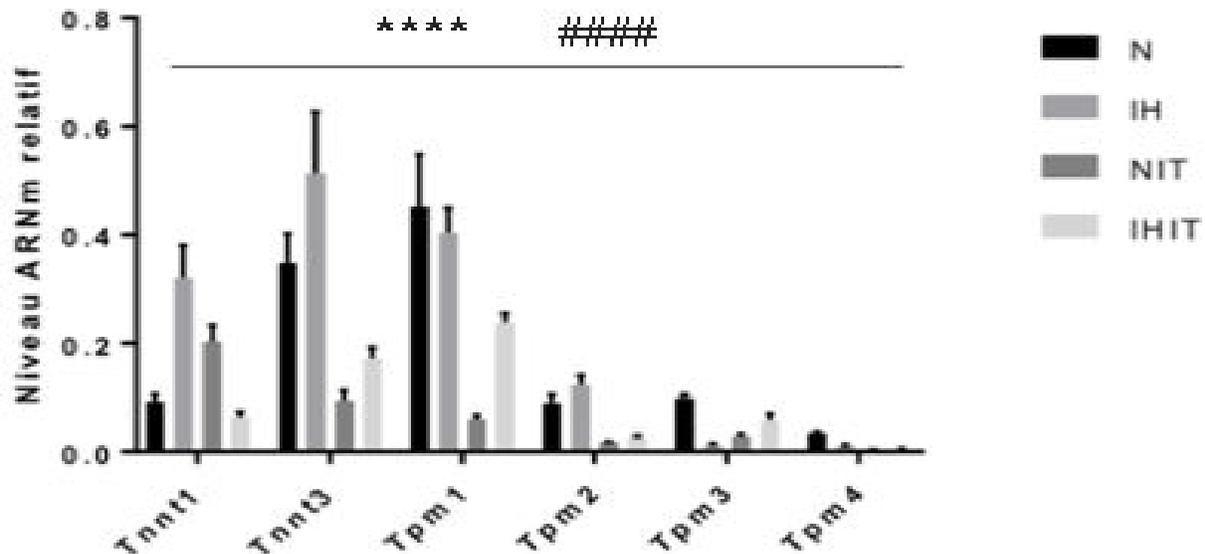


Figure 61 : Variation de l'expression de 5 gènes (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3 et Tpm4) codant pour les protéines troponine et tropomyosine, responsables de la régulation du couplage excitation-contraction, dans le muscle soléaire des 4 groupes de rats : N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec de l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le niveau relatif d'ARNm des gènes d'intérêt (Tnnt1, Tnnt3, Tpm1, Tpm2, Tpm3, Tpm4) par rapport à l'expression moyenne de trois gènes de référence : Actb, Tbp et Ppia. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par un * pour $p \leq 0,05$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ##### pour $p < 0,0001$.

Interprétation- hypothèse :

En se fondant sur les résultats de nos expériences de signalisation calcique et de PCR en temps réel, ainsi que sur des données des études précédentes, nous avons constaté que les isoformes des RyR (RyR1, RyR2 et RyR3) et le TRPV4 sont impliqués dans les changements moléculaires de la voie de signalisation calciques qui aboutissent aux complications musculaires (cardiovasculaires en particulier) (Sayed A. et coll., 2010) (Antilla K. et coll., 2006) (Antilla K. et coll., 2008) (Dahan D. et coll., 2012). Pour cela, nous avons étudié l'expression des protéines

correspondant à ces 4 gènes, par la technique du western blot, dans les artères étudiées précédemment. Nous avons choisi un canal-recepteur du RS : RyR (et ses isoformes) et un autre de la membrane plasmique : TRPV4

V.6. Effet de l'HI et de l'EI sur l'expression protéique des canaux-récepteurs sensibles au calcium dans les tissus vasculaires

Le niveau d'expression relatif des protéines d'intérêt (RyR 1-3 et TRPV4), étudié par Western blot au niveau de l'aorte thoracique, de l'aorte abdominale et des artères mésentériques, a été calculé par rapport au niveau d'expression de la protéine bêta-actine, prise comme référence. Pour chaque protéine d'intérêt, son niveau d'expression relatif est considéré comme égal à 1 dans le groupe N (non-soumis à l'EI ni à l'HI), considéré comme le groupe témoin. Tout d'abord, au niveau de l'aorte thoracique, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesures répétée (HI, EI) réalisés pour chaque gène, révèlent que l'HI induit une augmentation globale du niveau de l'expression protéique de RyR2 ($p < 0,0001$) (Fig. 62 B), de RyR3 ($p = 0,0032$) (Fig. 62 C) et de TRPV4 ($p = 0,0508$) (Fig. 62 D) chez les rats sédentaires et entraînés pris ensemble. Cet effet est absent pour RyR1 ($p = 0,1362$) (Fig. 62 A).

Concernant l'EI, ce dernier fait augmenter globalement le niveau d'expression protéique de RyR1 ($p = 0,0291$) (Fig. 62 A) de RyR2 ($p < 0,0001$) (Fig. 62 B) et de TRPV4 ($p = 0,0342$) (Fig. 62 D), mais pas de RyR3 ($p = 0,254$) (Fig. 62 C), chez les rats hypoxiques et normoxiques pris ensemble.

De plus, il est à noter que l'effet de l'HI est indépendant de l'EI (interaction EI x HI : $p = 0,223$).

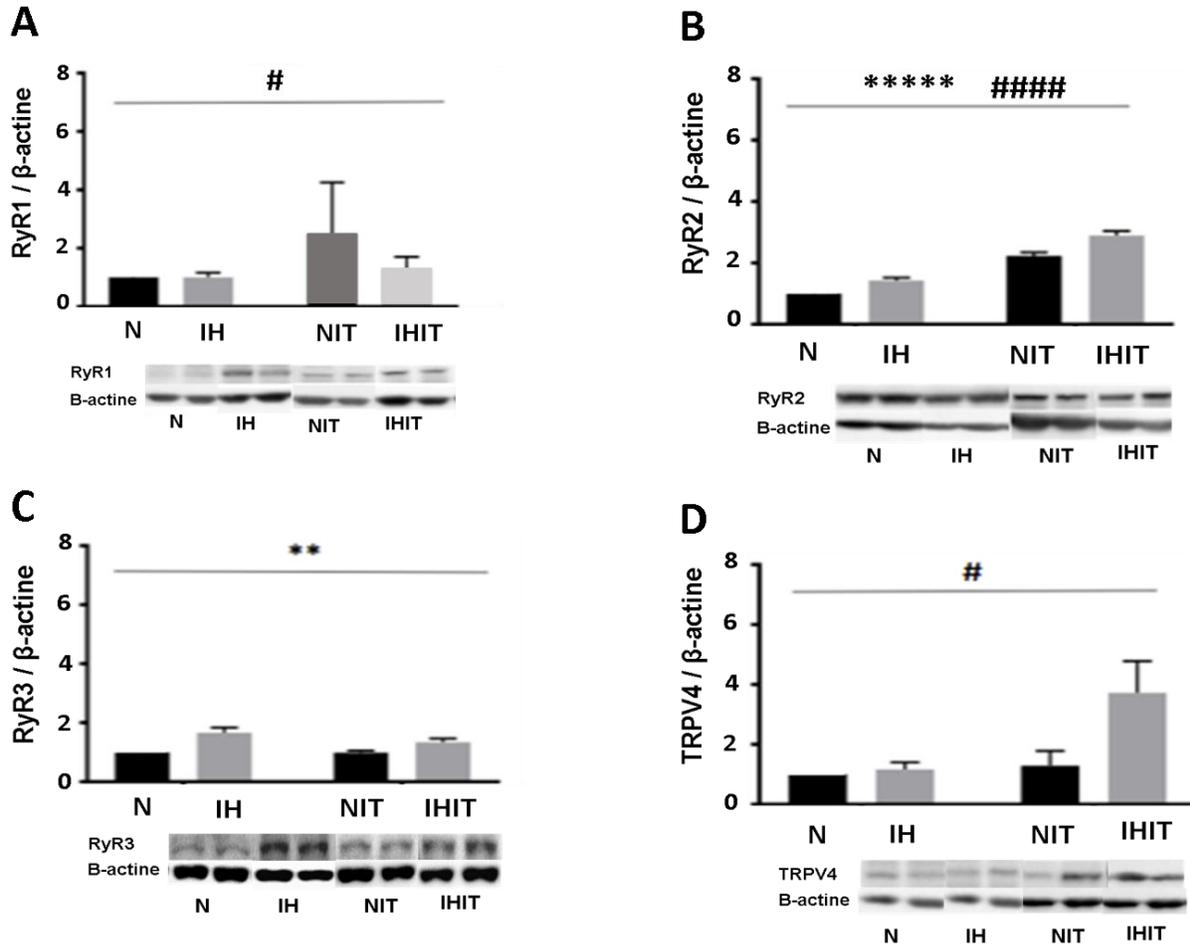


Figure 62 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans l'aorte thoracique des différents groupes de rats étudiés. N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le taux relatif des protéines d'intérêt (RyR1-3 et TRPV4) par rapport à l'expression de la bêta-actine prise comme gène de référence. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par ** pour $p \leq 0,01$ et par **** pour $p \leq 0,0001$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par # pour $p \leq 0,05$ et par ##### pour $p \leq 0,0001$.

Quant à l'aorte abdominale, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesures répétée (HI, EI) faits pour chacun des gènes, montrent que l'HI n'a pas d'effet global sur le niveau d'expression protéique des 4 canaux récepteurs étudiés RyR 1, RyR2, Ryr3 et TRPV4 (Fig. 63 A-D). En revanche, l'EI induit une diminution significative globale du niveau de l'expression protéique du RyR1 ($p = 0,0001$) (Fig. 63 A), du RyR2 ($p = 0,0093$) (Fig. 63 B), du RyR3 ($p < 0,0001$) (Fig. 63 C) et de

TRPV4 ($p = 0,0001$) (Fig. 63 D) chez les rats en normoxie et les rats soumis à l'HI. Il est à signaler que l'effet de l'EI est indépendant de l'HI (interaction HI x EI : $p = 0,654$).

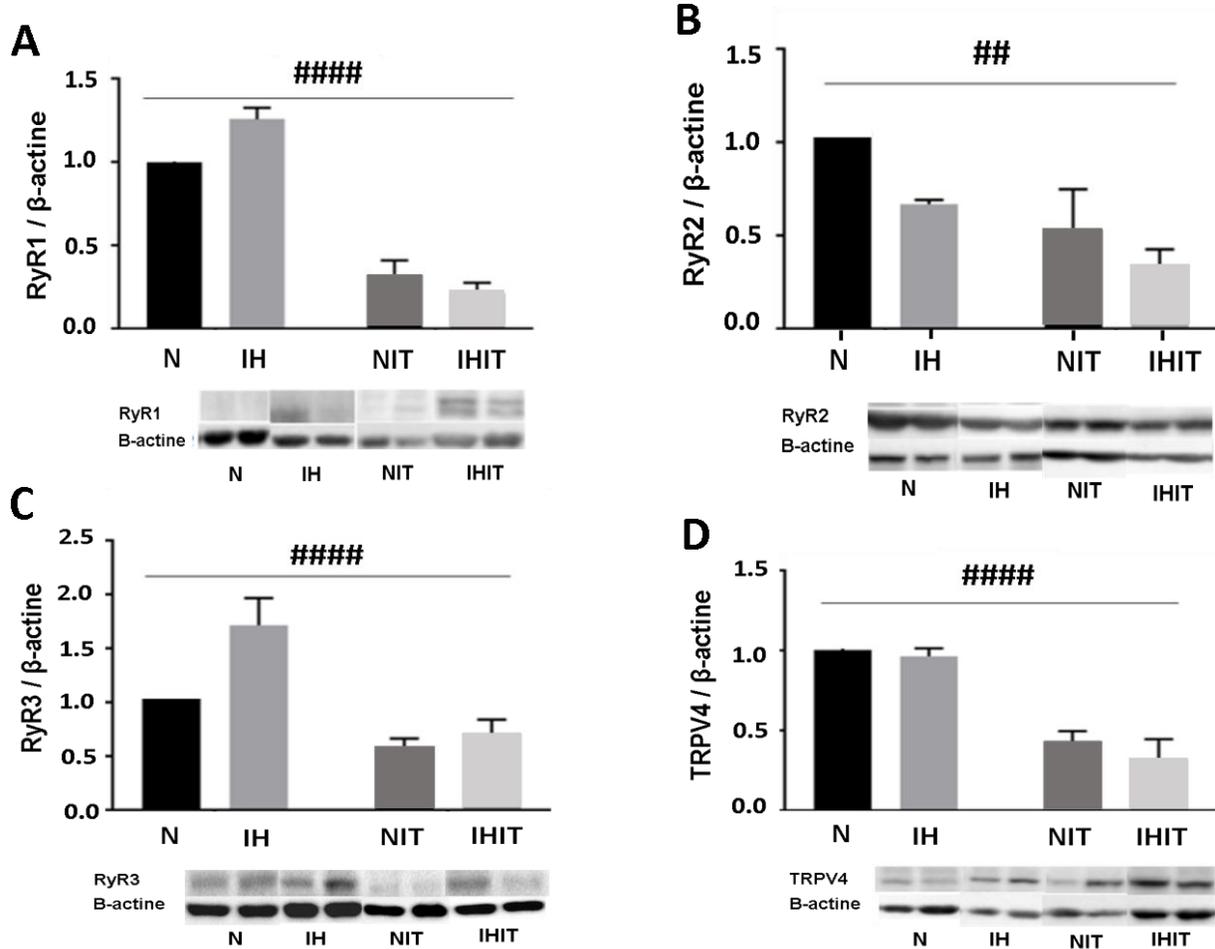


Figure 63 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TPPV4 dans l'aorte abdominale de différents groupes de rats étudiés. N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxiques avec l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le taux relatif des protéines d'intérêt (RyR1-3 et TRPV4) par rapport à l'expression de la bêta-actine prise comme gène de référence. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par ## pour $p \leq 0,01$, et par ##### et pour $p \leq 0,0001$.

Finalement, au niveau des artères mésentériques, les analyses ANOVA 2 facteurs sans mesures répétées (HI, EI) réalisé sur chaque gène révèlent que l'HI n'a pas d'effet sur le taux d'expression protéique du canal-récepteur RyR1 ($p = 0,77$) (Fig. 64 A). En revanche, l'HI induit une diminution globale du taux protéique relatif du RyR2 ($p = 0,0474$) (Fig. 64 B)

indépendamment de l'EI (interaction HI x EI : $p = 0,1378$) chez les rats sédentaires et entraînés ensemble.

En outre, le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, EI) sur le gène RyR3, révèle que l'HI n'a pas d'effet significative ($p = 1,260$) sur l'expression protéique de ce gène (Fig. 64 C).

Finalement, le test ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, EI) sur le gène TRPV4 révèlent que, l'HI fait augmenter le taux d'expression protéique relatif du TRPV4 ($p = 0,0083$) chez les rats sédentaires (Fig. 64 D). L'effet de l'HI sur le TRPV4 est dépendant de l'EI, interaction significative (HI x EI) : $p = 0,0002$, pour cela on trouve qu'en présence de l'EI, l'HI induit une diminution du taux protéique de TRPV4 chez les rats entraînés (Fig. 64 D).

Les mêmes tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, EI) réalisés pour chaque gène séparément, nous a permis d'évaluer l'effet de EI. Les résultats de ces tests révèlent que l'EI n'a pas affecté le niveau de l'expression protéique relatif de RyR2 ($p = 0,6214$) (Fig. 64 B), alors qu'il a induit une augmentation globale du taux d'expression relatif du RyR1 ($p = 0,0468$) (Fig. 64 A) chez les rats hypoxiques et normoxiques pris ensemble. Il est important à signaler l'absence d'interaction entre (HI x EI) pour les RyR1 ($p = 0,138$) et RyR2 ($p = 0,086$).

Quant au RyR3 et TRPV4, les tests ANOVA 2 facteurs sans mesure répétée (HI, EI) réalisés pour chacun d'eux, montrent que l'EI fait augmenter le taux protéique de RyR3 ($p = 0,0059$) et TRPV4 ($p = 0,0002$) chez les rats normoxiques (Fig. 64 C et D). Cet effet est dépendant de l'HI : interaction significative HI x EI : $p = 0,0004$ pour RyR3 et $p = 0,0002$ pour TRPV4. On trouve alors, que chez les rats soumis à l'HI, l'EI induit une diminution du taux protéique de RyR3 et TRPV4 (Fig. 64 C et D).

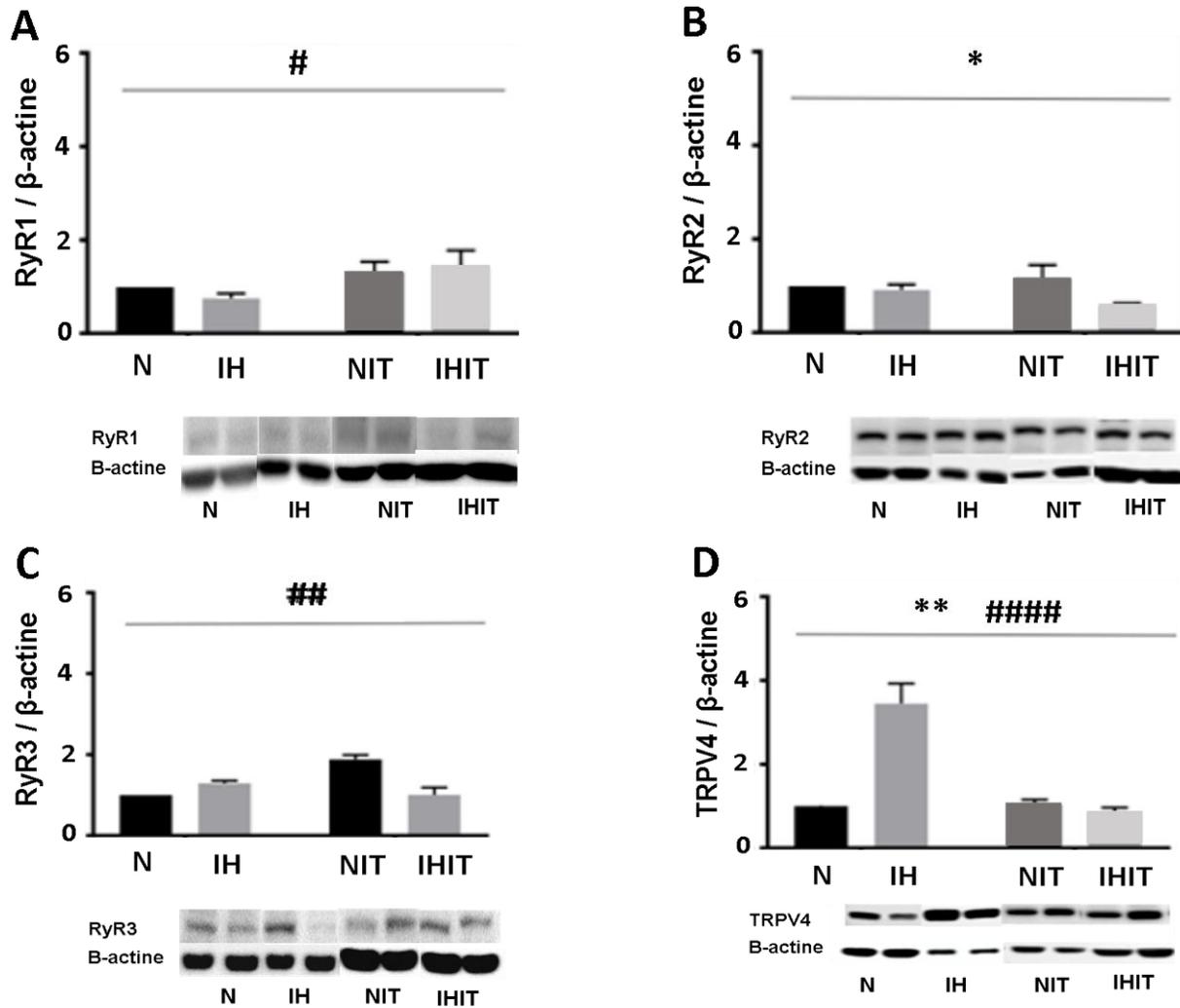


Figure 64 : Niveau de l'expression protéique de RyR1, RyR2, RyR3 et TRPV4 dans les artères mésentériques de différents groupes de rats étudiés. N : rats soumis à la normoxie (groupe témoin), IH : rats soumis à l'hypoxie intermittente, NIT : rats normoxique avec l'entraînement physique intensif, IHIT : rats soumis à l'hypoxie intermittente avec de l'entraînement intensif. Ces résultats sont présentés comme le taux relatif des protéines d'intérêt (RyR1-3 et TRPV4) par rapport à l'expression de la bêta-actine prise comme gène de référence. Un effet significatif global de l'hypoxie intermittente (rats sédentaires et entraînés ensemble) est représenté sur le graphique par * pour $p \leq 0,05$ et par ** pour $p \leq 0,01$. Un effet significatif global de l'entraînement physique intensif (rats hypoxiques et normoxiques ensemble) est représenté par # pour $p \leq 0,05$, par ## pour $p \leq 0,01$ et par #### pour $p \leq 0,001$.

VI. Analyses générales et perspectives

VI.1. Discussion générale

L'objectif de cette étude a été de comprendre, dans un modèle animal (rats Wistar mâles), les mécanismes par lesquels l'hypoxie intermittente (HI), comme conséquence pathologique majeure du SAOS, conduit à l'hypertension artérielle, au remodelage et à la dysfonction vasculaire et musculaire (Peppard PE. et coll., 2000) (Nieto FJ. et coll., 2000) (Gras E. et coll., 2016) (Castro-Grattoni AL. et coll., 2016). Nous avons également tenté de comprendre quel rôle peut jouer l'entraînement physique intensif (EI) sur les effets délétères de l'HI et d'évaluer les propriétés préventives de l'activité physique sur le système cardiovasculaire dans le cadre du SAOS.

Nous avons donc choisi le rat pour réaliser notre recherche car de nombreux travaux montrent que ce modèle animal, exposé à l'hypoxie intermittente, est pertinent pour étudier la physiopathologie du SAOS (Prabhakar JN. et coll., 2007) (Kumar GK. et coll., 2015). Parmi ces études antérieures, certaines se sont intéressées à la physiopathologie du dysfonctionnement vasculaire / cardiovasculaire induit par l'hypoxie intermittente (Castro-Grattoni AL. et coll., 2016) (Kanagy NL., 2009). Une revue récemment publiée, élaborée par Andrew E. Beaudin avec un collaborateur de notre laboratoire HP2, Xavier Waltz (Beaudin AE. et coll., 2017), résume les études réalisées entre les années 1992 et 2016 sur des modèles expérimentaux humain et animaux, concernant les effets physiopathologiques de l'HI sur le système cardiovasculaire dans le cadre du SAOS. Différents modèles et protocoles d'exposition à l'hypoxie intermittente sont abordés. Dans cette revue, les auteurs révèlent une association entre le SAOS et les maladies vasculaires, et notamment une forte corrélation entre l'hypertension artérielle et le SAOS.

Ces auteurs évoquent le fait que, comme cela est le cas dans d'autres études (Marin JM. et coll., 2005) (Kohler M. et Stradling JR., 2010) (Turnbull CD. et coll., 2017), les mécanismes impliqués dans le risque de maladies vasculaires dans le cadre du SAOS peuvent se manifester sous différents aspects, parmi lesquels : la suractivation sympathique, le dysfonctionnement endothélial et les modifications de la régulation vasculaire périphérique et cérébrale, qui

représentent les symptômes les plus communément observés dans ce contexte (Carlson JT. et coll., 1993) (Kato M. et coll., 2000) (Lévy P. et coll., 2012) (Eisele HJ. et coll., 2015).

Certaines études se sont intéressées aux mécanismes par lesquels l'HI, conséquence majeure du SAOS, provoque les complications cardiovasculaires tels que l'hypertension, le remodelage et la dysfonction vasculaire. Ces études se sont concentrées sur l'activation du système rénine-angiotensine-aldostérone, du système nerveux sympathique, de l'inflammation, et du stress oxydatif par l'HI (Eisele HJ. et coll., 2015) (Bouloukaki I. et coll., 2017) (Turnbull CD. et coll., 2017). À notre connaissance, la présente étude est unique car elle regroupe à elle-seule la relation entre l'hypoxie intermittente, le remodelage vasculaire, l'hypertension et la dysfonction musculaire établie directement au niveau des cellules musculaires. De plus, la particularité de cette étude réside dans le fait qu'elle est réalisée dans trois vaisseaux différents (anatomiquement, structurellement et fonctionnellement) ainsi que dans trois muscles squelettiques, dans lesquels les changements au niveau des voies de signalisation calcique sont considérés comme des mécanismes intermédiaires associées à l'HI.

Paramètres physiologiques et hypoxie intermittente / entraînement physique intensif :

Nous avons commencé notre étude, par la mesure des paramètres physiologiques chez les rats après leur exposition à l'HI et à l'EI : le poids, la pression artérielle, la fréquence cardiaque, l'hématocrite et l'activité enzymatique de la citrate synthase. Les résultats de ces mesures nous ont permis de confirmer que les rats ont répondu correctement à l'HI et à l'EI. En ce qui concerne l'HI, nos résultats confirment ceux de la littérature, à savoir que l'HI fait augmenter la pression artérielle (PA), la fréquence cardiaque (FC) (Tamasier R. et coll., 2011) (Parati G. et coll., 2013) (Fletcher EC. et coll., 1999) (Fletcher EC. et coll., 2000) (Bourdier G. et coll., 2016), et l'hématocrite (McGuire M. et Bradford A, 1999) (Kanagy NL., 2009) (Moraga FA. et coll., 2017), alors qu'elle réduit le poids (Hoppeler H. et coll., 1990) (Bigard X. et coll., 2000) (Martinez D. et coll., 2008) (Huang XG. et coll., 2007), chez l'Homme ainsi que dans les modèles murin.

Concernant l'EI, le protocole d'entraînement physique que nous proposons dans cette étude est un protocole mis en place et élaboré au sein de notre laboratoire, HP2. G. Bourdier et ses

collaborateurs ont en effet montré l'efficacité de ce protocole d'entraînement physique pour réduire la PA et la FC dans le cadre de l'étude de l'effet du sport sur le stress du réticulum endoplasmique induit par l'HI (Bourdier G. et coll., 2016). Nos résultats montrent que l'EI est capable de prévenir l'élévation de la pression artérielle (Fig. 41) et de la fréquence cardiaque (Fig. 42) induite par l'HI. En outre, nos résultats (Fig. 44) révèlent aussi le fait que l'entraînement physique fait augmenter l'activité de la citrate synthase au niveau des muscles squelettiques. Ces résultats que nous avons cités, confirment ce qui est obtenu dans les études précédentes (Bourdier G. et coll., 2016) (Siu PM. et coll., 2003) (Dotzert MS. et coll., 2017).

Concernant la variation du poids des rats, nos résultats montrent que l'EI et l'HI induisent une réduction de la prise de poids. Ces effets sont en effet connus dans la littérature, qui associe l'HI et l'EI à la diminution de la prise de poids chez l'homme (Urdampilleta A. et coll., 2012) (Hobbins L. et coll., 2017) et les modèles animaux (Martinez D. et coll., 2008) (Lu YL. et coll., 2014) (Lu YL. et coll., 2016). En revanche, l'hématocrite a été le seul paramètre physiologique mesuré non-affecté par l'EI (Fig. 42). D'après la littérature, l'effet de l'exercice physique intensif sur l'hématocrite varie en fonction du protocole mais surtout en fonction du temps du maintien en EI. Ainsi, durant les premiers jours d'EI (jusqu'à 5 jours), ce dernier fait probablement augmenter l'hématocrite (Sawka MN. et coll., 2000) (Stewart IB. et McKenzie DC., 2002). Ceci semble être dû à une diminution du volume du plasma du sang durant l'exercice où l'organisme perd des quantités d'eau importantes (transpiration) qui ne sont pas compensées rapidement (Mairbäul H. et coll., 2013). Après quelques semaines, l'EI ramène l'hématocrite à son niveau initial ou tend même à le diminuer (Sawka MN. et coll., 2000) (Stewart IB. et McKenzie DC., 2002). Ces données peuvent présenter une explication de nos résultats, où la soumission à l'EI n'affectent pas l'hématocrite des rats après 14 jours : il y a pu y avoir une augmentation de l'hématocrite durant les premiers jours d'EI qui a été compensée pendant la suite de la période d'EI, avec un retour de l'hématocrite à la normale lorsque le prélèvement a été fait lors du 14^{ème} jour d'EI.

Effet de l'HI et de l'EI sur le remodelage vasculaire :

Nous avons voulu examiner ensuite, l'impact de l'HI sur le remodelage vasculaire, qui est connu d'être associé à des élévations de la pression artérielle. Pour ce faire nous avons mesuré

l'épaisseur intima-média (IM) de quatre parties d'artères élastiques, dont trois font partie de la circulation systémique (l'aorte thoracique et abdominale, et l'artère carotide) et un fait parti de la circulation pulmonaire (artère pulmonaire). À notre connaissance, c'est la première étude qui compare l'effet de l'HI sur le remodelage de plusieurs artères systémiques et pulmonaire différentes dans le cadre du SAOS. Nos résultats révèlent que 21 jours d'exposition à l'HI induisent un remodelage vasculaire global (épaississement de l'IM) des artères pulmonaire et carotide, en présence ou en absence d'exercice physique, même si l'élévation de l'épaisseur IM induite par l'HI est beaucoup plus faible chez les animaux ayant pratiqué un exercice physique intensif (Fig. 45-I A et 45-II E et 45-I B et 45-II F). En revanche, cet effet de l'HI n'est pas observé sur l'autre artère systémique, l'aorte, aussi bien au niveau thoracique qu'au niveau abdominal. En effet, l'HI induit au contraire une diminution de l'épaisseur IM de l'aorte thoracique chez les animaux sédentaires uniquement, pas les animaux ayant subi un EI, et aucun effet significatif sur l'IM dans l'aorte abdominale.

Il est à noter que le remodelage vasculaire des artères systémiques et pulmonaires, causé par l'hypoxie dans différentes situations pathologiques (comme les maladies pulmonaires obstructives chroniques, et le SAOS), peut être dû à des changements structuraux au niveau de l'intima-média aussi bien qu'au niveau de l'adventice (Brito J. et coll., 2014) (Arnaud C. et coll., 2011) (Gras E. et coll., 2016) (Kholdani C. et coll., 2015) (McGuire M et Bradford A., 2001) (Campen MJ. et coll., 2005). Au niveau de l'intima-média, les changements de l'épaisseur sont dus soit à des changements au niveau des CMLV soit à des changements au niveau des fibres élastiques. Par exemple, dans le cas de la maladie pulmonaire obstructive chronique, l'exposition à l'HI fait augmenter le nombre des CMLV dans la média de l'artère pulmonaire, ce qui induit son épaississement et la rend plus rigide.

Dans le cadre du SAOS, des études précédemment réalisées au sein de notre laboratoire révèlent, au contraire de nos résultats, que l'exposition à l'HI durant 14 jours induit un épaississement de l'IM de l'aorte des souris (Arnaud C. et coll., 2011) (Gras E. et coll., 2016). Une explication de cette différence, est que la durée d'exposition à l'HI dans notre modèle est plus longue (21 jours) et que, de plus, l'animal modèle est différent (rat contre souris), avec des réponses différentes liées possiblement à l'espèce. Dans les deux études d'Arnaud et de Gras, l'épaississement de l'IM est associé à une désorganisation et discontinuité des fibres élastiques qui sont à l'origine de l'épaississement de la lame élastique. Dans notre étude, il est possible qu'au-delà du 14ème jour

d'HI, l'aorte déclenche un mécanisme d'adaptation à l'HI qui permet aux fibres élastiques de reprendre leur organisation normale.

De son côté, l'artère pulmonaire est connue pour subir un remodelage dans le cadre du SAOS. Ainsi, une étude récemment publiée par Çetin et ses collaborateurs montre que la diminution de la distensibilité de l'artère pulmonaire est proportionnelle à la sévérité du SAOS (Çetin S. et coll., 2018). La rigidité de l'artère pulmonaire résultante induit à son tour une dysfonction du ventricule droit et prédispose les sujets à des complications cardiovasculaires dont l'insuffisance cardiaque et l'hypertension pulmonaire (Calcuttea A. et coll., 2014) (Çetin S. et coll., 2018).

Concernant l'effet de l'exercice physique, nos résultats montrent que le protocole d'EI que nous avons adopté permet de diminuer globalement l'épaisseur IM de la carotide chez les rats sédentaires (N et HI). Chez les rats HI, l'EI permet de prévenir l'épaississement de la carotide induit par l'HI. Ce résultat est particulièrement important puisqu'il permet de prévenir un effet de l'HI dans une artère pivot de la pathologie induite par l'HI. En effet, les données de la littérature montrent que l'artère carotide est l'artère la plus sensible à l'hypoxie intermittente (Liu HG. et coll., 2011) (Messenger SA. et Ciriello J., 2013) (Xu XM. et coll., 2014) surtout dans le cas du SAOS (Monneret D. et coll., 2010) (Nadeem R. et coll., 2013) et son remodelage est impliqué dans l'augmentation de la pression artérielle (Rajala U., 2003) (Pasha SM. et coll., 2011) (Stabouli S. et coll., 2012) (Chen Y. et coll., 2015) favorisant ainsi la survenue des maladies cardiovasculaires dont l'hypertension et l'athérosclérose (Juonala M. et coll., 2004) (Lévy P. et coll., 2009) (Demir AM. et coll., 2016).

Concernant l'artère pulmonaire, l'EI limite aussi l'effet de l'HI qui augmente l'épaisseur IM (Fig. 45-I et 45-II F). Mais dans les deux cas (N et HI), l'EI induit une augmentation globale de l'épaisseur IM. Un effet lié de l'exercice a en effet déjà été observé, avec une augmentation de la rigidité de l'artère pulmonaire suite à l'exposition à l'exercice d'individus sains et de patients atteints de maladies cardiovasculaires (Naeije R. et coll., 2013) (Forouzan O. et coll., 2015) (Reddy YNV. et coll., 2017) (Naeije R. et coll., 2018). Une explication possible de cet effet de l'exercice sur l'artère pulmonaire peut être que l'EI induit une augmentation de l'épaisseur IM de cette artère, qui ce augmente sa rigidité (Naeije R. et coll., 2013) (Reddy YNV. et coll., 2017). L'augmentation de la rigidité de l'artère pulmonaire durant l'exercice fait réduire le volume de sang éjecté dans les poumons, ce qui implique une augmentation de la fréquence respiratoire qui

est caractéristique de tout effort physique (Oelberg DA. et coll., 1998) (Ventura-Clapier R. et coll., 2002) (Richter MJ. et coll., 2017).

L'appréciation de l'intérêt de l'effet de l'EI que nous avons observé sur la structure de l'artère pulmonaire est complexe puisque, selon la littérature, l'entraînement physique n'est pas associé à un effet bénéfique sur la circulation pulmonaire et ses artères (Provencher S. et coll., 2006) (Fowler RM. et coll., 2012) (Babu AS. et coll., 2016) (Richter MJ. et coll., 2017). Une limitation de l'activité et de l'exercice physique a été recommandée jusqu'à la fin des années 1990 pour les patients avec de l'hypertension pulmonaire (Gaine SP. et Rubin LJ., 1998) (Provencher S. et coll., 2006) (Richter MJ. et coll., 2017). Mais les preuves récentes des effets positifs de l'entraînement physique sur le système de circulation pulmonaire s'accumulent, telles que l'amélioration de la compliance de l'artère pulmonaire et la favorisation de sa relaxation (Arena R. et coll., 2015) (Horsburgh S. et coll., 2015) (La Gerche A. et Claessen G., 2015). Mais malgré l'accumulation de ces preuves, l'entraînement physique n'est pas encore directement ou reconnu officiellement comme lié à un bénéfice thérapeutique de l'hypertension pulmonaire (La Gerche A. et Claessen G., 2015) (Richter MJ. et coll., 2017). En outre, plusieurs études réalisées dans ce contexte révèlent que l'effet de l'entraînement joue un rôle anti-inflammatoire (Horsburgh S. et coll., 2015) (Sugama K. et coll., 2015), ce qui peut être bénéfique pour éviter l'hypertension pulmonaire. Cependant, le mécanisme précis par lequel l'exercice influence positivement le remodelage du système vasculaire pulmonaire est toujours inconnu (Richter MJ. et coll., 2017).

D'autre part, au niveau de l'aorte thoracique, l'EI induit une diminution globale de l'épaisseur IM, très significative chez les animaux normoxiques et très faible chez les animaux hypoxiques (Fig. 45-I C et 45-II G). En revanche, il n'y a pas d'effet significatif sur l'épaisseur IM de l'aorte abdominale.

Il est à noter que l'augmentation du débit cardiaque et de la pression sanguine lors de l'exercice physique modéré et intensif implique des adaptations structurelles et fonctionnelles à ces changements aussi bien au niveau de la circulation systémique que celui de la circulation pulmonaire. Parmi ces adaptations, on cite principalement l'accroissement de la dilatation des artères (systémique / pulmonaire) pour permettre le passage d'un volume important du sang (La Gerche A. et Claessen G., 2015) (Richter MJ. et coll., 2017). Cependant, les artères de la circulation pulmonaire diffèrent des artères systémiques par le fait ces dernières sont des vaisseaux qui transportent le sang à haute pression et sur des distances plus longues, ce qui

imposent que leur structure soit plus rigide (plus résistante) pour permettre l'arrivée du sang à la même pression aux artères musculaires, artérioles et tissus (La Gerche A. et coll., 2013) (La Gerche A. et Claessen G., 2015). Cette différence de structure implique une différence dans la réponse à l'EI. Ainsi, il a été mis en évidence que les artères systémiques répondent à l'exercice physique par un élargissement de leur diamètre pour permettre le passage d'un flux sanguin augmenté (Green DJ. et coll., 2008) (Joyner MJ. et Green DJ., 2009) (Green DJ. et coll., 2013), alors que dans les artères pulmonaires l'augmentation de la vasodilatation comme réponse à l'exercice n'est pas toujours associée à une augmentation du diamètre (Arena R. et coll., 2015) (Horsburgh S. et coll., 2015). Dans notre modèle, cette adaptation se traduit par une réduction de l'épaisseur intima-média des artères telles que la carotide et l'aorte thoracique (Fig. 45-I A et 45-II E, 45-I C et 45-II G). Enfin, malgré une absence de la réponse de l'aorte abdominale à 2 semaines d'EI, nous pensons qu'une réponse de ce vaisseau pourrait apparaître si nous prolongions la durée de l'EI jusqu'à 3 ou 4 semaines.

La contractilité vasculaire en réponse à l'HI et l'EI :

Un autre facteur peut aussi jouer un rôle dans l'augmentation de pression artérielle induite par l'HI : la réactivité vasculaire. Pour cela, nous avons testé l'effet de l'HI sur la contractilité de l'aorte thoracique descendante de rat en réponse à la PE, à l'ET-1 et à l'ACh. Nos résultats montrent que l'HI n'a pas affecté la vasoréactivité en réponse à la PE (Fig. 46) ET -1 (Fig. 47) et l'ACh (Fig. 48). L'absence d'effet de l'HI sur la vasodilatation induite par l'ACh, suggère que notre modèle d'HI n'a pas modifié/altéré la vasodilatation dépendante de l'endothélium au niveau de l'aorte. Ces données sont en accord avec des études antérieures qui montrent que l'exposition des rats à l'HI ne modifie pas la relaxation de l'aorte dépendante de l'endothélium induite par l'acétylcholine (Lefebvre B. et coll., 2006) (Thomas BJ. et Wanstall JC., 2003).

De son côté, l'EI s'est révélé comme un modulateur important du tonus vasculaire, capable d'atténuer la vasoconstriction induite par la PE (Fig. 46) et l'ET-1 (Fig. 47) et d'améliorer la vasorelaxation endothélium- dépendante induite par ACh (Fig. 48). L'EI montre donc que son effet bénéfique peut être double : d'un part sur le tonus vasculaire via un son effet sur les CMLV, et l'autre sur le fonctionnement endothéliale via son effet sur les cellules endothéliales. Un autre fait intéressant est que deux semaines d'EI pour les rats ont confirmé la capacité de l'EI et du

protocole suivi à réguler la vasoconstriction adrénérgique (en réponse à PE) et non-adrénérgique (en réponse à ET-1). Ceci n'était pas toujours le cas dans d'autres études réalisées précédemment. Ainsi, Spier et ses collaborateurs ont montré, dans leur étude réalisée sur des anneaux de l'aorte abdominale de rat, que 2 semaines de course sur tapis roulant à une vitesse de 30 m/minute (une heure/jour, 5 jours/semaine) n'affectent pas la réponse vasoconstrictrice à la PE (10^{-8} – 10^{-4} mol/L). Un effet de l'exercice sur la vasoconstriction en réponse à PE n'était observé qu'après 10 semaines d'entraînement (Spier SA. et coll., 1999). En revanche, Howard et ses collaborateurs, ont montré que l'entraînement physique fait diminuer la vasoconstriction de l'aorte des lapins en réponse à la PE après une seule session de course sur tapis roulant 24 m/minute durant 16 minutes (Howard MG. et coll., 1992).

Concernant la réponse à l'ET-1, Reboul et ses collaborateurs, révèlent dans leur étude que l'effet de l'exercice sur la sensibilité vasculaire chez les rats varie après l'exposition à l'hypoxie continue. En effet, dans les conditions normales, l'exercice (course dans une roue, 80 % de la VMA, 5 jours/semaine, 2 semaines) réduit la sensibilité vasculaire des rats en réponse à l'ET-1, alors qu'en hypoxie continue, l'exercice n'affecte plus cette sensibilité (Reboul C. et coll., 2006). Notre protocole d'EI, a la capacité d'atténuer la vasoconstriction induite par ET-1 chez les rats normoxiques et ceux soumis à l'HI.

Ces différences observées dans les résultats peuvent être dus essentiellement à la nature de l'hypoxie (hypoxie intermittente dans notre étude contre hypoxie continue dans l'étude de Reboul). Autres paramètres peuvent avoir un impact : les différences dans les méthodes d'anesthésie et d'euthanasie des modèles animaux, la méthode d'étirement qui peut être différente en déterminant le rapport longueur-tension convenable pour étirer les vaisseaux à une tension donnée, les différentes intensités de l'exercice physique utilisées, à l'espèce de l'animal étudié (rats vs lapin) ou la section de l'aorte utilisée dans l'étude (thoracique, abdominale).

Nous avons observé le fait que l'exposition des rats à 21 jours d'HI fait augmenter leur pression artérielle. La comparaison de ces résultats avec les données de l'artériographie (qui indiquent un changement de la réactivité vasculaire de l'aorte due à l'HI) ainsi que les données d'histologie (qui indiquent une absence d'effet de l'HI sur la structure de l'aorte, alors qu'une augmentation de l'épaisseur IM des vaisseaux systémiques (artères carotide et pulmonaire) par l'HI, nous amène à proposer que l'effet hypertenseur de l'HI est causé en partie par son action sur la

structure des artères carotide et pulmonaire, et en partie par son effet sur la contractilité de l'aorte.

La gestion calcique dans les CMLV suite à l'exposition à l'HI et à l'EI :

Afin d'examiner les mécanismes par lesquels l'HI peut affecter la réactivité de l'aorte, il nous est apparu prioritaire d'étudier la contractilité des CMLV en réponse à l'HI. Comme les flux calciques (Ca^{2+}) sont les courants ioniques majeurs qui sous-tendent le processus de contraction au niveau du muscle lisse (Ghigo A. et coll., 2017) (Guerrero-Hernández A. et coll., 2002) (Espinosa-Tanguma R. et coll., 2011) (Berridge BR. et coll., 2013) (Johny JP. et coll., 2017), nous avons décidé de nous intéresser à la gestion du calcium dans les CMLV. Il est à noter que le réticulum sarcoplasmique (RS) représente le compartiment de stockage principal dans les CMLV. Malgré sa faible proportion par rapport au volume cellulaire total (entre 1,5 à 7,5 %), le RS contient une concentration très élevée de Ca^{2+} , de l'ordre de 100 μM (Clapham DE., 1995). Cette particularité permet la libération du calcium, à travers des récepteurs-canaux situés au niveau de la membrane du RS, depuis la lumière du RS vers le cytosol suivant le gradient de concentration. La libération du Ca^{2+} est assurée principalement via deux familles de canaux-récepteurs sensibles au calcium (Otsu H. et coll., 1990) (Nixon GF. et coll., 1994) : les canaux-récepteurs sensibles à la ryanodine (RyR1, RyR2 et RyR3), les canaux-récepteurs sensibles à l'inositol 1, 4, 5 trisphosphate (IP3R1 et IP3R3) (Guerrero-Hernández A. et coll., 2002) (Berridge BR. et coll., 2013) (Johny JP. et coll., 2017). Donc, pour évaluer l'effet de l'HI et de l'EI sur la signalisation calcique dans l'aorte, nous avons réalisé des expériences de mesure du calcium intracellulaire au niveau des CMLV extraites de la partie inférieure de l'aorte thoracique descendante et la partie supérieure de l'aorte abdominale de rats, mises en culture primaire et chargées avec une sonde semi-quantitative spécifique des ions Ca^{2+} : le Fluo 4-AM (Gee KR. et coll., 2000). Cette dernière est une sonde fluorescente qui a une haute affinité pour le calcium (Martin VV. et coll., 2004) en s'associant à cet ion lorsque ce dernier est libéré dans le cytosol, ce qui nous a permis de mesurer la quantité de calcium intracellulaire libérée par les réserves de ces cellules suite à leur stimulation par la caféine (un agoniste des récepteurs sensibles à la ryanodine).

Afin d'en savoir plus sur la contribution de chaque canal-récepteur dans la libération du calcium intracellulaire, nous avons eu recours à des antagonistes qui peuvent moduler pharmacologiquement l'activité des récepteurs qui nous intéressent. Nous avons ainsi utilisé la xestospongine C (10 μ M) qui est capable d'inhiber d'une manière sélective les IP3R (Oka T. et coll., 2002) (Saleem H. et coll., 2014) et le dantrolène (10 μ M) qui est connu pour bloquer deux isoformes de RyR : RyR1 (Nelson TE. et coll., 1996), (Zhao F. et coll., 2001) (Yi Wen Oo. et coll., 2015) et RyR3 (Zhao F. et coll., 2001) (Keshavarz M. et coll., 2016) (Liou B. et coll., 2016), mais pas RyR2 (Keshavarz M. et coll., 2016) (Liou B. et coll., 2016).

Nos résultats montrent que la quantité de calcium libérée par les réserves des CMLV en réponse à la caféine est augmentée par l'HI et l'EI (Fig. 49 A), ceci est réalisé via une action possible de ces deux facteurs sur l'IP3R (Figure 49 C), ou via une action de l'HI seulement sur les RyR (Fig. 49 B). Ceci est cohérent avec les données de la littérature. En effet, des études antérieures montrent que l'hypoxie (intermittente et continue) induit une augmentation de la quantité de calcium intracellulaire libérée du RS/RE vers le cytosol de plusieurs types de cellules (Limtop WK. et coll. 2015) (Mungai PT. et coll. 2011) (Liu YG. et coll. 2009) (Dahan D. et coll., 2012). Ainsi, l'exposition des rats à l'hypoxie continue induit une augmentation de la libération de calcium intracellulaire des CMLV de l'artère pulmonaire (Dahan D. et coll., 2012) en augmentant l'activité et l'expression protéique de l'isoforme 2 des récepteurs sensibles à la ryanodine. En outre, au niveau des cellules endothéliales des rats, l'exposition à l'HI induit une élévation du taux du calcium intracellulaire en augmentant le niveau d'expression protéique des récepteurs IP3R (Ren J. et coll., 2017).

Quant à l'EI, les données de la littérature concernant l'effet de l'exercice sur la gestion du calcium cellulaire, montrent que l'EI est capable de ramener le taux anormalement élevé du calcium au niveau de différents types cellulaires dans des conditions physiopathologiques à son niveau normal et de prévenir les complications cardiovasculaires (Marques CM. et coll., 2006) (Haram PM. et coll., 2009) (Gielen S. et coll. 2010). Ainsi, au niveau des CMLV de l'artère coronaire, l'EI induit une diminution du calcium intracellulaire libre dans le RS en augmentant l'activité et l'expression des pompes SERCA dans ces cellules (Witczak CA. et coll., 2006). De même, une autre étude réalisée par Place et ses collaborateurs révèle qu'une seule session d'entraînement physique intensif (90% de la VMA) durant 3 minutes est capable d'induire une adaptation musculaire aboutissant à la réduction de la quantité de calcium dans le RS des cellules

musculaires squelettiques en altérant l'activité et l'expression des récepteurs RyR1 (Place N. et coll., 2015).

Il est bien connu, qu'un état d'équilibre entre le Ca^{2+} entrant et sortant du RS doit être maintenu pour assurer les niveaux de calcium requis pour un fonctionnement normal des CMLV. Parmi les nombreuses fonctions du RS, l'une des plus importantes est sa participation la transmission de signaux régulés par le Ca^{2+} dans toute la CMLV pour induire d'autres fonctions en aval, dont la contraction (Mattson MP., 2010) (Rutkowski DT. et Kaufman RJ., 2004) (Ziomek G. et coll., 2016). Donc les fluctuations de la teneur en Ca^{2+} du RS peuvent nous fournir des informations importantes concernant les réponses cellulaires fonctionnelles aux conditions de stress (HI/ EI) subies par les CMLV.

En outre, la spécificité du RS est qu'il est le seul organite intracellulaire qui est étroitement associé à l'espace extracellulaire environnant par des jonctions RS- membrane plasmique (Ashby MC. et coll., 2001) (Felder E. et coll., 2002) (Ziomek G. et coll., 2016). C'est pour cette raison qu'on peut considérer que le RS constitue la première ligne de réponse calcique à tout stress subi par la cellule. Ceci est cohérent avec nos observations, qui ont montré que l'HI aussi bien que l'EI ont un impact sur le Ca^{2+} libéré dans le cytosol par le RS des CMLV.

Prises ensemble ces données, sur l'effet de l'hypoxie et l'exercice physique sur la gestion du calcium, avec nos résultats, révèlent que l'HI aussi bien que l'EI sont capables d'induire des changements significatifs du Ca^{2+} dans le RS des CMLV.

Il est à noter que l'utilisation des indicateurs de Ca^{2+} cytoplasmique (tel que le Fluo-4 AM) est une des méthodes les plus fréquemment employées pour suivre d'une manière indirecte les changements hautement dynamiques du stock de Ca^{2+} dans le RS (Palmer AE. et Tsien RY., 2006) (Poburko D. 2009) (Esfandiarei M. et coll., 2013), Cependant, les conclusions que nous avons tirées sur les changements des Ca^{2+} au niveau du RS sont fondées sur les fluctuations de la concentration de Ca^{2+} cytoplasmique et ne donne par une idée précise sur ce qui se passe quant aux fluctuations du Ca^{2+} dans la lumière du RS. Ceci limite l'interprétation des données recueillies. Afin de contourner cette restriction, il est nécessaire de mesurer la quantité de Ca^{2+} directement dans la lumière du RS. Ceci pourrait être réalisable ultérieurement en utilisant une méthode récemment publiée par Ziomek et ses collaborateurs en fin de l'année 2016 (Ziomek G. et coll., 2016), qui utilisent une sonde spécifique (D1SR) s'associant au calcium luminal du RS. Il s'agit d'une sonde de seconde génération des indicateurs de Ca^{2+} génétiquement codés, appelés

les caméléons. Ces derniers sont des protéines transgéniques très sensibles, fondées sur une variante de protéines fluorescentes vertes (Ziomek G. et coll., 2016), et utilisées pour visualiser les niveaux de Ca^{2+} sur une gamme beaucoup plus large (0,5 – 160 μM) que les indicateurs calciques classiques (Palmer AE. et Tsien RY., 2006). La D1SR contient des séquences modifiées de calsequestrine et de calmoduline, ce qui élimine la possibilité d'une compétition avec la calsequestrine et la calmoduline endogène liant le calcium luminal du RS (Esfandiarei M. et coll., 2013).

Ces données nous amène à constater que les changements du Ca^{2+} que nous avons observé dans nos résultats sont des changements du taux du calcium intracellulaire libéré du RS au niveau du cytosol des CMLV. Ces changements sont dépendants du type de chaque paramètre (EI ou HI) sur les récepteurs, canaux et pompes à calcium qui gèrent les mouvements calciques au sein de ces cellules.

Effets de l'HI et l'EI sur l'expression génique et protéique des canaux-recepteurs, pompes sensibles à calcium et sur les protéines effectrices de la contraction musculaire :

Les récepteurs – canaux RyR aussi bien que IP3R sont les médiateurs de l'effet de l'HI sur le calcium intracellulaire des CMLV observé dans nos résultats (Fig. 49). En outre, les IP3R jouent aussi un rôle important dans l'effet de l'EI sur ces changements calciques. Donc, nous constatons que l'HI et l'EI tendent à activer les canaux et récepteurs assurant le passage du Ca^{2+} du RS vers le cytosol. En revanche, les mouvements de calcium ne se passent pas dans un seul sens (RS \rightarrow cytosol), pour cela nous avons proposé que l'HI et l'EI peuvent avoir aussi un effet sur le repompement du calcium du cytosol dans le RS. Ceci a lieu probablement via l'effet de l'HI / EI sur l'expression de ces récepteurs, canaux et pompes responsables de la gestion du calcium à l'intérieur des CMLV. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences de PCR en temps réel et de Western blot. Nos expériences ont été réalisées à différents niveaux du système vasculaire : aorte thoracique, aorte abdominale et artères mésentériques, pour examiner si les différences de structure et de fonction de ces vaisseaux (artères élastiques contre artères

musculaires) peuvent correspondre à des réponses différentes à l'HI et l'EI en termes d'expression de canaux-récepteurs et pompes calciques. Les protéines étudiées sont :

- le canal calcique TRPV4 : canal membranaire de la famille TRPV facilitant l'entrée du calcium extracellulaire dans le cytosol (Randhawa PK. et Jaggi AS., 2015).
- les RyR1, RyR2, RyR3 : trois isoformes du récepteur de la ryanodine assurant la libération du calcium du RS dans le cytosol (Meissner G., 2017),
- l'IP3R1, IP3R3 : les isoformes 1 et 3 du récepteur de l'Inositol 1, 4, 5 trisphosphate qui gère la libération de calcium intracellulaire et l'absorption dans le réticulum sarcoplasmique (Lin Q. et coll., 2016).
- les SERCA1, SERCA2 : 2 isoformes de la pompe sarco (endo) réticulum plasmique Ca^{2+} -ATPase assurant la recapture de calcium du cytosol et son entrée dans le RS (Chemalya R. et coll., 2018),

Les résultats de Q-PCR montrent que les 3 isoformes du récepteur sensible à la ryanodine (Ryr1, Ryr2 et Ryr3) sont exprimées au niveau des 3 tissus vasculaires étudiés : l'aorte thoracique (Fig. 50), l'aorte abdominale (Fig. 51) et les artères mésentériques (Fig. 52). Le niveau d'ARNm de ces isoformes varie en fonction du tissu. Il est à noter que dans les groupes témoins, le niveau d'expression de chaque isoforme Ryr par rapport à l'autre est presque le même au sein du même tissu.

Dans la littérature, on trouve que l'expression des 3 isoformes du récepteur sensible à la ryanodine a déjà été observée au niveau de l'aorte thoracique et abdominale, aussi bien qu'au niveau des artères mésentériques (Neylon CB. et coll., 1995) (Zheng YM. et coll., 2008) (Morel JL. et coll., 2004). De plus, nos résultats confirment les résultats publiés antérieurement (Marks AR, 1992) (Neylon CB. et coll., 1995) (Morel JL. et coll., 2009) (Mironneau J. et coll., 2001) (Morel JL. et coll., 2004) (Lanner JT. et coll., 2010), qui ont montré que les CMLV expriment les 3 isoformes de Ryr sans prédominance de l'une sur les autres.

De même, concernant les deux isoformes de la pompe calcique du RS, SERCA1 et SERCA2, nos résultats révèlent qu'ils sont exprimés au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 50) et abdominale (Fig. 51) ainsi qu'au niveau des artères mésentériques (Fig. 52). L'expression des isoformes des SERCA au niveau du RS des CMLV a déjà été observée par Johny, Lipskaia, Vallot et leurs collaborateurs, qui ont montré l'aspect indispensable de la présence de ces pompes dans la fonction de tous types de cellules musculaires lisses. Ceci est dû au fait que le transport du

calcium vers le RS, nécessaire pour le maintien d'un faible niveau de calcium cytoplasmique, est réalisé essentiellement par les SERCA (Johny JP. et coll., 2017) (Lipskaia L. et coll., 2013) (Vallot O. et coll., 2000) (Lipskaia L. et coll., 2010).

Nous avons aussi étudié l'expression de l'IP3R de type 1 et de type 3. Mais l'IP3R type 3 a un niveau d'expression extrêmement bas dans tous les vaisseaux étudiés, ce qui nous empêche de distinguer tout effet de l'HI et de l'EI sur son niveau d'expression (Fig. 50-52). Des résultats similaires ont été obtenus dans les reins de souris, où l'IP3R type 1 est exprimé alors que l'IP3R type 3 a un niveau d'expression très faible (Jurkovicova D. et coll., 2008) et au niveau vasculaire, où l'IP3R de type 1 est l'isoforme prédominante au niveau des CMLV des artères systémiques (aorte thoracique et abdominale) (Fig. 50, 51) et des artères musculaires (mésentériques) des rats (Fig. 52) (Johny JP. et coll., 2017) (Zhao G. et coll., 2008) (Ewaet MA. et coll., 2017) (Ewaet MA. et coll., 2010).

Des études réalisées par Inoue, Tanaka, Di, Early, Guibert et leurs collaborateurs, ont montré que le récepteur TRPV4, un des membres de la famille vanilloïde des TRP, le plus exprimé au niveau de la membrane plasmique des muscles lisses vasculaires (Inoue R. et coll., 2006) (Tanaka R. et coll., 2008) (Di A. et Malik AB., 2010) (Early S. et coll., 2010) (Guibert C. et coll., 2011) (Early S. et coll., 2015). Nos résultats confirment la forte expression de Trpv4 au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 50), abdominale (Fig. 51) et des artères mésentériques (Fig. 52). L'importance de ces résultats réside dans le fait que les TRPV4 jouent un rôle déterminant dans le niveau de la pression artérielle diastolique, en assurant la communication entre les CMLV et les cellules endothéliales au niveau des artères de résistance (les artères musculaires) (Ledoux J. et coll., 2006) (Sonkusare SK. et coll., 2012). Nous avons donc aussi vérifié l'expression de TRPV4 dans les artères systémiques aussi bien que musculaires en réponse à l'HI et à l'EI, tous deux étant des facteurs changeant la pression artérielle.

Le niveau moléculaire d'expression de tous ces gènes étudiés : Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2 et Itpr1, est augmenté après 21 jours d'exposition à l'HI (Fig. 50-52). Une étude précédente, réalisée par Thorne et ses collaborateurs, montre que les isoformes 2 et 3 de Ryr sont sur-exprimées suite à l'exposition des CMLV à l'hypoxie continue en culture, ce qui n'est pas le cas pour Ryr1, cette différence pouvant être due à la différente localisation des isoformes de RyR au niveau de la CMLV, où l'hypoxie n'aura pas le même effet (Thorne GD. et Paul RJ., 2003). En revanche, nos résultats révèlent que l'HI fait augmenter l'expression des trois isoformes des

RyR dans les CMLV. Ceci est probablement dû à la différence dans les protocoles d'exposition à l'hypoxie (continue contre intermittente) suivi dans les études. Cette comparaison des données de la littérature avec nos résultats indique que l'effet de l'hypoxie intermittente touche un nombre plus large des cibles moléculaires par rapport à l'hypoxie continue.

Une autre étude réalisée sur le tissu rénal de souris, montre que 6 heures d'exposition des animaux à l'hypoxie continue (8% d'oxygène) sont capables d'induire une sur-expression du gène *Itpr1* codant pour l'IP3R type 1, alors que le niveau d'expression des gènes *Ryr (1-3)* et *Atp2a2* n'est pas touché (Jurkovicova D. et coll., 2008). Ces résultats suggèrent donc que l'*Itpr1* peut répondre à une courte durée d'exposition à l'hypoxie.

Quant au gène *Trpv4*, nos résultats -indiquant une sur-expression de TRPV4 induite par l'HI sont similaires à ceux d'autres chercheurs qui ont étudié l'effet de l'hypoxie continue sur son niveau d'expression chez le rat. Ces résultats révèlent que l'hypoxie continue induit une sur-expression de l'ARNm de *Trpv4* au niveau des CMLV pulmonaires (Dahan D. et coll., 2012) ainsi qu'au niveau des CMLV de l'appareil circulatoire systémique (Yang XR. et coll., 2012), et qu'un seul jour d'exposition à l'hypoxie est suffisant pour provoquer ce changement au niveau d'expression de l'ARNm de *Trpv4* (Yang XR. et coll., 2012) (Lin MJ. et coll., 2004).

L'hypoxie, en particulier intermittente, affecte donc le niveau d'expression des ARNm des gènes codant pour les protéines essentielles responsables de la gestion du calcium au niveau des CMLV. Des études antérieures ont proposé un mécanisme moléculaire impliquant le fait que l'HI induit une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (reactive oxydative species, ROS), qui à leur tour activent des facteurs de transcription sensibles à l'hypoxie (particulièrement le HIF 1 alpha) (Belaidi E. et coll., 2016) (Gras E. et coll., 2016). Ces derniers vont activer des mécanismes en aval dont essentiellement l'expression d'un large spectre de gènes, principalement les gènes codant pour les récepteurs calciques (More YJ., 2018) (Dong S., 2015). Cet effet dépend de plusieurs facteurs, dont principalement : la durée d'exposition à l'hypoxie, le protocole suivi (hypoxie intermittente/continue) et le tissu dans lequel l'étude est réalisée.

Concernant l'effet de l'entraînement physique (EI) dans nos travaux, il est le même que celui de l'HI, à savoir une augmentation du niveau d'expression des ARNm de tous les gènes codant pour les protéines responsables de la gestion du calcium des CMLV, aussi bien celles qui favorisent la sortie du calcium des réserves intracellulaires vers le cytosol que celles qui favorisent son retour

dans les réserves (Fig. 50-52). Ceci est en accord avec les données de la littérature, qui décrivent une sur-expression des canaux-récepteurs sensibles au calcium du RS (les RyR et les IP3R) en réponse à l'exercice physique. Ainsi, dans les modèles animaux lesquels ?, les taux d'expression des ARNm des récepteurs sensibles à la ryanodine au niveau des muscles squelettiques, cardiaques et vasculaires (Ørtenblad N. et coll., 2000) (Witczak AC. et coll., 2005) (Antilla K. et coll., 2006) (Antilla K. et coll., 2008) et de l'IP3R type1 au niveau des CMLV sont augmentés en réponse à l'entraînement physique (Sontam DM. et coll., 2015) (Hägg U. et coll., 2004).

Une augmentation de l'expression des gènes codant pour des protéines permettant la libération du calcium des réserves intracellulaires dans le cytosol doit se traduire, dans un fonctionnement physiologique, par une augmentation de la recapture de calcium par le RS pour assurer la baisse de la concentration du calcium cytosolique requise pour la décontraction musculaire. Pour permettre cela, le niveau de l'expression des récepteurs SERCA est augmenté en réponse à l'exercice physique. En effet, Ørtenblad et ses collaborateurs ont montré que, chez l'Homme, l'entraînement physique contribue à une augmentation respectivement de 41% et 55% de l'expression des ARNm codant pour les isoformes SERCA1 et SERCA2 au niveau des muscles squelettiques chez les sujets entraînés par rapport aux sujets sédentaires (Ørtenblad N. et coll., 2000). De même, pour assurer l'atteinte du taux de calcium nécessaire pour la contraction musculaire durant l'exercice, il a été montré que l'entraînement physique fait augmenter l'entrée de calcium extracellulaire à l'intérieur de la CMLV par une augmentation de l'expression des canaux calciques de la membrane plasmique. Ainsi, Sayed et ses collaborateurs ont montré que la soumission des rats à une course de 25 mètres/minute pendant 15 minutes, 2 fois par jour durant 7 jours, induit une sur-expression de l'ARNm codant pour le TRPV4 au niveau de l'artère fémorale (Sayed A. et coll., 2010).

En résumé, les deux facteurs étudiés, HI et EI, changent le niveau d'expression des gènes codant pour les récepteurs, canaux et pompes calciques. Cependant, en fonction du canal, du type d'hypoxie (intermittente/ continue), de la durée d'exposition à l'hypoxie, et du tissu étudié, il est évident que l'impact sur la gestion du calcium dans la cellule et son influence sur les fonctions de cette dernière sera différent. Ces changements observés au niveau de la voie de signalisations calcique, qui contrôle la contraction vasculaire, vont potentiellement aussi induire des changements au niveau des protéines effectrices de la contraction musculaire. Nous avons donc ensuite étudié l'impact de l'HI et de l'EI sur l'expression des gènes codant pour les protéines

régulant l'excitation-contraction dans le tissu musculaire lisse vasculaire : les isoformes du complexe tropomyosine-calmoduline.

Nos résultats révèlent que les CMLV de l'aorte thoracique, abdominale et les artères mésentériques expriment les gènes codant pour les quatre isoformes de la tropomyosine (Tpm), ainsi que les gènes codant pour les 3 isoformes de la calmoduline (Calm) (Fig. 53, 54 et 55). En général, les tissus musculaires lisses des mammifères co-expriment les 4 isoformes de la Tpm, avec une prédominance des Tpm1 et 2 (Szymanski PT. et coll., 1998) (Marston S. et El-Mezgueldi M., 2008) (Alkahtani R. et coll., 2013). Nos résultats sont en accord avec ces données au niveau des artères musculaires (les artères mésentériques) où les rats du groupe témoin (N) expriment majoritairement les Tpm1 et Tpm2 (Fig. 55). En revanche, au niveau des artères élastiques, les Tpm 3 et 4 sont dominantes dans l'aorte thoracique (Fig. 53), tandis qu'aucune prédominance n'est observée au niveau de l'aorte abdominale (Fig. 54). Cette différence de distribution des isoformes, est probablement due aux différences dans la structure et la fonction de ces artères (artère élastiques contre musculaires) : plus on s'éloigne du cœur, moins les fibres élastiques sont abondantes et plus les CMLV sont présentes dans la paroi artérielle. En effet, l'aorte thoracique (l'artère la plus proche du cœur), qui a la densité la moins élevée en CMLV, exprime majoritairement les Tpm 3 et 4 (Fig. 53), alors que les artères mésentériques ayant la plus forte densité en CMLV expriment majoritairement les isoformes 1 et 2 de la Tpm (Fig. 55). Pour l'aorte abdominale, qui est située entre ces deux artères, sa composition est presque en équilibre entre CMLV et fibres élastiques, et elle n'exprime aucune isoforme majoritaire (Fig. 54).

Quant à la calmoduline, elle est connue pour être exprimée au niveau des muscles lisses des mammifères (Coen M. et coll., 2013) (Toutenhoofd EE. et coll., 2000) (Chin D. et Means AR., 2000). Nos résultats montrent que les gènes codant pour les 3 isoformes de la calmoduline (Calm1, Calm2 et Calm3) sont exprimés dans les 3 trois tissus vasculaires étudiés (Fig. 53-55). De plus, l'expression de Calm1 est prédominante dans les trois tissus, l'aorte thoracique (Fig. 53), l'aorte abdominale (Fig. 54) et les artères mésentériques (Fig. 55).

L'intérêt central de cette partie de l'étude est l'effet de l'HI et de l'EI sur l'expression de ces protéines effectrices du couplage excitation-contraction des CMLV. Les plupart des études se sont concentrées essentiellement sur l'effet de l'hypoxie (Yuan G. et coll., 2005) (Johnson AB. et coll., 1998) (Balla Z. et coll., 2002) (Jung HJ. et coll., 2010) et de l'exercice physique (Rose AJ.,

2007) (Joseph JS. et coll., 2017) sur des voies de signalisation dans lesquelles la calmoduline et la tropomyosine interviennent. Rares sont les études dans la littérature qui ont examiné l'effet de l'hypoxie ou de l'exercice directement sur la calmoduline et la tropomyosine. Parmi ces études, un travail réalisé sur les rats montre que la tropomyosine est la seule protéine contractile non-affectée par l'hypoxie continue au niveau des CMLV du réseau vasculaire systémique (Zacour ME. et coll., 2002). Deux autres études, menées par Sun et Zhao et leurs collaborateurs, montrent que l'hypoxie continue fait augmenter le taux d'expression de la calmoduline au niveau du muscle lisse et du muscle cardiaque (Sun CY. et coll., 2006) (Zhao PJ. et coll., 2008). En revanche, nos résultats montrent que l'hypoxie intermittente induit une diminution du taux d'ARNm des gènes codant pour les 4 isoformes de Tpm au niveau des artères de la circulation systémique (fig. 53, 54) aussi bien qu'au niveau des artères musculaires (Fig. 55). Au contraire, l'HI fait augmenter l'expression en ARNm des isoformes de la calmoduline dans les 3 artères étudiées, ce qui est cohérent avec les résultats des études antérieures, en hypoxie continue, cités plus haut. La différence entre nos résultats et la littérature quant à l'effet de l'HI sur la Tpm, est probablement due au fait que dans les autres études, l'hypoxie est continue alors que nous avons adopté un protocole d'hypoxie intermittente.

L'EI, de son côté, a l'effet inverse de l'HI sur le gène de la calmoduline. Ainsi, nous trouvons que l'EI induit une réduction de l'expression des 3 isoformes de la calmoduline pour les trois artères étudiées (Fig. 53-55). De manière intéressante, en ce qui concerne la tropomyosine, lorsque les rats sont soumis à l'EI en présence de l'HI, l'EI contrebalance partiellement la diminution induite par l'HI en augmentant le niveau d'expression des Tpm2 et Tpm3 au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 53) et de l'aorte abdominale (Fig. 54), ainsi que des Tpm1 et Tpm2 des artères mésentériques (Fig. 55).

Pour comprendre nos résultats obtenus sur les protéines tropomyosine-calmoduline, il semble utile de faire un récapitulatif du mécanisme de couplage excitation-contraction dans les CMLV. Dans le cas normal, le calcium, suite à une augmentation transitoire de sa concentration dans le cytosol, s'associe à la calmoduline et l'active. Un complexe calcium-calmoduline est ainsi formé (Berridge BR. et coll. et coll., 2013), qui à son tour active la kinase de la chaîne légère de myosine (MLCK) en formant un complexe quaternaire actif 4 (Ca^{2+} -CaM-MLCK). La MLCK hydrolyse l'ATP et phosphoryle une des deux chaînes légères de chaque tête de myosine. Ce qui dévoile le site de liaison de l'actine au niveau de la tête de myosine. La liaison actine-myosine

induit la contraction des cellules musculaires lisses (Gao Y., 2001) (Fattoum A., 1997). Nos résultats montrent que l'HI fait augmenter l'expression ARNm de la calmoduline (Fig. 53-55) et, si cet effet est traduit à l'échelle protéique, ceci augmente probablement le nombre de complexes calcium-calmoduline (Berridge BR. et coll., 2013) qui sont formés au niveau des CMLV. D'autre part, l'HI induit une diminution de l'expression des ARNm de la tropomyosine (Fig. 52-54), qui est une protéine constituante du filament fin du muscle lisse. La tropomyosine est connue pour inhiber la caldesmone, qui est une protéine participant au contrôle du mécanisme d'excitation-contraction des CMLV en inhibant la MLCK. Dans le cas où ces résultats de Q-PCR se confirment à l'échelle de la production protéique, une diminution de la disponibilité de la tropomyosine réduirait l'inhibition de la caldesmone ce qui, à son tour, lèverait l'inhibition de la MLCK, et par conséquent favoriserait la contraction des CMLV.

D'autre part, l'EI corrige les effets indésirables de l'HI sur l'expression génique du complexe tropomyosine-calmoduline régulant la contraction des muscles lisses. Ainsi, l'EI diminue le taux de l'ARNm de la calmoduline même à des niveaux inférieurs à la normale (IHIT vs N) dans les 3 vaisseaux étudiés (Fig. 53-55). Cette tendance, si elle est confirmée au niveau de la protéine de la calmoduline, peut induire une diminution du taux des complexes calmoduline-calcium formés, qui peuvent activer la MLCK, ce qui peut alors ramener la contraction musculaire, anormalement élevée en HI, à son niveau normal. De même, chez les rats soumis à l'HI, l'EI fait augmenter le niveau d'expression des Tpm2 et Tpm3 au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 53) et de l'aorte abdominale (Fig. 54), ainsi que des Tpm1 et Tpm2 des artères mésentériques (Fig. 55). Si le taux protéique de la tropomyosine est aussi augmenté par l'EI, ceci favorise l'inhibition de la caldesmone, ce qui à son tour inhibe la MLCK et favorise la relaxation des CMLV.

Les résultats obtenus par Q-PCR, nous aident à comprendre les phénomènes moléculaires situés au niveau de l'expression des gènes sous-jacents aux changements physiologiques observés. Des études au niveau protéique sont alors nécessaires pour confirmer la tendance observée au niveau de l'expression des ARNm. Il est montré dans la littérature que les changements du niveau d'expression des quatre isoformes de la tropomyosine (Marston S. et El-Mezgueldi M., 2008) (Martin C. et Gunning P., 2008) (Schevzov G. et coll., 2005) aussi bien que les 3 isoformes de la calmoduline (Yea Q. et coll., 1997) (Huo L. et coll., 2005) (Koledova VV. et Khalil RA., 2006) à l'échelle de l'ARNm sont la plupart du temps traduit à l'échelle protéines au niveau des CMLV

des mammifères. Ceci rend probable le fait que nos observations seront traduites à l'échelle protéique.

Pour confirmer les données recueillies par PCR en temps réel, et se fondant sur nos résultats aussi bien que sur la littérature, nous avons choisi d'étudier au niveau protéique les 4 gènes les plus exprimés au niveau des CMLV et les plus affectés par l'HI et l'EI (Sayed A. et coll., 2010) (Antilla K. et coll., 2006) (Antilla K. et coll., 2008) (Dahan D. et coll., 2012) : les 3 isoformes du récepteur sensible à la ryanodine (RyR1, RyR2 et RyR3) ainsi que le canal TRPV4.

Les résultats que nous avons obtenus par Western blot, confirment les résultats de Q-PCR et les données de la littérature : ils révèlent que les muscles lisses vasculaires expriment au niveau protéique, aussi bien qu'au niveau des ARNm, les 3 isoformes de RyR sans prédominance d'un isoforme sur l'autre la non-prédominance n'est pas montrée clairement dans les résultats !!! (Marks AR, 1992) (Neylon CB. et coll., 1995) (Morel JL. et coll., 2009) (Mironneau J. et coll., 2001) (Morel JL. et coll., 2004) (Lanner JT. et coll., 2010). Ainsi, l'expression des isoformes RyR est confirmée au niveau de l'aorte thoracique (Fig. 62), l'aorte abdominale (Fig. 63) et les artères mésentériques (Fig. 64) (Neylon CB. et coll., 1995) (Zheng YM. et coll., 2008) (Morel JL. et coll., 2004).

De même pour la protéine TRPV4, nos résultats montrent que cette protéine est bien exprimée au niveau de l'aorte thoracique, de l'aorte abdominale et des artères mésentériques (Fig. 62-64). Ceci confirme nos résultats obtenus par Q-PCR, et correspond aux résultats des études précédentes (Inoue R. et coll., 2006) (Tanaka R. et coll., 2008) (Di A. et Malik AB., 2010) (Early S. et coll., 2010) (Guibert C. et coll., 2011) (Early S. et coll., 2015) montrant que la protéine TRPV4 est exprimée au niveau de la membrane plasmique des muscles lisses vasculaires de l'aorte et des artères mésentériques.

En ce qui concerne les effets de l'HI et de l'EI sur l'expression protéique de ces récepteurs-canaux calciques, nos résultats révèlent que les effets de l'HI et l'EI dépendent du tissu étudié, et que même l'interaction entre ces deux facteurs est dépendante du tissu lui-même (Fig. 62-64). Ainsi, nous trouvons que l'HI n'a pas d'effet sur l'aorte abdominale (Fig. 63) et que les artères mésentériques sont les plus sensibles à l'effet de l'HI (Fig. 64) : la protéine RyR2 et RyR2 diminue, alors que le RyR3 et le TRPV4 augmentent leur taux d'expression protéique en réponse à l'HI en absence de l'EI. En outre, au niveau de l'aorte thoracique, l'HI augmente le taux protéique de RyR2 et RyR3 et pas celui de RyR1 et de TRPV4 (Fig. 62).

Ces réponses différentes peuvent être liées à la structure et fonction de l'artère mésentérique, qui diffèrent des deux artères élastiques (l'aorte abdominale et thoracique). Les artères mésentériques étant des artères musculaires, leur densité en CMLV est plus importante que dans l'aorte thoracique et abdominale, ceci confirme notre hypothèse suggérant que l'effet de l'HI est principalement lié aux CMLV. Des résultats similaires sont observés dans des études réalisées par Jurkovicova et Shimoda et leurs collaborateurs, qui montrent que l'application d'une hypoxie continue induit une augmentation de l'expression protéique des isoformes 2 et 3 de RyR mais pas de l'isoforme 1 au niveau des reins des souris (Jurkovicova D. et coll., 2008) et au niveau des CMLV pulmonaires (Shimoda LA. et Polak J., 2011). En outre Dahan et ses collaborateurs ont montré que l'isoforme 2 des RyR est la seule isoforme qui est sur-exprimée par l'hypoxie continue au niveau des CMLV pulmonaires, les expressions des isoformes 1 et 3 restant inchangées (Dahan D. et coll., 2012). En outre, nous avons remarqué l'absence d'effet de l'HI sur l'expression protéique de RyR1 dans l'aorte thoracique, abdominale et artères mésentériques, alors qu'elle (HI) a fait augmenter significativement le taux d'ARNm du gène *Ryr1* au niveau des 3 tissus vasculaires. Ceci peut être expliqué par la présence des ARNm demi-vie, qui sont détectés par la Q-PCR mais qui sont non stables et se détruisent avant leur traduction en protéine. D'ailleurs, l'efficacité de la traduction peut aussi influencer le taux d'ARNm qui se transforme en protéine. Et comme l'HI est une condition stressante pour l'organisme, elle pourra jouer un rôle dans la réduction de l'efficacité de la traduction.

En ce qui concerne le récepteur TRPV4, nos résultats montrent que l'HI induit une sur-expression de la protéine TRPV4 au niveau des artères mésentériques seulement (Fig. 64), alors que son niveau d'expression en ARNm était augmenté par l'HI dans les 3 tissus vasculaires. Ceci peut être associé aux différents mécanismes de régulation post-transcriptionnelle dans les différents tissus. Des études précédentes révèlent que l'hypoxie intermittente induit une sur-expression protéique du récepteur TRPV4 au niveau des cellules musculaires cardiaques en culture (Parpaite T. et coll., 2016) ainsi qu'au niveau des astrocytes du système nerveux central des rats (Butenko O. et coll., 2012). L'absence de l'effet de l'HI sur la protéine TRPV4 au niveau des artères élastiques peut être associée aux différences structurales entre ces dernières et les artères mésentériques. En effet, les artères mésentériques, qui sont des artères musculaires de résistance, réagissent au stress (hypoxie ou exercice physique) augmentant le débit sanguin, d'une façon différente de celle subie par les artères élastiques et les artérioles (Baron-Menguy C.

et coll., 2010) (Freidja ML. et Henrion D., 2011). D'autre part, l'effet de l'EI est observé sur le TRPV4 au niveau des 3 tissus (Fig. 62-64). Etant donné les différences structurelles entre ces trois artères, dont deux sont des artères élastiques avec une structure riche en fibres élastiques, et la troisième est une artère musculaire avec une structure riche en CMLV (Mulvany MJ., 2002) (Loufrani L et Henrion D., 2008), nous laisse suggérer que l'HI affecte le TRPV4 des CMLV. En revanche, il semble que l'EI peut toucher le TRPV4 exprimés dans les CMLV ainsi que dans d'autres constituants qui sont présents avec des proportions semblables dans tout type d'artères. Ces constituants sont probablement les cellules endothéliales (Ledoux J. et coll., 2006) (Sonkusare SK. et coll., 2012), qui se trouvent dans l'intima de toutes les artères et qui sont connues pour être impliquées dans la réactivité vasculaire en réponse à l'exercice physique (Green DJ. et coll., 2013) (Green DJ. et Smith KJ., 2017).

Au niveau de l'aorte abdominale, le niveau des 4 protéines (RyR1 -3 et TRPV4) est réduit par l'EI (Fig. 62), alors que le taux de protéine de RyR3 est inchangé par l'EI dans l'aorte thoracique et RyR2 est inchangé par l'EI dans les artères mésentériques (Fig. 62) et (Fig. 64). Ces observations nous indiquent que les différences dans l'expression protéique des isoformes de RyR sont tissu-spécifiques

Les données de la littérature concernant l'effet de l'exercice physique sur le niveau d'expression protéique des RyR1-3 et de la TRPV4 sont diversifiées. En effet, une sur-expression des RyR par l'exercice est observée au niveau des muscles cardiaques (Antilla K. et coll., 2008) (Antilla K. et coll., 2006), ainsi qu'une augmentation de l'activité des RyR dans les muscles vasculaires (Witczak AC. et coll., 2005). De plus, Chen et ses collaborateurs ont montré que l'exercice n'affecte pas le niveau d'expression protéique de TRPV4 dans le tissu adipeux des rats (Chen N. et coll., 2015), alors que Sayed et ses collaborateurs ont mis en évidence une augmentation de niveau protéique de TRPV4 au niveau de l'artère fémorale des rats suite à leur course sur un tapis roulant (Sayed A. et coll., 2010). Ceci nous amène à constater que l'effet de l'exercice physique sur le taux d'expression protéique des RyR et TRPV4 dépend de plusieurs facteurs, dont essentiellement le protocole d'entraînement suivi (intensité, durée, temps). D'autres facteurs pouvant influencé l'effet de l'exercice sont l'espèce-modèle expérimental utilisée dans l'étude et le tissu sur lequel chaque étude est réalisée.

En résumé, l'HI et l'EI changent le profil d'expression protéique des 4 gènes clés de la signalisation calcique des CMLV d'une façon dépendante du gène et du tissu. La différence dans

la réponse à l'HI et l'EI entre les RyR et le TRPV4 est associée à leurs localisations différentes au niveau de la CMLV. En effet, les RyR sont des protéines du RS, alors que le TRPV4 est une protéine de la membrane plasmique des CMLV, ce qui rend les Trpv4 plus susceptibles à des interactions avec d'autres protéines intracellulaires et extracellulaires. Par contre, l'interaction des RyR est limitée par des protéines à l'échelle intracellulaire. De plus, la différence de la réactivité de chaque isoforme de protéines RyR peut être due à leurs différences de distribution au sein du réticulum sarcoplasmique.

Hypoxie intermittente, entraînement physique intensif et muscles squelettiques :

Mais les complications associées au SAOS ne sont pas limitées au système cardiovasculaire. Les études montrent que le SAOS affecte aussi le système endocrine (intolérance du glucose, dyslipidémie) et les systèmes nerveux central et sympathique (déficience cognitive) (Jordan AS. et coll., 2014) (Matsumoto T. et coll., 2018). Mais le diabète et l'hypertension restent les comorbidités les plus communément associées au SAOS (Pillar G. et Shehadeh N., 2008) (Javaheri S. et coll., 2017). Ces deux derniers sont également associés à la sarcopénie (Matsumoto T., 2018), une maladie caractérisée par une perte de la masse musculaire squelettique accompagnée d'une réduction de sa force et sa fonction (Rosenberg IH. et coll., 1997) (Kim TN. et coll., 2013). De même, le SAOS est associé au vieillissement et à l'obésité (Chen X., 2016), deux conditions dans lesquelles une déplétion des muscles squelettiques aussi qu'une accumulation des graisses dans ces muscles sont enregistrées (Cruz-Jentoft A., 2010) (Matsumoto T. et coll., 2018). Prises ensemble, ces données suggèrent qu'une corrélation importante existe entre le SAOS et les muscles squelettiques.

En effet, des recherches réalisées par Shortt et Thomas et leurs collaborateurs (Shortt CM. et coll., 2013) (Shortt CM. et coll., 2014) (Thomas A. et coll., 2017) montrent (on utilise très peu le verbe révéler dans les textes scientifiques en français) que les apnées du sommeil induisent un remodelage structural aussi bien que des changements bioénergétiques des muscles squelettiques. De plus, nos résultats de Q-PCR obtenus au niveau des tissus musculaires lisses vasculaires, ont montré un effet dépendant du tissu de l'HI et de l'EI. Prises ensemble, toutes ces données nous ont encouragés à évaluer les effets de l'HI et de l'EI sur l'expression des mêmes

gènes responsables de la gestion de calcium mais sur un autre type de muscle sollicité lors de l'exercice physique (dans notre cas la course de rats sur le tapis roulant) : les muscles squelettiques de la partie postérieure des pattes des rats, incluant le muscle gastrocnémien, le muscle soléaire et le muscle plantaire. Nous avons choisi ces 3 muscles parce qu'ils présentent des profils différents (muscle rapide vs lent), ce qui nous permet d'examiner l'impact différentiel d'un exercice avec une forte intensité de durée moyenne sur ces muscles.

Nous avons pu vérifier que les gènes *Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3*, *Trpv4*, *Atp2a1*, *Atp2a2* et *Itp3r1* sont tous exprimés au niveau du muscle gastrocnémien (Fig. 56), plantaire (Fig. 57) et soléaire (Fig. 58), alors que *Itp3r3* a un taux d'expression très minime dans les 3 muscles (Fig. 56-58). De plus, nos résultats révèlent que dans les groupes témoins (N), les gènes *Atp2a1* et *Atp2a2* codant respectivement pour les canaux *SERCA1* et *SERCA2*, possèdent le plus haut niveau d'expression au niveau des trois muscles squelettiques. L'abondance des *SERCA* est associée à leur rôle important dans les muscles squelettiques. En effet, les muscles squelettiques subissent des transformations importantes en réponse à des situations physiologiques ou pathologiques. Parmi ces transformations, la modification de la vitesse de contraction et de la relaxation est la plus importante. Plusieurs protéines de gestion de calcium sont impliquées dans le changement de la vitesse de contraction (*RyR*, *IP3R*, ..) (Quane KA. et coll., 1993) (Santulli G. et coll., 2017) mais pour la relaxation, l'expression des *SERCA* est la seule responsable de la capacité de recapture du Ca^{2+} , ce qui rend leur présence dans les muscles squelettiques essentielle (Kanzaki K. et coll., 2017) (Balog EM., 2010) (Wada M. et coll., 2013).

Quant aux *RyR*, nos résultats montrent qu'après les gènes codant aux pompes *SERCA*, l'isoforme 3 est le plus exprimé au niveau des 3 muscles squelettiques étudiés (Fig. 56-58). Il est connu que l'isoforme 1 des *RyR* prédomine au niveau des muscles squelettiques des mammifères (Santulli G. et coll., 2017) (Marks AR. et coll., 1989) (Takeshima H. et coll., 1989), et que l'isoforme *RyR3*, isolée pour la première fois au niveau du cerveau, est largement exprimée au niveau du muscle squelettique ainsi qu'au niveau d'autres tissus sans que sa fonction soit vraiment claire (Santulli G. et coll., 2017). Nos résultats sont, en partie, en accord avec la littérature, quant à l'abondance de *RyR3* dans les muscles squelettiques des mammifères. En revanche, nos résultats diffèrent de la littérature par le fait que le *RyR3* est plus abondant que *RyR1* dans le muscle gastrocnémien (Fig. 56), le muscle plantaire (Fig. 57) et le muscle soléaire (Fig. 58). Ceci suggère que le *RyR3*, dont la fonction n'est pas encore bien connue, semble jouer

un rôle important dans la contraction des muscles squelettiques en gérant la signalisation calcique dans ces tissus.

En outre, nous avons observé que l'ARNm de TRPV4 est présent dans les 3 muscles squelettiques des rats (Fig. 56-58). La présence de ce récepteur membranaire au niveau des muscles squelettiques est déjà documentée par Pritschow, Kusudo, Tiffany et leurs collaborateurs chez les mammifères (Pritschow BW. et coll., 2011) (Kusudo T. et coll., 2011) (Tiffany CH. et coll., 2012). D'autre part, en accord avec les résultats de Jaimovich, Araya, Mondin, Antigny, Tjondrokoesoemo et leurs collaborateurs, nos résultats montrent une expression de l'ARNm du récepteur IP3R type 1 au niveau des fibres musculaires squelettiques des mammifères (Jaimovich E. et coll., 2000) (Araya R. et coll., 2003) (Mondin L. et coll., 2009) (A. Tjondrokoesoemo. et coll., 2013) (Antigny F. et coll., 2014). L'expression des gènes codant pour les TRPV4 et IP3R1 dans les cellules musculaires squelettiques des rats dans notre modèle, suggère que ces récepteurs (une fois traduit à l'échelle protéique) vont participer de manière importante à la signalisation calcique de ces cellules, ce qui les rend des cibles de tout stimulus stressant tel que l'HI et l'EI.

Concernant l'hypoxie intermittente, cette dernière fait augmenter significativement l'expression des gènes Ryr1, Ryr2, Ryr3, Trpv4, Atp2a1, Atp2a2, Itpr1, codant respectivement pour les récepteurs, les canaux et les pompes calciques RyR1, RyR2, RyR3, SERCA1, SERCA2, TRPV4, IP3R1 dans les trois tissus musculaires squelettiques étudiés (Fig. 55-57). Il est à noter qu'aucun changement de l'expression du gène Itp3r3, codant pour l'IP3R3, n'est détectable dû à son faible niveau d'expression dans les 3 muscles (Fig. 56-58).

Parmi ces protéines de gestion du calcium, nos résultats indiquent que le niveau d'expression des gènes codant pour les pompes SERCA1 et SERCA 2 dans le muscle gastrocnémien (Fig. 56), le SERCA1 (après le RyR1) dans le muscle plantaire (Fig. 57) et le SERCA2 dans le muscle soléaire (Fig. 58) sont les plus sensibles à l'HI. Les données de la littérature révèlent que le changement du niveau d'expression de ces pompes en réponse à l'exposition à l'HI dépend de la durée de cette exposition. Ainsi, une étude réalisée par Schortt et ses collaborateurs a montré que l'exposition des rats à de courte (ou moyenne) durée d'hypoxie intermittente entre 1 et 3 semaines induit une augmentation de l'expression des SERCA 1 et 2 au niveau des muscles squelettiques (Shortt CM. et coll., 2013). Ceci s'accompagne d'un changement des niveaux d'expression respectifs de SERCA2 et SERCA1 qui varient vers une prédominance de SERCA1,

ce qui est concomitant à la transformation des fibres lentes en fibres rapides. A l'inverse, une autre étude réalisée par Liu et ses collaborateurs montre qu'une longue exposition des rats à l'HI (5 semaines ou plus) fait diminuer le niveau d'expression des SERCA 1 et SERCA 2 (Liu YH. et coll., 2009), ceci étant accompagné d'une transformation des fibres musculaires rapides en fibres lentes.

Dans notre étude, au niveau du muscle plantaire, l'exposition à l'HI fait augmenter le niveau d'expression d'ARNm de SERCA 1 à niveau supérieur que celui de SERCA 2, alors qu'il lui était inférieur dans le groupe témoin avant exposition à l'HI (Fig. 57). Ceci sera probablement accompagné à long terme, d'une transition des fibres lentes en fibres rapides. Ces derniers sont plus sensibles à la fatigue, ce qui va induire une réduction du temps d'endurance de ce muscle. Pour les autres protéines, nos résultats aussi bien que la littérature révèlent que l'exposition à l'hypoxie fait augmenter le niveau d'expression de TRPV4 (Wu QF. et coll., 2017) (Zhang SJ. et coll., 2006) et des RyR (Wang H. et coll., 2003) (Kubasov IV. et coll., 2014) au niveau des muscles squelettiques. Un des mécanismes par lequel l'HI induit une sur-expression des ARNm des gènes codant ces protéines de gestion du calcium dans les muscles squelettiques est probablement l'activation des facteurs de transcription sensible à l'hypoxie. Parmi ces facteurs, HIF-1 alpha (hypoxia inducible factor-1 alpha) est connu pour activer plusieurs voies de signalisation en réponse à l'HI, capables de déclencher une sur-expression d'un grand nombre de gènes codant pour ces protéines. Des études précédemment réalisées au sein de notre laboratoire, utilisant le même protocole d'exposition à l'HI, révèlent que cette dernière induit une augmentation de l'activité de HIF-1 alpha chez les souris soumis à l'hypoxie intermittente (Belaidi E. et coll., 2016) (Gras E. et coll., 2016). Ceci nous amène à proposer que dans notre étude, l'HI induit une suractivation du HIF-1 alpha des rats, qui à son tour a induit la sur-expression des canaux-recepteurs et pompes calciques dans les muscles squelettiques.

D'autre part, dans nos expériences, l'EI fait aussi augmenter le niveau d'expression des ARNm de SERCA 1 et 2, ainsi que les autres récepteurs-canaux : RyR1-3, IP3R1 et TRPV4 dans les trois muscles squelettiques. Nos résultats sont en accord avec ceux de Bueno et ses collaborateurs montrent, dans leur étude réalisée sur des souris, que 8 semaines d'entraînement intensif induisent une augmentation de l'expression d'ARNm des SERCA1, SERCA 2, RyR1, RyR2 et RyR3 au niveau des muscles plantaire et soléaire. En augmentant le niveau d'expression de l'ARNm des protéines de la libération de calcium d'un part (RyR1-3) et des protéines de la

recaptage de calcium d'autre part (SERCA1-2), l'exercice physique assure ainsi la régulation des quantités de calcium cytosolique requises pour réaliser les cycles de contraction-relaxation et favoriser, par conséquent, un bon fonctionnement des muscles squelettiques (Bueno CR. et coll., 2010). En revanche, Kubo et ses collaborateurs montrent que l'exercice physique intensif et modéré induit une augmentation de l'expression de l'ARNm de SERCA2 mais pas de SERCA1 au niveau du muscle gastrocnémien des rats, ce qui améliore leur performance (en terme d'endurance) (Kubo H. et coll., 2003). Ce résultat inverse de Kubo, nous laisse constater que l'effet de l'EI sur les muscles squelettiques est très variable en fonction du tissu et du gène étudié.

Pris ensemble, ces résultats montrent que l'EI comme l'HI affectent la transcription des gènes responsables de la gestion du calcium au niveau des muscles squelettiques, ce qui peut avoir plusieurs effets sur ces muscles, telles que la fatigue et la transformation de structure (fibres lentes en rapides et vice versa) en fonction de l'activation/l'inactivation des muscles et de leur contenu en enzymes oxydatives. Ceci a été montré par un certain nombre d'études, qui ont décrit les modifications des muscles squelettiques en réponse à l'EI (Gordon T. et Patullo M., 1993) (Hofmann S. et Pette D., 1994) (Howlett RA. et Hogan MC., 2007) (Antilla K. et coll., 2008) et indiquent que les différents types d'exercice induisent des modifications structurales et fonctionnelles différentes et spécifiques. Dans la majorité des cas, il s'agit d'une transformation des fibres musculaires vers le type rapide. Selon le protocole d'exercice suivi, le changement de la vitesse de contraction du muscle squelettique est différent. Par exemple, on trouve dans des cas physiologiques aussi bien que dans des modèles expérimentaux (Buller A. et coll., 1990) (Guttman E. et coll., 1975) (Luedekema JD. et coll., 2004), que l'exercice intensif induit une augmentation de la vitesse de contraction du muscle soléaire (qui est initialement un muscle à contraction lente). Ceci le transforme en un muscle à contraction rapide, en lien avec un effet de l'EI sur la composition histo-enzymatique des fibres (Guth L. et coll., 1988) (Yellin H., 1979) (Howlett RA. et Hogan MC., 2007) (Antilla K. et coll., 2008) aussi bien que sur les protéines régulatrices des filaments fins. Pour cette raison, nous avons ensuite étudié le niveau d'expression des gènes codant pour les protéines troponine-tropomyosine qui sont les régulatrices essentielles du couplage excitation-contraction.

Nos résultats montrent que les 3 muscles squelettiques expriment les ARNm de la troponine 1 et 3 (Fig. 59-61) et des 4 isoformes de la tropomyosine avec une prédominance : de l'isoforme 1 la

tropomyosine suivi par l'isoforme 1 de la troponine au niveau du muscle gastrocnémien (Fig. 59), de l'isoforme 1 de la troponine suivi par l'isoforme 3 de la troponine au niveau du muscle plantaire (Fig. 60) et de l'isoforme 1 de la tropomyosine suivi par l'isoforme 3 de la troponine au niveau du muscle soléaire (Fig. 61).

En outre, l'HI induit une augmentation globale des Tnnt1, Tnnt3 et Tpm1, alors qu'une diminution globale des Tpm2, Tpm3 et Tpm4 au niveau du muscle gastrocnémien (Fig. 59).

Au niveau du muscle plantaire, l'HI fait augmenter le taux d'ARNm de Tnnt1, Tnnt3, Tpm1 et Tpm2, alors qu'elle entraîne une baisse de ce taux de Tpm3 et Tpm4 (Fig. 60). En outre, au niveau du muscle soléaire, l'HI induit une augmentation globale du taux ARNm du Tnnt1 et Tnnt3 alors qu'elle induit une diminution du Tpm3 (Fig. 61). Ces différences de l'effet de l'hypoxie intermittente peuvent être liés aux différences structurelles-fonctionnelles de ces 3 muscles squelettiques. En effet, le muscle plantaire est composé en majorité de fibres rapides blanches (70%), alors que le muscle soléaire est un muscle rouge constitué majoritairement de fibres lentes (plus de 95%). De même, le muscle gastrocnémien superficiel (utilisé dans toutes nos expériences) est, comme le muscle soléaire, constitué en majorité des fibres musculaires rouges à faibles capacités oxydatives. Nous pouvons donc supposer que chez les rats, les fibres musculaires squelettiques les plus sensibles à l'hypoxie intermittente sont les fibres rouges lentes. Ces résultats sont compatibles avec des études réalisées antérieurement, dont les résultats suggèrent que les fibres lentes sont plus susceptibles à répondre à l'hypoxie chronique en réduisant la production des enzymes oxydatives (Luedekea JD. et coll., 2004) (Hochachka P. et coll., 1998).

Concernant l'effet de l'EI, nos résultats indiquent qu'au niveau du muscle gastrocnémien, l'EI fait diminuer globalement le niveau relatif en ARNm des gènes Tnnt1, Tnnt3, Tpm1 et Tpm4 (Fig. 59). Au niveau du muscle plantaire (Fig. 60) l'EI induit une diminution globale des taux de l'ARNm des gènes Tnnt1, Tnnt3, Tpm1 et Tpm2. Cette diminution de l'ARNm des protéines régulatrices de l'excitation-contraction par l'EI dans les muscles squelettiques s'opposent à l'effet de l'HI sur ces protéines.

Pris ensemble, nos résultats montrent que les fonctions des muscles squelettiques, comme des muscles lisses vasculaires, sont altérés par l'HI, et l'entraînement physique intensif peut jouer un rôle correcteur des effets de l'HI au niveau de ces muscles, surtout au niveau des acteurs du

couplage excitation-contraction, en régulant la sur-expression des gènes *Tnnt1* et *Tnnt3*, codant pour les troponine T 1 et 3, et *Tpm1* codant pour l'isoforme 1 de la tropomyosine.

Il reste à noter que ces modifications observées dans les taux d'ARNm des gènes étudiés nous donnent une idée des changements qui peuvent être applicables ou non à l'échelle protéique. C'est ce que nous avons eu dans nos expériences de Western blot, où les changements observés dans le niveau d'ARNm de *RyR1*, *RyR2*, *RyR3* et *TRPV4* ne sont pas tous observés à l'échelle protéique. Ceci peut être associé aux différents mécanismes post-transitionnels tissu-dépendants où seule une partie de l'ARNm est traduite en protéines (Schuller AP. et coll., 2018). En effet, la traduction des ARNm en protéines dans les cellules eucaryotes est un processus complexe et passe par quatre étapes : initiation, élongation, terminaison et recyclage ribosomal (Schuller AP. et coll., 2018). Ce qui le rend le temps de la traduction des ARNm beaucoup plus long que le temps nécessaire pour la transcription et fait qu'une réponse à l'échelle protéique à un changement extérieur est beaucoup plus complexe que la réponse à l'échelle des ARNm (Pavlov MY. et coll., 2009). Ainsi, des études réalisées sur l'effet des stimuli extérieurs (e.g. sport) sur les muscles squelettiques révèlent que les changements au niveau ARNm de la chaîne lourde de la myosine, se déclenchent quelques heures après la soumission au stimulus. En revanche, les changements de l'expression protéique ne sont observés que 10 jours après le début de l'exposition au même stimulus (Termin A. et Pette D., 1992) (Hueyk K. et coll., 2003).

VI.2. Conclusions et perspectives

Le travail de cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude de l'effet de l'hypoxie intermittente chronique, la conséquence majeure du SAOS, et de l'entraînement physique intensif sur la structure et la fonction des artères et de leur tissu musculaire lisse, et du tissu musculaire squelettique dans un modèle murin. Le syndrome d'apnées obstructives du sommeil est une maladie chronique courante, caractérisée par des fermetures répétitives des voies aériennes supérieures pendant le sommeil. Ces fermetures entraînent une hypoxie intermittente et des réveils au cours du sommeil. L'association entre le SAOS et les maladies cardiovasculaires a été largement démontrée. L'HI représente un des processus pathogéniques clés dans le développement des maladies cardiovasculaires sous les conditions du SAOS.

Un des aspects novateurs de notre travail réside dans le fait qu'il examine l'effet de l'HI sur les cellules musculaires lisses de plusieurs types d'artères pour comprendre sa contribution dans les phénomènes d'hypertension, de la dysfonction et du remodelage vasculaire. Nous nous sommes intéressés plus particulièrement à l'effet de l'HI sur les paramètres physiologiques, la réactivité vasculaire aussi bien qu'à la voie de signalisation calcique au niveau des CMLV. De plus, un autre point spécifique de notre étude réside dans l'étude de l'effet de l'HI sur l'expression des protéines responsables du couplage excitation-contraction dans les muscles lisses vasculaires. Ceci nous a permis de le proposer comme un mécanisme "cible" par lesquels l'HI induit les changements pathophysiologiques observés. D'autre part, l'entraînement physique est reconnu pour ses bienfaits tant dans le traitement des maladies chroniques que dans leur prévention. L'entraînement physique à haute intensité (EI) est particulièrement connu pour la prévention des maladies cardiovasculaires malgré le fait que les mécanismes à l'origine de ces bénéfices restent mal compris. Ceci nous a encouragé à choisir l'EI comme un traitement/prévention de l'hypertension, de la dysfonction et du remodelage vasculaire induits par l'HI.

Les résultats que nous avons obtenus sont révélateurs. En effet, nous avons montré que 21 jours d'exposition à l'HI induisent chez les rats une élévation de la pression artérielle, de la fréquence cardiaque et de l'hématocrite. Ces changements physiologiques aboutissant aux complications cardiovasculaires ont plusieurs causes moléculaires. Tout d'abord, une installation d'un remodelage vasculaire au niveau des artères carotide et pulmonaire se traduit par

l'épaississement de leur intima-média est enregistrée au bout de 21 jours d'HI. Ce remodelage induit une diminution du diamètre de ces artères, ce qui par conséquent favorise l'augmentation de la pression artérielle systémique et pulmonaire. L'augmentation de la pression artérielle à son tour, est associée à une altération dans la signalisation calcique des CMLV. En effet, l'HI augmente le taux de calcium intracellulaire libéré du RS des CMLV des rats suite à leur stimulation par 10 mM de caféine. L'HI induit cette augmentation de $[Ca^{2+}]_i$ via la sur-expression des récepteurs, canaux et pompes calciques jouant un rôle fondamental dans la gestion du calcium dans les CMLV, à savoir RyR1, RyR2, RyR3, IP3R1 et les SERCA1 et 2 au niveau de la membrane du RS, et le canal TRPV4 au niveau de la membrane plasmique.

Ceci est mis en évidence au niveau moléculaire, par les résultats de Q-PCR et de Western Blot. A l'échelle des ARNm, l'HI induit une sur-expression de *Trpv4*, le gène codant pour le canal-récepteur membranaire des CMLV. Cette augmentation d'expression de *Trpv4*, une fois traduite à l'échelle protéique, peut induire une augmentation de l'influx calcique vers l'intérieur des CMLV. De même, l'HI fait aussi augmenter l'expression de l'ARNm des pompes calciques du RS : *Atp2a1* et *Atp2a2* qui, si cet effet se traduit au niveau protéique, vont favoriser l'entrée des quantités plus importantes de calcium dans le RS. D'autre part l'HI induit aussi une sur-expression de *Ryr1*, *Ryr2*, *Ryr3* et *Itp1* à l'échelle ARNm. Si les mêmes effets ont lieu au niveau protéique, ils peuvent expliquer l'augmentation du taux de calcium intracellulaire libéré suite à la stimulation des CMLV par 10 mM de caféine.

Nous avons vérifié cela dans des expériences en Western blot, qui se sont limitées au dosage de 4 des protéines concernées : les canaux RyR1-3 et TRPV4. Les résultats révèlent que l'HI induit une augmentation de l'expression protéique de RyR2 et RyR3 au niveau de l'aorte thoracique, et du RyR3 et TRPV4 au niveau des artères mésentériques. Ces résultats confirment donc en partie les résultats des quantifications d'ARNm. Le RyR2 et TRPV4 sont connus dans la littérature pour être sur-exprimés dans des complications cardiovasculaires dépendantes de l'hypoxie. Un élément intéressant dans nos résultats est que le RyR3 est rarement étudié dans les pathologies vasculaires, alors qu'il se révèle impliqué dans les changements moléculaires des CMLV qui sont à l'origine des complications cardiovasculaires associés à l'HI.

Par ailleurs, l'EI montre sa capacité à corriger les effets délétères de l'HI à toutes les échelles : physiologique, cellulaire et moléculaire. Ainsi, l'EI prévient la hausse de la pression artérielle et de la fréquence cardiaque observées chez les rats hypoxiques. De plus, l'entraînement physique

intensif corrige le remodelage vasculaire de la carotide en limitant son épaissement induit par l'HI, qui est connu pour être impliqué dans le développement des maladies cardiovasculaires.

Quant à la réactivité vasculaire, l'EI est capable d'atténuer la réponse vasoconstrictrice de l'aorte descendante en réponse à l'ET-1 et à la PE, et d'améliorer sa vasodilatation dépendante de l'endothélium induite par ACh. De plus, dans la signalisation calcique, l'EI est capable de réduire l'augmentation de la quantité de calcium libérée dans les CMLV induite par l'HI, probablement via son effet sur les SERCA 1 et 2. Ceci est confirmé à l'échelle moléculaire, quand l'EI induit une sur-expression des ARNm des pompes SERCA 1 et 2 dans les CMLV, ce qui est une réponse opposée aux effets de l'HI. Ceci, aura besoin d'être étudié à l'échelle protéique dans des travaux ultérieurs, et une fois confirmé, une augmentation des protéines SERCA va augmenter l'absorption du calcium dans le réticulum sarcoplasmique, ce qui va décroître le taux de Ca^{2+} et favoriser ainsi la relaxation des CMLV.

Notre étude rapporte des observations qui sont obtenues pour la première fois au niveau de l'effet de l'HI et de l'EI sur la transcription des gènes codant pour les protéines régulatrices du couplage excitation-contraction des CMLV. Les résultats obtenus à l'échelle des ARNm, en supposant qu'ils seront confirmés au niveau protéique dans des études ultérieures, nous permettent de proposer un mécanisme par lequel l'HI induit l'hypertension en favorisant la contraction des CMLV, ce qui peut être contrebalancé en partie par le mécanisme correcteur de l'EI qui favorise la vasodilatation. L'enchaînement des mécanismes proposé est le suivant : l'HI fait augmenter l'expression de la calmoduline, ce qui va probablement augmenter le nombre de complexe calcium-calmoduline qui seront formés au niveau des CMLV, ce qui va favoriser leur contraction. De plus, l'HI induit une diminution de l'expression de la tropomyosine, une protéine constituante du filament fin du muscle lisse, ce qui va encore favoriser la contraction des CMLV en réduisant l'inhibition de la MLCK.

D'autre part, l'EI s'oppose aux effets induits par l'HI sur la calmoduline. Ainsi, on trouve que l'EI induit une réduction de l'expression des 3 isoformes de calmoduline au niveau des trois artères étudiés. De même, pour la tropomyosine, quand les rats sont soumis à l'EI en présence de l'HI, l'EI s'oppose à la diminution induite par l'HI en augmentant le niveau d'expression surtout des Tpm1, Tpm2 et Tpm3 au niveau de l'aorte thoracique et des Tpm2 et Tpm4 de l'aorte abdominale, ainsi que des Tpm1 et Tpm2 des artères mésentériques.

L'entraînement physique intensif est donc capable de prévenir l'hypertension, le remodelage et la dysfonction des muscles vasculaires dépendants de l'HI, en jouant un double rôle : au niveau de la voie de signalisation calcique et au niveau du couplage excitation-contraction. La réalisation d'expériences de Western blot conçues pour tester le niveau de l'expression protéiques des Tpm, Calm, SERCA 1-2 et IP3R1 sont encore nécessaires pour valider certaines données de Q-PCR (tu as déjà vérifié en WB 4 des données de Q-PCR), ce qui nous permettrait de confirmer ces hypothèses sur le mode d'action de l'EI.

Pour résumer, je propose une synthèse de mes résultats dans une représentation schématique évoquant d'un part, les effets de l'HI observés chez les rats dans différents niveaux de réponses qui ont abouti aux complications cardiovasculaires. Et d'autre part, et parallèlement, les effets de l'EI dans la prévention et la correction des effets de l'HI sur ces memes niveaux (moléculaire, cellulaires et systémiques) (Fig. 65).

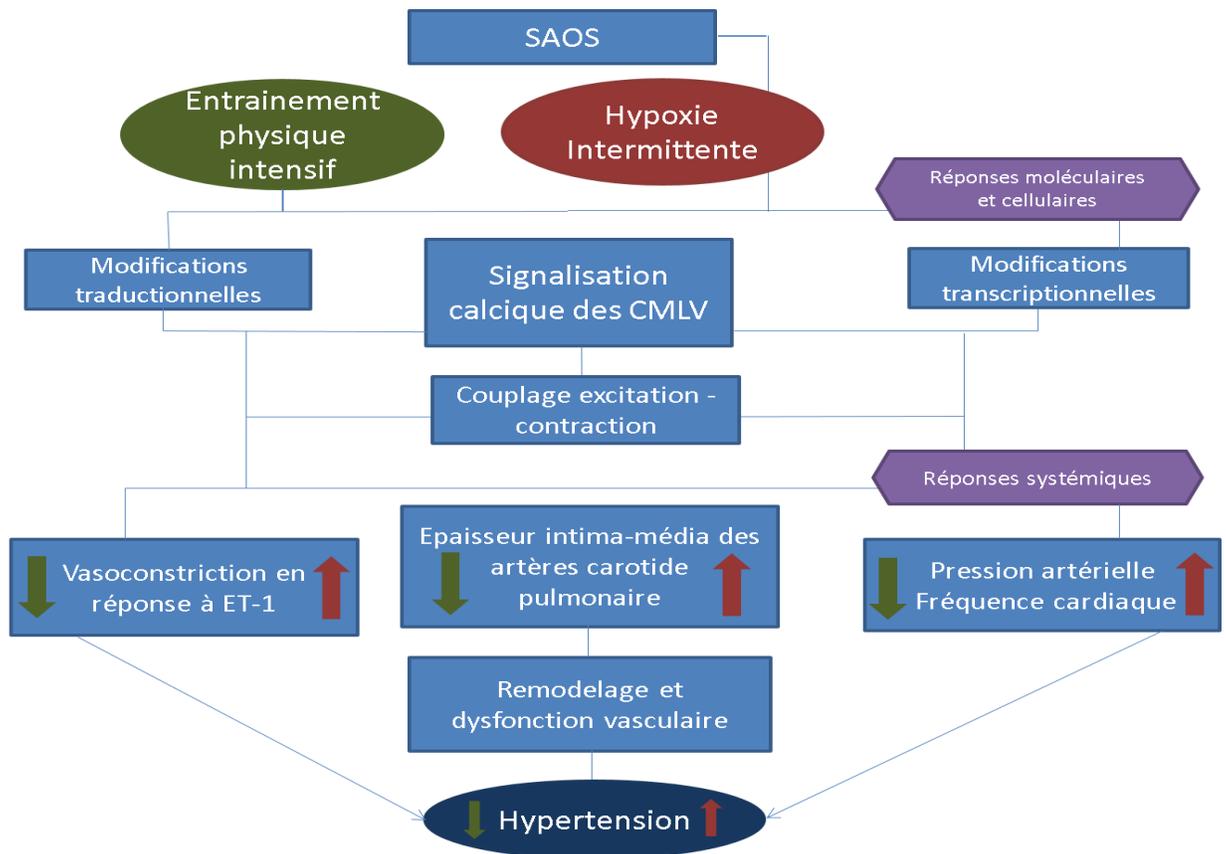


Figure 65 : Représentation schématique résumant les effets observés de l'hypoxie intermittente chronique et de l'entraînement physique intensif sur les réponses moléculaires, cellulaires et systémiques des rats Wistar (flèche rouge : effet de l'HI, flèche vert : effet de l'EI).

Comme nous l'avons évoqué auparavant, l'HI, dans SAOS, n'affecte pas seulement le système cardiovasculaire, et comme nous avons observé des effets dépendants du tissu de l'HI et de l'EI, nous avons évalué leur effets sur les muscles squelettiques.

Nos résultats montrent que l'HI et l'EI induisent un remodelage transcriptionnel au niveau des muscles squelettiques en modifiant le niveau d'expression des gènes responsables de la gestion calcique et du couplage excitation-contraction. L'effet correcteur de l'EI est observé au niveau de l'expression des protéines régulatrices du couplage excitation-contraction et des pompes SERCA.

Le travail réalisé au niveau des CMLV ouvre des perspectives nouvelles et demande une poursuite de la mise en évidence des acteurs à l'origine du développement de la pression artérielle. Parmi les pistes envisagées, il est nécessaire de continuer les expériences de mesure du calcium dans les CMLV, en utilisant le D1SR au lieu du Fluo-4 AM, ce qui nous permet de mesurer directement le calcium luminal du RS. Aussi, d'autres agonistes spécifiques de chaque canal-récepteur calcique doivent être utilisés (autre que le dantrolène pour les RyR ou la xestospongine pour IP3R), tel que la thapsigargine, un inhibiteur des pompes SERCA, et des analogues d'indole ou de benzothiophène qui sont des antagonistes des TRPV4. Ceci nous permettra d'avoir une connaissance plus complète de la contribution de chaque protéine dans la réponse calcique à l'HI et à l'EI. Ces expériences vont apporter des informations importantes quant à la contribution du calcium extracellulaire dans les réponses développées après exposition à l'HI et à l'EI. En revanche, jusqu'à ce jour, aucun bloqueur spécifique pour chacune des isoformes de RyR n'est développé, ce qui empêche l'étude de l'implication de chacune de ces isoformes dans la réponse de calcium au niveau du RS des CMLV. Pour cela, l'utilisation des rats génétiquement modifiés dans lesquels chaque isoforme des canaux-récepteurs ou pompes calciques est inhibé par knock-out serait utile, puisque cela permettrait de suivre l'effet de l'absence de cet isoforme sur la signalisation calcique aussi que sur tout autre pour effet de l'HI et de l'EI.

Ces nouvelles expériences pourraient permettre d'identifier quelle (s) isoforme (s) de RyR, IP3R, SERCA est/sont la (les) cible(s) pour le traitement et/ou la prévention des altérations et remodelages cardiovasculaires induits par l'HI.

Concernant le travail réalisé sur les muscles squelettiques, il faut se fonder sur les données déjà obtenues en Q-PCR pour continuer cette étude à l'échelle protéique par Western blot.

Des expériences d'évaluation fonctionnelle des muscles squelettiques pourront être ensuite réalisées pour vérifier si l'exercice intensif permettrait d'améliorer la capacité motrice chez les rats soumis ou non à l'HI. Cette évaluation pourrait être faite à l'aide de plusieurs tests, comme par exemple le test de la résistance à l'inclinaison. Il consiste à poser les rats sur un plan incliné et à mesurer l'angle maximal auquel l'animal peut rester accroché par ces pattes sur une planche de bois sans glisser. Ceci permettrait d'adapter notre protocole d'exercice de façon à améliorer la contractilité musculaire squelettique tout en évitant leur fatigue. Parce que le fatigue peut induire une inactivité de ces muscles et les rends incapables de s'opposer à l'effet de l'HI qui va stimuler la transformation des fibres lentes en fibres rapides à long terme. De plus, il faut que ce protocole soit adapté de façon qu'il reste encore efficace pour la prévention et le traitement des complications vasculaires observées chez les rats.

Le protocole d'entraînement physique intensif que nous avons adopté est donc efficace dans la prévention des complications vasculaires associées à l'HI, principal caractère pathogénique du SAOS. Ces données soutiennent l'hypothèse selon laquelle un entraînement intensif peut représenter une approche non-invasive, non-pharmacologique et complémentaire prometteuse pour le traitement de l'hypertension, du remodelage et de la dysfonction vasculaire associés à l'HI et au SAOS. Le protocole d'exercice physique, que nous avons adopté chez les rats doit être testé au premier lieu sur des sujets sains tout en mesurant leur PA, FC et le taux d'hématocrites. En fonction des résultats obtenus, ce protocole peut être appliqué ensuite chez des sujets sains mais soumis artificiellement à l'HI (au laboratoire). Finalement, si le protocole montre son efficacité sur les paramètres physiologiques mesurés, il peut être prescrit pour les patients de SAOS.

VII. Références bibliographiques

- Adams V., Linke A., Krankel N., Erbs S., Gielen S., Mobius- Winkler S., Gummert JF., Mohr FW., Schuler G., Hambrecht R. «Impact of regular physical activity on the NAD(P)H oxidase and angiotensin receptor system in patients with coronary artery disease.» *Circul. J.* 111 (2005): 555–562.
- Adams V., Reich B., Uhlemann M., Niebauer J. «Molecular effects of exercise training in patients with cardiovascular disease: focus on skeletal muscle, endothelium, and myocardium.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 313 (2017): H72-H88.
- Adapala RK., Thoppil RJ., Luther DJ., Paruchuri S., Meszaros JG., Chilian WM., Thodeti CK. «TRPV4 channels mediate cardiac fibroblast differentiation by integrating mechanical and soluble signals.» *J Mol Cell Cardiol.* 54 (2013): 45-52.
- Aggarwal S., Qamar A., Sharma V., Sharma A. «Abdominal aortic aneurysm: A comprehensive review.» *Exp Clin Cardiol.* 16 (2011): 11-15.
- Ahmed TA., El-Badri N. «Pericytes: The Role of Multipotent Stem Cells in Vascular Maintenance and Regenerative Medicine.» *Adv. Exp. Med. Biol.* 1079 (2018): 69-86.
- Akimzhanov AM., Boehning D. «IP3R function in cells of the immune system.» *WIREs Membr Transp Signal.* 1 (2012): 329–339.
- Alkahtani R., Mahavadi S, Al-Shboul O, Alsharari S, Grider JR, Murthy KS. «Changes in the expression of smooth muscle contractile proteins in TNBS- and DSS-induced colitis in mice.» *Inflammation.* 36 (2013): 1304-1315.
- Allahdadi KJ., Duling LC., Walker BR., Kanagy NL. «Eucapnic intermittent hypoxia augments endothelin-1 vasoconstriction in rats: role of PKCdelta.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 294 (2008): H920–H927.
- Alvarez GE., Halliwill JR., Ballard TP., Beske SD., Davy KP. «Sympathetic neural regulation in endurance-trained humans: Fitness vs. fatness.» *J Appl Physiol.* 98 (2005): 498–502.
- Alzayady KJ., Sebe-Pedros A., Chandrasekhar R., Wang L., Ruiz-Trillo I., Yule DI. «Tracing the Evolutionary History of Inositol, 1, 4, 5-Trisphosphate Receptor: Insights from Analyses of *Capsaspora owczarzaki* Ca²⁺ Release Channel Orthologs.» *Mol Biol Evol.* 32 (2015): 2236-2253.
- Amador FJ., Stathopoulos PB., Enomoto M., Ikura M. «Ryanodine receptor calcium release channels: lessons from structure-function studies.» *FEBS J.* 280 (2013): 5456-5470.
- Amberg GC., Navedo MF. «Calcium dynamics in vascular smooth muscle.» *Microcircul J.* 20 (2013): 281–289.
- American Heart Association. What is Cardiovascular Disease? 2017. [Http://www.heart.org/HEARTORG/Support/What-is-Cardiovascular-Disease_UCM_301852_Article](http://www.heart.org/HEARTORG/Support/What-is-Cardiovascular-Disease_UCM_301852_Article). (access January 2018).

- American Thoracic society. «Obstructive Sleep Apnea and Heart Disease.» *Am J Respir Crit Care Med.* 188 (2013): P1- P2. [Htts: //www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/obstructive-sleep-apnea-and-heart.pdf](https://www.thoracic.org/patients/patient-resources/resources/obstructive-sleep-apnea-and-heart.pdf)
- Andersen P., Kroese AJ. «Capillary supply in soleus and gastrocnemius muscles of man.» *Pflugers Arch.* 375 (1978): 245–249.
- Ando J., Kamiya A. «Blood flow and vascular endothelial cell function.» *Front Med Biol Eng.* 5 (1993): 245-264.
- Andreadis EA. *Hypertension and Cardiovascular Disease.* Springer International Pub. Switzerland (2016).
- Antigny F., Konig S, Bernheim L, Frieden M. «Inositol 1,4,5 trisphosphate receptor 1 is a key player of human myoblast differentiation.» *Cell Calc.* 56 (2014): 513-521.
- Anttila K, Järvilehto M, Mänttari S. «The swimming performance of brown trout and whitefish: the effects of exercise on Ca²⁺ handling and oxidative capacity of swimming muscles.» *J Comp Physiol B.* 178 (2008): 465–475.
- Anttila K, Mänttari S, Järvilehto M. «Effects of different training protocols on Ca²⁺ handling and oxidative capacity in skeletal muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar* L).» *J Exp Biol* 209 (2006): 2971–2978.
- Araya R, Liberona JL, Cárdenas JC, Riveros N, Estrada M, Powell J, Carrasco MA, Jaimovich E. «Dihydropyridine Receptors as Voltage Sensors for a Depolarization-evoked, IP3R-mediated, Slow Calcium Signal in Skeletal Muscle Cells.» *The J. of Gen. Physiol.* 121 (2003): 3-16.
- Arena R., Cahalin LP., Borghi-Silva A., Myers J. «The effect of exercise training on the pulmonary arterial system in patients with pulmonary hypertension.» *Prog Cardiovasc Dis.* 57 (2015): 480-488.
- Arif SH. «A Ca(2+)-binding protein with numerous roles and uses: parvalbumin in molecular biology and physiology.» *Bioessays.* (2009): 410-421.
- Armstrong RB. «Properties, distribution, and functions of mammalian skeletal muscle fibers.» *Exercise Bioenergetics and Gas Exchange.* (1996): 137–146.
- Arniges M., Vazquez E., Fernandez-Fernandez JM., Valverde MA. «Swelling-activated Ca²⁺ entry via TRPV4 channel is defective in cystic fibrosis airway epithelia.» *J Biol Chem.* 279 (2004): 54062–54068.
- Ashby MC., Tepikin AV. «ER calcium and the functions of intracellular organelles.» *Sem Cell Dev Biol.* 12 (2001): 11-17.
- Babu AS., Arena R., Myers J., Padmakumar R., Maiya AG., Cahalin LP., Waxman AB., Lavie CJ. «Exercise intolerance in pulmonary hypertension: mechanism, evaluation and clinical implications.» *Expert Rev Respir Med.* 10 (2016): 979–990.
- Badran M., Golbidi S., Devlin A., Ayas N., Laher I. «Chronic intermittent hypoxia causes endothelial dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity.» *Sleep Med.* 15 (2014): 596-602.
- Bady E., Achkar A., Pascal S., Orvoen-Frija E., Laaban JP. «Pulmonary arterial hypertension in patients with sleep apnoea syndrome.» *Thorax.* 55 (2000): 934-939.

- Baeyens N., Nicoli S., Coon BG, Ross TD., Van den Dries K., Han J., Lauridsen HM., Mejean CO., Eichmann A., Thomas JL., Humphrey JD., Schwartz MA. «Vascular remodeling is governed by a VEGFR3-dependent fluid shear stress set point.» *Elife*. 4 (2015): e04645.
- Baiklely K. «Troopomyosin: a new asymmetric protein component of muscle» *Nature*. 37 (1946): 360-368.
- Bailey TG., Perissiou M., Windsor M., Russell F., Golledge J., Green DJ., Askew CD. «Cardiorespiratory fitness modulates the acute flow-mediated dilation response following high-intensity but not moderate-intensity exercise in elderly men.» *J Appl Physiol*. 122 (2017): 1238-1248.
- Bailly S., Destors M., Grillet Y., Richard P., Stach B., Vivodtzev I., Timsit JF., Lévy P., Tamisier R., Pépin JL. «Obstructive Sleep Apnea: A Cluster Analysis at Time of Diagnosis.» *PLoS ONE*. 11 (2016): e0157318.
- Bakker AJ., Cully TR., Wingate CD., Barclay CJ., Launikonis BS. «Doublet stimulation increases Ca²⁺ binding to troponin C to ensure rapid force development in skeletal muscle.» *J Gen Physiol*. 149 (2017): 323-334.
- Baldi S., Aquilani R., Pinna GD., Poggi P., De Martini A., Bruschi C. «Fat-free mass change after nutritional rehabilitation in weight losing COPD: role of insulin, C-reactive protein and tissue hypoxia.» *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 5 (2010): 29-39.
- Balke CW., L. Goldman. «Excitation Contraction Coupling in Cardiac Muscle Is there a Purely Voltage-dependent Component?» *J Gen Physiol*. 121 (2003): 349–352.
- Balla Z., Hoch B, Karczewski P, Blasig IE. «Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II δ 2 and gamma isoforms regulate potassium currents of rat brain capillary endothelial cells under hypoxic conditions.» *J Biol Chem*. 277 (2002): 21306-21314.
- Balog EM. «Excitation-contraction coupling and minor triadic proteins in low-frequency fatigue.» *Exerc Sport Sci Rev*. 38 (2010): 135-142.
- Baró I., Eisner DA. «Factors controlling changes in intracellular Ca²⁺ concentration produced by noradrenaline in rat mesenteric artery smooth muscle cells.» *J. Physiol*. 482 (1995): 247–258.
- Baron-Menguy C., Toutain B., Cousin M. «Involvement of angiotensin II in the remodeling induced by a chronic decrease in blood flow in rat mesenteric resistance arteries.» *Hypertens Res* 33 (2010): 857-66.
- Barthlen GM. «Sleep disorders. Obstructive sleep apnea syndrome, restless legs syndrome, and insomnia in geriatric patients.» *Geriatrics*. 57 (2002): 34-39.
- Bayer C., Shi K., Astner ST., Maftei CA., Vaupel P. «Acute Versus Chronic Hypoxia: Why a simplified classification is simply enough.» *Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.* 80 (2011): 965-968.
- Beam KG., Franzini-Armstrong C. «Functional and structural approaches to the study of excitation-contraction coupling.» *Methods Cell Biol*. 52 (1997): 283–306.
- Beaudin AE., Waltz X., Hanly PJ., Poulin MJ. «Impact of obstructive sleep apnoea and intermittent hypoxia on cardiovascular and cerebrovascular regulation.» *Exp Physiol.*, 2017: 743-763.

- Belaidi E., Joyeux-Faure M., Ribuot C., Launois SH., Levy P., Godin-Ribuot D. «Major role for hypoxia inducible factor-1 and the endothelin system in promoting myocardial infarction and hypertension in an animal model of obstructive sleep apnea.» *J Am Coll Cardiol.* 53 (2009): 1309-1317.
- Belaidi E., Thomas A., Bourdier G., Moulin S., Lemarié E., Levy P., Pépin JL, Korichneva I., Godin-Ribuot D., Arnaud C. «Endoplasmic reticulum stress as a novel inducer of hypoxia inducible factor-1 activity : its role in the susceptibility to myocardial ischemia-reperfusion induced by chronic intermittent hypoxia.» *Int J Cardiol.* 1 (2016): 45-53.
- Bender DA. *Introduction to Nutrition and Metabolism - Fourth Edition.* CRC press: Taylor & Francis Group, Florida - USA (2014): 318-350.
- Berchtold MW., Brinkmeier H., Müntener M. «Calcium ion in skeletal muscle: its crucial role for muscle function, plasticity, and disease.» *Physiol Rev* 80 (2000): 1215-1265.
- Bergers G., Song S. «The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.» *Neuro Oncol.* 7 (2005): 452-464.
- Bergmann O., Bhardwaj RD., Bernard S., Zdunek S., Barnabé-Heider F., Walsh S., Zupicich J., Alkass K., Buchholz BA., Druid H., Jovinge S, Frisé J. «Evidence for cardiomyocyte renewal in humans.» *Science.* 324 (2009): 98–102.
- Berridge BR., John F. Van Vleet, Eugene Herman. «Cardiac, Vascular, and Skeletal Muscle Systems ». In *Toxicologic Pathology.* In: Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology, 3rd ed (Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R, Mahler MW, eds). Elsevier, Amsterdam, (2013): 1635-1665.
- Berridge MJ. «Calcium microdomains: organization and function.» *Cell Calc.* 40 (2006): 405–412.
- Berry RB., Budhiraja R., Gottlieb DJ., Gozal D., Iber C., Kapur VK. Marcus CL., Mehra R., Parthasarathy S., Quan SF., Redline S., Strohl KP., Ward SLD., «Rules for Scoring Respiratory Events in Sleep: Update of the 2007 AASM Manual for the Scoring of Sleep and Associated Events: Deliberations of the Sleep Apnea Definitions Task Force of the American Academy of Sleep Medicine.» *J. Clin. Sleep Med: JCSM.* 8 (2012): 597–619.
- Bers DM. «Cardiac excitation-contraction coupling.» *Nature* 415 (2002): 198-205.
- Besnier F., Labrunee M., Pathak A., Pavy-Le Traon A., Gales C., Senard JM., Guiraud T. «Exercise training-induced modification in autonomic nervous system: An update for cardiac patients.» *Ann. Phys. Rehab. Med.* 1001 (2016): 1-9.
- Bezprozvanny I. «The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.» *Cell Calcium.* 38 (2005): 261-72.
- Bigard X., Sanchez H., Birot O., Serrurier B. «Myosin heavy chain composition of skeletal muscles in young rats growing under hypobaric hypoxia conditions.» *J Appl Physiol.* 88 (2000): 479-486.
- Billaud M., Lohman AW., Johnstone SR., Biwer LA., Mutchler S., and Isakson BE. «Regulation of Cellular Communication by Signaling Microdomains in the Blood Vessel Wall.» *Pharmacol Rev.* 66 (2014): 513–569.

- Biodis. Physiologie animale- contraction musculaire. 2015. [Http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/physiologie-animale/physiologie-animale-4.html](http://www.vdsciences.com/pages/sciences-biologiques/biologie-animale/physiologie-animale/physiologie-animale-4.html) (access January 2018).
- Biolo G., Cederholm T., Muscaritoli M. «Muscle contractile and metabolic dysfunction is a common feature of sarcopenia of aging and chronic diseases: from sarcopenic obesity to cachexia.» *Clin Nutr.* 33 (2014): 737-48.
- Bixler EO, Vgontzas AN., Ten Have T., Tyson K., Kales A. «Effects of age on sleep apnea in men : I, Prevalence and severity.» *Am J Respir Crit Care Med.* 157 (1998): 144-148.
- Blausen S. Med. gallery of Blausen Medical. (2014) [Blausen.com: https://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/7/72/Blausen_gallery_2014.pdf](https://upload.wikimedia.org/wikiversity/en/7/72/Blausen_gallery_2014.pdf) (accès le 2018).
- Bobe R., Bredoux R., Corvazier E., Lacabartz-Porret C., Martin V., Kovács T., Enouf J. «How many Ca(2)+ATPase isoforms are expressed in a cell type? A growing family of membrane proteins illustrated by studies in platelets.» *Platelets.* 16 (2005): 133-150.
- Boczek NJ., Gomez-Hurtado N., Ye D., Calvert ML., Tester DJ., Kryshtal D., Hwang HS., Johnson CN., Chazin WJ., Loporcaro CG., Shah M., Papez AL., Lau YR., Kanter R., Knollmann BC., Ackerman MJ. «Spectrum and Prevalence of CALM1-, CALM2-, and CALM3-Encoded Calmodulin Variants in Long QT Syndrome and Functional Characterization of a Novel Long QT Syndrome-Associated Calmodulin Missense Variant, E141G.» *Circ Cardiovasc Genet.* 9 (2016):136-146.
- Bolton TB. «Mechanisms of Action of Transmitters and other Substances on Smooth Muscles.» *Physiol. Rev.* 59 (1979): 607-718.
- Bolton TB., Lang RJ., Takewaki T. «Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery.» *J Physiol.* 351 (1984): 549-572.
- Booth FW., Roberts CK., Laye MJ. «Lack of exercise is a major cause of chronic diseases.» *Compr Physiol.* 2 (2012): 1143–1211.
- Bootman MD., Lipp P., Berridge MJ. «The organisation and functions of local Ca²⁺ signals.» *J. Cell Sci.* 114 (2001): 2213–2222.
- Börjesson M., Onerup A., Lundqvist S., Dahlöf B. «Physical activity and exercise lower blood pressure in individuals with hypertension: narrative review of 27 RCTs.» *Br J Sports Med.* 50 (2016): 356-361.
- Boron WF., Boulpaep EL. *Medical Physiology: A Cellular and Molecular Approach* (2nd edition). Saunders/Elsevier, London - UK, 2009.
- Bouloukaki I., Mermigkis C., Tzanakis N., Kallergis E., Moniaki V., Mauroudi E., Schiza SE. «Evaluation of inflammatory markers in a large sample of obstructive sleep apnea patients without comorbidities.» *Mediators Inflamm.* 1 (2017): 1-13.
- Bourdier G., Flore P., Sanchez H, Pépin JL., Belaidi E., Arnaud C. «High-intensity training reduces intermittent hypoxia-induced ER stress and myocardial infarct size.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 310 (2015): H279-H289.

- Bramham J., Hodgkinson JL., Smith BO., Uhrin D., Barlow PN., Winder SJ. «Solution Structure of the Calponin CH Domain and Fitting to the 3D-Helical Reconstruction of F-Actin: Calponin.» *Structure*. 10 (2002): 249–258.
- Brenner B., Eisenberg E. «The mechanism of muscle contraction. Biochemical, mechanical, and structural approaches to elucidate cross-bridge action in muscle.» *Basic Res Cardiol*. 82 (1987): 3-16.
- Brozovich FV., CJ Nicholson, C.V. Degen, Yuan Z. Gao, M. Aggarwal and K.G. Morgan Stephanie W. Watts,. «Mechanisms of Vascular Smooth Muscle Contraction and the Basis for Pharmacologic Treatment of Smooth Muscle Disorders.» *Pharmacol. Rev.* 68 (2016): 476-532.
- Bubolz AH., Mendoza SA., Zheng X., Zinkevich NS., Li R., Gutterman DD., Zhang DX. «Activation of endothelial TRPV4 channels mediates flow-induced dilation in human coronary arterioles: role of Ca²⁺ entry and mitochondrial ROS signaling.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 302 (2012): H634–H642.
- Budhiraja R., Parthasarathy S., Quan SF. «Endothelial dysfunction in obstructive sleep apnea.» *J Clin Sleep Med*. 3 (2007): 409-415.
- Bueno CR., Ferreira JC., Pereira MG., Bacurau AVN., Brum PC. *J Appl Physiol*. 109 (2010): 702–709.
- Buller A., Eccles J., Eccles R. «Interaction between motoneurons and muscles in respect of the characteristic speed of their responses.» *J. Physiol*. 150 (1990): 417-439.
- Burdyga T., Richard JP. «Calcium Homeostasis and Signaling in Smooth Muscle.» In *Muscle Fundamental Biology and Mechanisms of Disease*, by Joseph Hill. Elsevier, San Diego - USA, (2012): 990-1025.
- Caillaud D, Galinier M, Elbaz M, Carrie D, Puel J, Fauvel JM. «Atherosclerosis: the role of nitric oxide.» *Presse Med*. 30 (2001): 41–44.
- Calcuttea A., Lindqvist P., Soderberg S., Henein MY. «Global and regional right ventricular dysfunction in pulmonary hypertension.» *Echocardiography*. 31 (2014): 164-171.
- Campen MJ., Shimoda LA., O'Donnell CP. «Acute and chronic cardiovascular effects of intermittent hypoxia in C57BL/6J mice.» *J Appl Physiol* 99 (2005): 2028–2035.
- Canale ED., Campbell, Gordon R., Smolich JJ. *Cardiac Muscle*. Springer, New York, (1986): 45-56.
- Cano-Pumarega I., Durán-Cantolla J., Aizpuru F., Miranda-Serrano E., Rubio R., Martínez-Null C., de Miguel J., Egea C., Cancelo L., Alvarez A., Fernández-Bolaños M., Barbé F. «Obstructive sleep apnea and systemic hypertension: longitudinal study in the general population : the Vitoria Sleep Cohort.» *Am J Respir Crit Care Med*. 184 (2011): 1299-1304.
- Cappelli H., Adapala R., Thoppil R., Ohanyan V., Luli J., Luther D., Paruchiri S., Meszaros JG., Chilian W., Thodeti C. «TRPV4 deficiency protects myocardium following myocardial infarction and transverse aortic constriction.» *FASEB J*. 1 (2014): 893.11.

- Caramelo C., Okada K, Tsai P, Linas S., Schrier SH. «Interaction of arginine vasopressin and angiotensin II on Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells.» *Kidney Internat.* 38 (1990): 47-54.
- Cardiovascular Disease By Country | World Heart Federation. [World-heart-federation.org, https://www.world-heart-federation.org/resources/cardiovascular-diseases-cvds-global-facts-figures](https://www.world-heart-federation.org/resources/cardiovascular-diseases-cvds-global-facts-figures): 2017. (access Septembre 2017).
- Carleson NRA., Birkett M. *Physiology of Behavior* (12th edition). Pearson, British Library – Malaysia, 2017: 320-360.
- Carlson JT., Hedner J., Elam M., Ejnell H., Sellgren J., Wallin BG. «Augmented resting sympathetic activity in awake patients with obstructive sleep apnea.» *Chest* 103 (1993): 1763-1778.
- Carter JR., Ray CA. «Sympathetic neural adaptations to exercise training in humans.» *Auton Neurosci* 188 (2015): 36–43.
- Carvajal JA., Germain AM., Huidobro Toro JP., Weiner CP. «Molecular Mechanism of cGMP-Mediated Smooth Muscle Relaxation.» *J of Cell Biol.* 184 (2000): 409–420.
- Castro-Grattoni AL., Alvarez-Buvé R., Torres M., Farré R., Montserrat JM., Dalmases M, Almendros I., Barbé F., Sánchez-de-la-Torre M. «Intermittent Hypoxia-Induced Cardiovascular Remodeling Is Reversed by Normoxia in a Mouse Model of Sleep Apnea.» *Chest.* 149 (2016): 1400-1408.
- Çetin S., Vural MG., Fırat H., Akdemir R. «Obstructive sleep apnea syndrome is associated with impaired pulmonary artery distensibility and right ventricular systolic dysfunction.» *Turk J Med Sci.* 48 (2018): 346-353.
- Chakraphan D., Sridulyakul P., Thipakorn B., Bunnag S., Huxley VH., Ptumraj S. «Attenuation of endothelial dysfunction by exercise training in STZ-induced diabetic rats.» *Clin Hemorheol Microcir.* 32 (2005): 217-226.
- Chalmers S., Olson ML., MacMillan D., Rainbow RD., McCarron JG. «Ion channels in smooth muscle: regulation by the sarcoplasmic reticulum and mitochondria.» *Cell Calc.* 42 (2007): 447-466.
- Chandrasekhar R., Alzayady KJ., Wagner LE., Yule DI. «Unique Regulatory Properties of Heterotetrameric Inositol 1,4,5-trisphosphate Receptors Revealed by Studying Concatenated Receptor Constructs.» *J Biol Chem.* 291 (2016): 4846-4860.
- Chaudary N., Hill RP. «Hypoxia and metastasis in breast cancer.» *Breast Dis.* 26 (2007): 55-64.
- Chemaly ER., Bobe R., Adnot S., Hajjar RJ., Lipskaia L. «Sarco (Endo) Plasmic Reticulum Calcium ATPases (SERCA) Isoforms in the Normal and Diseased Cardiac, Vascular and Skeletal Muscle.» *J Cardiovasc Dis Diagn.* 113 (2013): 2-6.
- Chemaly ER., Troncone L., Lebeche D. «SERCA Control of Cell Death and Survival.» *Cell Calc.* 69 (2018): 46-61.
- Chen LMa., Choi I., Haddad GG., Boron WF. «Chronic continuous hypoxia decreases the expression of SLC4A7 (NBCn1) and SLC4A10 (NCBE) in mouse brain.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293 (2007): R2412-R2420.

- Chen LMb., Kuo WW., Yang JJ., Wang SG., Yeh YL., Tsai FJ., Ho YJ., Chang MH, Huang CY., Lee SD. «Eccentric cardiac hypertrophy was induced by long-term intermittent hypoxia in rats. » *Exp Physiol.* 92 (2007): 409-416.
- Chen N., Cheng J., Zhou L., Lei T., Chen L., Shen Q., Qin L., Wan Z. «Effects of treadmill running and rutin on lipolytic signaling pathways and TRPV4 protein expression in the adipose tissue of diet-induced obese mice.» *J Physiol Biochem* 1 (2015): 1-10.
- Chen W., Wang R., Chen B., Zhong X., Kong H., Bai Y., Zhou Q., Xie C., Zhang J., Guo A., Tian X., Jones PP., O'Mara ML., Liu Y., Mi T., Zhang L., Bolstad L., Semeniuk L., Cheng H., Zhang J., Chen J., Tieleman DP., Gillis AM., Duff HJ., Fill M., Song LS., Wayne Chen SR. «The Ryanodine Receptor Store Sensing Gate Controls Ca²⁺ Waves and Ca²⁺ Triggered Arrhythmias.» *Nat Med.* 20 (2014): 184–192.
- Chen X. «Racial/ethnic differences in the associations between obesity measures and severity of sleep-disordered breathing: the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis.» *Sleep Med.* 26 (2016): 46–53.
- Chen Y., Xiong H., Wu D., Pirbhulal S., Tian X., Zhang R., Lu M., Wu W., Huang W. «Relationship of short-term blood pressure variability with carotid intima-media thickness in hypertensive patients.» *BioMedical Eng.* 14 (2015): 1-12.
- Chin D., Means AR. «Calmodulin: a prototypical calcium sensor.» *Trends Cell Biol.* 10 (2000): 322-328.
- Christopher WJ., Smith Kevin Pritcharda, Steven B. Marston. «The Mechanism of Ca²⁺ Regulation of Vascular Smooth Muscle Thin Filaments by Caldesmon and Calmodulin.» *J of Biol Chem.* 262 (1987): 116-122.
- Ciolac EG., Bocchi EA., Bortolotto LA., Carvalho VO., Greve JM., Guimaraes GV. «Effects of high-intensity aerobic interval training vs. moderate exercise on hemodynamic, metabolic and neuro-humoral abnormalities of young normotensive women at high familial risk for hypertension.» *Hypertens Res.* 33 (2010): 836–843.
- Clapham DE. «Calcium Signaling.» *Cell* 131 (2007): 1047-1058.
- Clapham DE. «Calcium signaling.» *Cell* 80 (1995): 259-268.
- Clapham DE. «RP channels as cellular sensors.» *Nature.* 426 (2003): 517-524.
- Coen M., Marchetti G, Palagi PM, Zerbinati C, Guastella G, Gagliano T, Bernardi F, Mascoli F, Bochaton-Piallat ML. «Calmodulin expression distinguishes the smooth muscle cell population of human carotid plaque.» *Am J Pathol.* 183 (2013): 996-1009.
- Cohen DM. «The role of TRPV4 in the kidney.» In *TRP Ion Channel Function in Sensory Transduction and Cellular Signaling Cascades.* CRC Press/T&F, (2007).
- Cohen I., Cohen C. «A tropomyosin-like protein from human platelets.» *J Mol Biol.* 68 (1972): 383–387.
- Coleman ML., Ratcliffe PJ. «Oxygen sensing and hypoxia-induced responses.» *Essays Biochem.* 43 (2007): 1-15.
- Collin T., Chat M, Lucas MG, Moreno H, Racay P, Schwaller B, Marty A, Llano I. «Developmental changes in parvalbumin regulate presynaptic Ca²⁺ signaling.» *J Neurosci.* 25 (2005): 96-107.

- Consigny PM. «Vascular Smooth Muscle Contraction and Relaxation: Pathways and Chemical Modulation.» *J of Vasc and Intervent Radiol.* 2 (1991): 309-317.
- Coujard R., Poirier J., Racadot J. *Precis d'hisologie humaine.* Laval University Press, (1980): 11-24
- Croisier H., Tan X., Chen J., Sneyd J., Sanderson MJ., Brook BS. «Ryanodine Receptor Sensitization Results in Abnormal Calcium Signaling in Airway Smooth Muscle Cells.» *Am J of Resp Cell and Mol Biol* 53 (2015): 703–711.
- Cruz-Jentoft A. «Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People.» *Age Ageing* 39 (2010): 412–423.
- Cummings B. *Anatomy Review: Blood Vessel Structure & Function.* Pearson Education, 2000.
- Dahan D, Ducret T, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Estève E. «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 (2012): L824-L833.
- Dally S., Corvazier E., Bredoux R., Bobe R., Enouf J. «Multiple and diverse coexpression, location, and regulation of additional SERCA2 and SERCA3 isoforms in nonfailing and failing human heart.» *J Mol Cell Cardiol.* 48 (2010): 633-644.
- Daneshrad Z., Garcia-Riera MP., Verdys M., and Rossi A. «Differential responses to chronic hypoxia and dietary restriction of aerobic capacity and enzyme levels in the rat myocardium.» *Mol Cell Biochem.* 210 (2000): 159-166.
- Dartsch PC., Weiss HD., Betz E. «Human vascular smooth muscle cells in culture: growth characteristics and protein pattern by use of serum-free media supplements.» *Eur J Cell Biol.* 51 (1990): 285-294.
- Davis EM., O'Donnell CP. «Rodent models for sleep apnes.» *Respir Physiol Neurobiol.* 188 (2013): 355–361.
- De Andrade FMD., Pedrosa RP. «The role of physical exercise in obstructive sleep apnea.» *J Bras Pneumol.* 42 (2016): 457-464.
- De Melo BL., Vieira SS., Antônio LL., Dos Santos LFN, Portes LA., Feliciano RS., De Oliveira HA., Silva Jr JA., De Carvalho PTC., Tucci PJF., Serra AJ. «Exercise Training Attenuates Right Ventricular Remodeling in Rats with Pulmonary Arterial Stenosis.» *Frontiers in Physiol.* 7 (2016): 512-541.
- De Smet P, Parys JB, Callewaert G, Weidema AF, Hill E, De Smedt H, Erneux C, Sorrentino V, Missiaen L., «Xestospongine C is an equally potent inhibitor of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and the endoplasmic-reticulum Ca(2+) pumps.» *Cell Calc.* 26 (1999): 9-13.
- Del Valle-Rodríguez A., López-Barneo J., Ureña J. «Ca²⁺ channel–sarcoplasmic reticulum coupling: a mechanism of arterial myocyte contraction without Ca²⁺ influx.» *EMBO J.* 22 (2003): 4337–4345.
- Delaval K. «Exploration des maladies cardiaques - Haute sensibilité : l'avenir des troponines.» *Biologistes Infos.* 1 (2011): 34-35.

- Deldicque L., Francaux M. «Acute vs. chronic hypoxia: What are the consequences for skeletal muscle mass?» *Cell & Mol Exer Physiol.* 2 (2013): 1-8.
- Delmas V., Brémond-Gignac D., Clément O. «Organisation des appareils et des systèmes aspects morphologiques et fonctionnels.» Elsevier, Masson-Issy les Moulineaux cedex-France (2011).
- Dematteis M., Julien C., Guillermet C., Sturm N., Lantuejoul S., Mallaret M., Lévy P., Gozal E. «Intermittent hypoxia induces early functional cardiovascular remodeling in mice.» *Am J Respir Crit Care Med.* 177 (2008): 227-235.
- Dempsey JA., Veasey SC., Morgan BJ., O'Donnell CP. «Pathophysiology of sleep apnea.» *Physiol Rev.* 90 (2010): 47-112.
- Destors M., Tamisier R., Baguet JP., Lévy P., Pepin JL. «Cardiovascular morbidity associated with obstructive sleep apnea syndrome.» *Rev Mal Respir.* 31 (2014): 375-385.
- Destors M., Tamisier R., Galerneau LM., Lévy P., Pepin JL. «Pathophysiology of obstructive sleep apnea syndrome and its cardiometabolic consequences.» *Presse Med.* 46 (2017): 395-403.
- Dewhirst MW. «Relationships between cycling hypoxia, HIF-1, angiogenesis and oxidative stress.» *Radiat Res.* 172 (2009): 653-665.
- Di A., Malik AB. «TRP channels and the control of vascular function.» *Curr Opin Pharmacol.* 10 (2010): 127-132.
- Diaz KM., Shimbo D. «Physical activity and the prevention of hypertension.» *Curr Hypertens Rep.* 15 (2013): 659-668.
- Díaz-Flores L., Gutiérrez R., Madrid JF., Varela H., Valladares F., Acosta E., Martín-Vasallo P., Díaz-Flores L Jr. «Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche.» *Histol Histopathol.* 24 (2009): 909-969.
- Dibra MN., Berry RB., Wagner MH. «Treatment of Obstructive Sleep Apnea: Choosing the Best Interface.» *Sleep Med Clin.* 12 (2017): 543-549.
- Dong S., Li G., Zheng D., Wu J., Sun D., Yang F., Yu X., Li T., Sun A., Liu J., Zhong X., Xu C., Lu F., Zhang W. «A novel role for the calcium sensing receptor in rat diabetic encephalopathy.» *Cell Physiol Biochem.* 35 (2015): 38-50.
- Dotzert MS., McDonald MW., Murray MR., Nickels JZ., Noble EG., Melling CWJ. «Effect of Combined Exercise Versus Aerobic-Only Training on Skeletal Muscle Lipid Metabolism in a Rodent Model of Type1 Diabetes.» *Can J Diabetes.* 17 (2017): 303-314.
- Dries E., Santiago DJ., Johnson DM., Gilbert G., Holemans P., Korte SM., Roderick HL., Sipido KR. «Calcium/calmodulin-dependent kinase II and nitric oxide synthase 1-dependent modulation of ryanodine receptors during β -adrenergic stimulation is restricted to the dyadic cleft.» *J Physiol.* 594 (2016): 5923-5939.
- Du W., McMahon TJ., Zhang ZS., Stiber JA., Meissner G., Eu JP. «Excitation-Contraction Coupling in Airway Smooth Muscle.» *J of Biol Chems.* 281 (2006): 30143-30151.

- Dube DK., Wang J., Fan Y., Sanger JM., Sanger JW. «Does Nebulin Make Tropomyosin Less Dynamic in Mature Myofibrils in Cross-Striated Myocytes? » *J Cytol Histol.* 5 (2014): 239-240.
- Dulhunty AF., Wei-LaPierre L., Casarotto MG., Beard NA. «Core skeletal muscle ryanodine receptor calcium release complex.» *Clin Exp Pharmacol Physiol* 44. (2017): 3-12.
- Dunn SA., Mohteshamzadeh M, Daly AK, Thomas TH. « Altered tropomyosin expression in essential hypertension.» *Hypert.* 41 (2003): 347-354.
- Duran J., Esnaola S., Rubio R., Iztueta A. «Obstructive Sleep Apnea–Hypopnea and Related Clinical Features in a Population-based Sample of Subjects Aged 30 to 70 Yr.» *Am J Respir Crit Care Med* 163 (2001): 685–689.
- Earley S, Pauyo T, Drapp R, Tavares MJ, Liedtke W, Brayden JE. «TRPV4-dependent dilation of peripheral resistance arteries influences arterial pressure.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 297 (2009): H1096- H10102.
- Earley S., Brayden JE. «Transient receptor potential channels in the vasculature.» *Physiol Rev.* 95 (2015): 645-690.
- Earley S. «Endothelium-dependent cerebral artery dilation mediated by transient receptor potential and Ca²⁺-activated K⁺ channels.» *J Cardiovasc Pharmacol* 57 (2011): 148–153.
- Ebashi S. «Survey of Japanese Science Calcium Ions and Muscle Contraction.» *Nature* 240 (1972): 217–218.
- Egorova PA., Bezprozvanny IB. «Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and neurodegenerative disorders.» *FEBS J.* 285 (2017): 1-38.
- Eisele HJ., Markart P., Schulz R. «Obstructive sleep apnea, oxidative stress, and cardiovascular disease: evidence from human studies.» *Oxid Med Cell Longev.* 2015 (2015): 12-24.
- Eisner DA., Caldwell JL., Kistamás K., Trafford AW. «Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart.» *Circul. Research.* 121 (2017): 181-195.
- El-Saleh SC., Warber KD., Potter JD. «The role of tropomyosin-troponin in the regulation of skeletal muscle contraction.» *J of Mus. Res and Cell Motility.* 5 (1986): 387-404.
- Esfandiarei M., Fameli N., Choi YY., Tehrani AY., Hoskins JG., van Breemen C. «Waves of calcium depletion in the sarcoplasmic reticulum of vascular smooth muscle cells: an inside view of spatiotemporal Ca²⁺ regulation.» *PloS one.* 8 (2013): 1-12.
- Espinosa-Tanguma R., C. O’Neil, Sims SM. «Essential role for calcium waves in migration of human vascular smooth muscle cells.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301 (2011): H315–H323.
- Essin K., Gollasch M. «Role of ryanodine receptor subtypes in initiation and formation of calcium sparks in arterial smooth muscle: comparison with striated muscle.» *J Biomed Biotechnol.* 15 (2009): 1-16.
- Everaerts W, Nilius B, Owsianika G. «The vanilloid transient receptor potential channel TRPV4: From structure to disease.» *Progress in Biophy and Mol Biol.* 103 (2010): 2-17.

- Fabiato A., Fabiato F. «Calcium and Cardiac Excitation-Contraction Coupling.» *Ann Rev of Physiol.* 41 (1979): 473-484.
- Farah CS., Reinach FC. «The troponin complex and regulation of muscle contraction.» *The FASEB J.* 9 (1995): 755-767.
- Fattoum A. «Régulation de la contraction du muscle lisse.» *Med Sci Synthese.* 13 (1997): 777-789
- Faury G. «Function-structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres.» *Pathol Biol.* 49 (2001): 310-325.
- Felder E., Protasi F., Hirsch R., Franzini-Armstrong C., Allen PD. «Morphology and molecular composition of sarcoplasmic reticulum surface junctions in the absence of DHPR and RyR in mouse skeletal muscle.» *Biophysical Journal* 82 (2002): 3144-3149.
- Ferguson DG., Schwartz HW., Franzini-Armstrong C. «Subunit structure of junctional feet in triads of skeletal muscle: a freeze-drying, rotary-shadowing study.» *J Cell Biol.* 99 (1984): 1735-1742.
- Fernandez-Fernandez JM., Nobles M., Currid A., Vazquez E., Valverde MA. «Maxi K⁺ channel mediates regulatory volume decrease response in a human bronchial epithelial cell line.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 283 (2002): C1705-C1714.
- Ferrier GR., Howlett SE. «Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction.» *American J. of Physiol-Heart and Circul Physiol.* 280 (2001): H1928-H1944.
- Ferrieres G., Calzolari C., Mani JC., Laune D., Trinquier S., Laprade M., Larue C., Pau B., Granier C. «Human cardiac troponin I: precise identification of antigenic epitopes and prediction of secondary structure.» *Clin Chem.* 44 (1998): 487-493.
- Fletcher EC, Lesske J., Qian W., Miller CC., Unger T. «Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats.» *Hypertension.* 19 (1992): 555-561.
- Fletcher EC. «Invited review: Physiological consequences of intermittent hypoxia: systemic blood pressure.» *J Appl Physiol.* 90 (2001): 1600-1605.
- Fletcher EC., Bao G., Li R. «Renin activity and blood pressure in response to chronic episodic hypoxia.» *Hypertension* 34 (1999): 309-314.
- Fletcher EC., Lesske J., Qian W., Miller CC 3rd., Unger T. «Repetitive, episodic hypoxia causes diurnal elevation of blood pressure in rats.» *Hypertension J.* 19 (1992): 555-561.
- Fletcher EC., Orolinova N., Bader M. «Blood pressure response to chronic episodic hypoxia: the renin-angiotensin system.» *J Appl Physiol* 92 (2002): 627-633.
- Forouzan O., Warczytowa J., Wieben O., François CJ., Chesler NC. «Non-invasive measurement using cardiovascular magnetic resonance of changes in pulmonary artery stiffness with exercise.» *J Cardiovasc Magn Reson.* 17 (2015): 109-131.
- Foskett JK., White C., Cheung KH., Mak DO. «Inositol trisphosphate receptor Ca²⁺ release channels.» *Physiol Rev.* 87 (2007): 593-658.
- Foster GE., Poulin MJ., Hanly PJ. «Intermittent hypoxia and vascular function: implications for obstructive sleep apnoea.» *Exp Physiol* 92 (2007): 51-65.
- Fowler RM, Gain KR, Gabbay E. «Exercise intolerance in pulmonary arterial hypertension.» *Pulm Med* 2012 (2012): 199-204.

- Franklin KA., Lindberg E. «Obstructive sleep apnea is a common disorder in the population-a review on the epidemiology of sleep apnea.» *J Thorac Dis.* 7 (2015): 1311-1322.
- Franklin KA., Sahlin C., Stenlund H., Lindberg E. «Sleep apnoea is a common occurrence in females.» *Eur respir J* 41 (2013): 610-615.
- Franzini-Armstrong C., Protasi F., Ramesh V. «Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles.» *Biophys J.* 77 (1999): 1528-1539.
- Freedman N. «Treatment of Obstructive Sleep Apnea: Choosing the Best Positive Airway Pressure Device.» *Sleep Med Clin.* 12 (2017): 529-542.
- Freidja ML., Henrion D. «Adaptation des artères de résistance aux variations chroniques de débit sanguin: évolution avec l'âge et les facteurs de risque associés » *Sang Thrombose Vaisseaux* 23 (2011): 521-528.
- Frontera WR., Ochala J. «Skeletal muscle: a brief review of structure and function.» *Calcif Tissue Int.* 96 (2015): 183-95.
- Fukuda D., Aikawa M. «Intimal Smooth Muscle Cells.» *Circul.* 122 (2010): 2005-2008.
- Fukuda K., Kanazawa H., Aizawa Y., Ardell JL., Shivkumar K. «Cardiac innervation and sudden cardiac death.» *Circ Res.* 116 (2015): 2005-2019.
- Gabbay IE., Lavie P. «Age- and gender-related characteristics of obstructive sleep apnea.» *Sleep Breath.* 16 (2012): 453-460.
- Gailly P. «TRP channels in normal and dystrophic skeletal muscle.» *Curr. Op. Pharmacol.* 327 (2012): 326-334.
- Gainé SP., Rubin LJ. «Primary pulmonary hypertension.» *Lancet.* 352 (1998): 719–725.
- Galinska-Rakoczy A., Engel P., Xu C., Jung H., Craig R., Tobacman LS., Lehman W. «Structural basis for the regulation of muscle contraction by troponin and tropomyosin.» *J Mol Biol.* 379 (2008): 929–935.
- Gami AS, Pressman G., Caples SM., Kanagala R., Gard JJ., Davison DE., Malouf JF., Ammash NM., Friedman PA., Somers VK. «Association of atrial fibrillation and obstructive sleep apnea.» *Circul.* 27 (2004): 364-367.
- Gami AS., Hodge DO., Herges RM., Oslon EJ., Nykodym J., Kara T., Somerd VK. «Obstructive sleep apnea, obesity, and the risk of incident atrial fibrillation.» *J Am Coll Cardiol.* 49 (2007): 565-571.
- Gao K., Wang Z., Zhou X., Wang H., Kong D., Jiang C., Wang X., Jiang Z., Qiu X. «Comparative transcriptome analysis of fast twitch muscle and slow twitch muscle in *Takifugu rubripes*.» *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics.* 24 (2017): 79-88.
- Gao Y., Ye LH., Kishi H., Okagaki T., Samizo K., Nakamura A., Kohama K. «Myosin light chain kinase as a multifunctional regulatory protein of smooth muscle contraction.» *IUBMB Life.* 51 (2001): 337-344.
- Garcia-Elias A., Mrkonjic´ S., Jung C., Pardo-Pastor C., Vicente R., Valverde MA. «The TRPV4 channel.» *Handb Exp Pharmacol* 222 (2014): 293–319.

- Garvey JF., Taylor CT., McNicholas WT. «Cardiovascular disease in obstructive sleep apnoea syndrome: the role of intermittent hypoxia and inflammation.» *Eur Respir J.* 33 (2009): 1195-1205.
- Gayda M., Ribeiro PA., Juneau M., Nigam A. «Comparison of Different Forms of Exercise Training in Patients With Cardiac Disease: Where Does High-Intensity Interval Training Fit?» *Can J Cardiol.* 32 (2016): 485-494.
- Gee KR., Brown KA., Chen WNU., Bishop-Stewart J., Gray D., Johnson I. «Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺- indicator dyes K.» *Cell calcium* 27 (2000): 97–106.
- Geeves MA., Hitchcock-DeGregori SE., Gunning PE. «A systematic nomenclature for mammalian tropomyosin isoforms.» *J Muscle Res Cell Motil.* 36 (2015): 147–153.
- Gielen S., Schuler G., Adams V. «Cardiovascular Effects of Exercise Training Molecular Mechanisms.» *Circulation* 122 (2010): 1221-1238.
- Goanvec C., Feray A., Thioub S., Theron M., Mansourati J., Guerrero F. «Vascular adaptation to aerobic exercise: A new experimental approach.» *Sci. & Sport* 30 (2015): 19-24.
- Global facts | World Heart Federation. [World-heart-federation.org](http://www.world-heart-federation.org). 2016. [Http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/global-facts-map/](http://www.world-heart-federation.org/cardiovascular-health/global-facts-map/) (access June 2017).
- Goldenberg NM., Ravindran K., Kuebler WM. «TRPV4: physiological role and therapeutic potential in respiratory diseases.» *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 388 (2015): 421-436.
- González K., Fuentes J., Márquez JL. «Physical Inactivity, Sedentary Behavior and Chronic Diseases.» *Korean J Fam Med.* 38 (2017): 111–115.
- Gordon T., Patullo M. «Plasticity of muscle fibre and motor unit types.» *Exerice sport Scien. Rev.* 21 (1993): 331-362.
- Gottlieb DJ., Yenokyan G., Newman AB., O'Connor GT., Punjabi NM., Quan SF., Redline S., Resnick HE., Tong EK., Diener-West M., Shahar E. «Prospective study of obstructive sleep apnea and incident coronary heart disease and heart failure : the Sleep Heart Health Study.» *Circul.* 122 (2010): 352-360.
- Gras E., Belaidi E., Briançon-Marjollet A., Pépin JL., Arnaud C., Godin-Ribuot D. «Endothelin-1 mediates intermittent hypoxia-induced inflammatory vascular remodeling through HIF-1 activation.» *J Appl Physiol* 120 (2016): 437-443.
- Gray EA., Tsuchimochi H., Pearson JT., Sonobe T., Fujii Y., Yoshimoto M., Umetani K., Shirai M., Schwenke DO. «Assessment of the serotonin pathway as a therapeutic target for pulmonary hypertension.» *J Synchrotron Radiat.* 20 (2013): 756-764.
- Grayson TH., Haddock RE., Murray TP., Wojcikiewicz RJ., Hill CE. «Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor subtypes are differentially distributed between smooth muscle and endothelial layers of rat arteries.» *Cell Calc.* 36 (2004): 447– 458.
- Greaser ML., Pleitner JM. «Titin isoform size is not correlated with thin filament length in rat skeletal muscle.» *Front Physiol* 5 (2014): 35-39.

- Green DJ., Smith KJ. «Effects of Exercise on Vascular Function, Structure, and Health in Humans.» Cold Spring Harb Perspect Med. 1 (2017): 1-15.
- Green DJ., O'Driscoll G., Joyner MJ., Cable NT. «Exercise and cardiovascular risk reduction: time to update the rationale for exercise?» J Appl Physiol. 105 (2008): 766–768.
- Green KJ., Jonathan CRJ. «Fibrous Proteins: Coiled-Coils, Collagen and Elastomers.» Adv. in Prot. Chem. London – UK (2005).
- Greene AL., Lalli MJ., Ji Y., Babu GJ., Grupp I., Sussman M., Periasamy M. «Overexpression of SERCA2b in the heart leads to an increase in sarcoplasmic reticulum calcium transport function and increased cardiac contractility.» J Biol Chem. 275 (2000): 24722–24727.
- Grocott M., Montgomery H., Vercueil A. «High-altitude physiology and pathophysiology: implications and relevance for intensive care medicine.» Crit Care. 11 (2007): 198-203.
- Guerrero F., Thioub S., Goanvec C., Theunissen S., Feray A., Balestra C. «Effect of tetrahydrobiopterin and exercisettraining on endothelium-dependent vasorelaxation in SHR.» Eur J Cardiovasc Prev. Rehabil. 15 (2008): 52-58.
- Guerrero-Hernandez, A. Leticia Gomez-Viquez, Guadalupe Guerrero-Serna & Angelica-Rueda. «Ryanodine Receptors In Smooth Muscle.» Frontiers Biosci. (2002): 1676-1688.
- Guerrero-Hernández A., Ávila G., Rueda A. «Ryanodine receptors as leak channels.» Eur J Pharmacol. 739 (2014): 26-38.
- Guerrero-Hernández A., Gómez-Viquez L, Guerrero-Serna G, Rueda A. « Ryanodine receptors in smooth muscle.» Front Biosci. 1 (2002): d1676-d1688.
- Guibert C., Ducret T, Savineau JP. «Expression and Physiological Roles of TRP Channels in Smooth Muscle Cells.» Dans Transient Receptor Potential Channels, de Islam S., 687-706. CA: Springer, 2011.
- Guiraud T., Nigam A., Gremeaux V., Meyer P., Juneau M., Bosquet L. «High-intensity interval training in cardiac rehabilitation.» Sports Med. 42 (2012): 587–605.
- Gunning P., O'Neill G., Hardeman E. «Tropomyosin-based regulation of the actin cytoskeleton in time and space.» Physiol Rev. 88 (2008): 1-35.
- Gunning PW., Hardeman EC., Lappalainen P., Mulvihill DP. «Tropomyosin - master regulator of actin filament function in the cytoskeleton.» J Cell Sci. 128 (2015): 2965-2974.
- Guth L., Watson P., Brown W. «Effects of cross -reinnervation on some chemical properties of red and white muscles of rat and cat.» Exp Neural 20 (1988): 32-69.
- Guyton A., Hall J. Medical Physiology - 11th edition. Mississippi: ED Elsevier -USA, (2005).
- Hägg U, Andersson I, Naylor AS, Gronros J, Jonsdottir IH, Bergstrom G, Gan LM. «Voluntary physical exercise-induced vascular effects in spontaneously hypertensive rats.» Clin. Sci. 107 (2004): 571–581.

- Haissaguerre M., Vigmond E, Bruno Stuyvers, Meleze Hocini & Olivier Bernus. «Ventricular arrhythmias and the His–Purkinje system.» *Nature Rev Cardiol.* 13 (2016): 155–166.
- Hakamata Y., Nakai J., Takeshima H., Imoto K. «Primary structure and distribution of a novel ryanodine receptor/calcium release channel from rabbit brain.» *FEBS Lett.* 312 (1992): 229–235.
- Hamer M. «The anti-hypertensive effects of exercise: integrating acute and chronic mechanisms.» *Sports Med.* 36 (2006): 109-116.
- Hamilton SL., Serysheva II. «Ryanodine Receptor Structure: Progress and Challenges.» *J. Biol. Chem.* 284 (2009): 4047-4051.
- Hanke H., Strohschneider T., Oberhoff M., Betz E., Karsch KR. «Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty.» *Circ Res.* 7 (1990): 651-9.
- Haram PM., Kemi OJ., Wisloff U. «Adaptation of endothelium to exercise training: insights from experimental studies.» *Front. Biosci.* 13 (2008): 336-346.
- Haram PM., Kemi OJ., Lee SJ., Bendheim MO., Al-Share QY., Waldum HL., Gilligan LG., Koch LG., Britton SL., Najjar SM., Wisløff U. «Aerobic interval training vs. continuous moderate exercise in the metabolic syndrome of rats artificially selected for low aerobic capacity.» *Cardiovas. Res.* 81 (2009): 723–732.
- Haskell WL., Lee IM., Pate RR., Powell KE., Blair SN., Franklin BA., Macera CA., Heath GW., Thompson PD., Bauman A. «Physical activity and public health: updated recommendation for adults from the American College of Sports Medicine and the American Heart Association.» *Med Sci Sports Exerc.* 39 (2007): 1423-1434.
- Heart UK. Risk Factors For Cardiovascular Disease (CVD) - MFS-I Fact sheet. 2016. www.heartuk.org.uk (access Decembre 2017)
- Heinzer R. «Obstructive sleep apnea: a risk for general anesthesia?» *Rev Med Suisse.* 3 (2007): 2670-2674
- Hellsten Y., Jensen L., Thaning P., Nyberg M., Mortensen S. «Impaired formation of vasodilators in peripheral tissue in essential hypertension is normalized by exercise training: Role of adenosine and prostacyclin.» *J Hypertens.* 30 (2012): 2007–2014.
- Henderson CA., Gomez CG, Novak SM, Mi-Mi L, Gregorio CC. «Overview of the Muscle Cytoskeleton.» *Compr Physiol.* 7 (2017): 891-944.
- Hilbert L., Bates G., Roman HN., Blumenthal JL., Zitouni NB., Sobieszek A., Mackey MC., Lauzon AM. «Molecular Mechanical Differences between Isoforms of Contractile Actin in the Presence of Isoforms of Smooth Muscle Tropomyosin.» *PLoS Computational Biol.* 9 (2013): e1003273.
- Hill MA. *Heart Histology.* (2014). https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Cardiovascular_System_Heart_Histology (access Decembre 2017).
- Hill-Eubanks DC., Werner ME., Heppner TJ., Nelson MT. «Calcium signaling in smooth muscle.» *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3 (2011): a004549.

- Hinz B., Gabbiani G. «Fibrosis: recent advances in myofibroblast biology and new therapeutic perspectives.» *Biol Rep* 78 (2010): B2- B78.
- Hirschi KK., D'Amore PA. «Pericytes in the microvasculature.» *Cardiovas Research*. 32 (1996): 687–698.
- Hitchcock SE. «Regulation of muscle contraction: bindings of troponin and its components to actin and tropomyosin.» *Eur J Biochem*. 52 (1975): 255-63.
- Hitoshi K., Tjandra N., Grzesiek S., Ren H., Klee CB., Bax A. «Solution structure of calcium-free calmodulin.» *Nature Structural*. 2 (1995): 768–776.
- Hobbins L, Hunter S, Gaoua N, Girard O. «Normobaric hypoxic conditioning to maximize weight loss and ameliorate cardio-metabolic health in obese populations: a systematic review.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 313 (2017): R251-R264.
- Hochachka P., Gunga H., Kirsch K. «Our ancestral physiological phenotype: an adaptation for hypoxia tolerance and for endurance performance?» *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95 (1998): 1915–1920.
- Hofmann S., Pette D. «Low frequency stimulation of rat fast twitch muscle enhances the expression of hexokinase II and both the translocation and expression of glucose and transporter 4 (Glut-4).» *J. Biochem* 219 (1994): 307-315.
- Hoppeler H., Kleinert E., Schlegel C., Claassen H., Howald H., Kayar SR., Cerretelli P. «Morphological adaptations of human skeletal muscle to chronic hypoxia.» *Int J Sports Med*. 1 (1990): S3-S9.
- Horner RL. «Pathophysiology of obstructive sleep apnea.» *J Cardiopulm Rehabil Prev*. 28 (2008): 289-298.
- Horowitz A., Menice CB., Laporte R., Morgan KG. «Mechanisms of smooth muscle contraction.» *Physiol. Rev*. 76 (1996): 967-1003.
- Horsburgh S., Robson-Ansley P., Adams R., Smith C. «Exercise and inflammation-related epigenetic modifications: focus on DNA methylation.» *Exerc Immunol Rev*. 21 (2015): 26–41.
- Howard MG., DiCarlo SE., Stallone JN. «Acute exercise attenuates phenylephrine-induced contraction of rabbit isolated aortic rings.» *Med Sci Sports Exerc*. 24 (1992): 1102-1107.
- Howlett RA., Hogan MC. «Effect of hypoxia on fatigue development in rat muscle composed of different fibre types.» *Exp Physiol* 92 (2007): 887–894.
- Hoyos CM., Drager LF., Patel SR. «OSA and cardiometabolic risk: What's the bottom line?» *Respirology* 22 (2017): 420-429.
- HP2: laboratoire hypoxie et physiopathologies cardiovasculaires et respiratoires <https://hp2.univ-grenoble-alpes.fr/plateforme-hype>, (Acces Septembre 2017).
- Huang WA., Boyle NG., Vaseghi M. «Cardiac Innervation and the Autonomic Nervous System in Sudden Cardiac Death.» *Card Electrophysiol Clin*. 9 (2017): 665-679.
- Huang XG., Feng LS., Xu JF. «Changes of body weight and energy metabolism of SD rats during hypoxic training.» *China Sport Sci*. 27 (2007): 61-68.

- Hueyk K., Haddad F., Qin A., Baldwin K. «Transcriptional regulation of the type I myosin heavy chain gene in denervated rats soleus.» *Am. J. Cell Physiol.* 248 (2003): C738-C748.
- Humphries ESA., Kamishima T., Quayle JM., Dart C. «Calcium/calmodulin-dependent kinase 2 mediates Epac-induced spontaneous transient outward currents in rat vascular smooth muscle.» *J Physiol.* 595 (2017): 6147–6164.
- Huo L., Fu G., Wang X., Ko WKW., Wong AOL. «Modulation of Calmodulin Gene Expression as a Novel Mechanism for Growth Hormone Feedback Control by Insulin-like Growth Factor in Grass Carp Pituitary Cells.» *Endocrinol.* 146 (2005): 3821–3835.
- Huynh KW., Cohen MR., Chakrapani S., Holdaway HA., Stewart PL., & Moiseenkova-Bell VY. «Structural Insight into the Assembly of TRPV Channels.» *Structure UK.* 22 (2014): 260-268.
- Hwang HS., Johnson CN., Chazin WJ., Loporcaro CJ., Shah M., Papez AL., Lau YR., Kanter R., Knollmann BC., Ackerman, MJ. «Spectrum and Prevalence of CALM1-, CALM2-, and CALM3-Encoded Calmodulin (CaM) Variants in Long QT Syndrome (LQTS) and Functional Characterization of a Novel LQTS-Associated CaM Missense Variant, E141G.» *Circul- Cardiovas. Genet.* 9 (2016): 136–146.
- Igelström H., Emtner M., Lindberg E., Asenlöf P. «Physical activity and sedentary time in persons with obstructive sleep apnea and overweight enrolled in a randomized controlled trial for enhanced physical activity and healthy eating.» *Sleep Breath.* 17 (2013): 1257-1266.
- Inoue R, Jensen LJ, Shi J, Morita H, Nishida M, Honda A, Ito Y. «Transient receptor potential channels in cardiovascular function and disease.» *Circ Res.* 99 (2006): 119-131.
- Ip MS., Lam B., Chan LY., Zheng L., Tsang KW., Fung PC., Lam WK. «Circulating nitric oxide is suppressed in obstructive sleep apnea and is reversed by nasal continuous positive airway pressure.» *Am J Respir Crit Care Med.* 162 (2000): 2166-2171.
- Irving M. «Regulation of Contraction by the Thick Filaments in Skeletal Muscle.» *Biophys J.* 113 (2017): 2579-2594.
- Islam MO., Yoshida Y., Koga T., Kojima M., Kangawa K., Imai S. «Isolation and characterization of vascular smooth muscle inositol 1,4,5-trisphosphate receptor.» *Biochem J.* 316 (1996): 295– 302.
- Ismail K., Roberts K., Manning P., Manley C., Hill NS. «OSA and pulmonary hypertension: time for a new look.» *Chest.* 147 (2015): 847-861.
- Itoh T., Kuriyama H., Suzuki H. «Excitation—contraction coupling in smooth muscle cells of the guinea-pig mesenteric artery.» *J of Physiol.* 321 (1981): 513–535.
- Iturriaga R., Oyarce MP., Dias ACR. «Role of Carotid Body in Intermittent Hypoxia-Related Hypertension.» *Curr Hypertens Rep.* 19 (2017): 1-8.
- Ivanova H., Vervliet T., Missiaen L., Parys JB., De Smedt H., Bultynck G. «Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-isoform diversity in cell death and survival» *Bioch Biophys-BBA.* 1843 (2014): 2164-2183.

- Iwai M, Michikawa T., Bosanac I., Ikura M., Mikoshiba K. «Molecular basis of the isoform-specific ligand-binding affinity of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors.» *J Biol Chem.* 282 (2007): 12755–12764.
- Iwai M., Tateishi Y., Hattori M., Mizutani A., Nakamura T., Futatsugi A., Inoue T., Furuichi T., Michikawa T., Mikoshiba K. «Molecular cloning of mouse type 2 and type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and identification of a novel type 2 receptor splice variant.» *J Biol Chem.* 280 (2005): 10305-10317.
- Iwasaki YK., Kato T., Xiong F., Shi YF., Naud P., Maguy A., Mizuno K., Tardif JC., Comtois P., Nattel S. «Atrial fibrillation promotion with long-term repetitive obstructive sleep apnea in a rat model. » *J Am Coll Cardiol.* 64 (2014): 2013-2023.
- Javaheri S, Barbe F., Campos-Rodriguez F., Dempsey JA., Khayat R., Malhotra A., Martinez-Garcia MA., Mehra R., Pack AI., Polotsky VY., Redline S., Somers VK. «Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences.» *J Am Coll Cardiol.* 69 (2017): 841-858.
- Javaheri S. «Sleep disorders in systolic heart failure: a prospective study of 100 male patients.» *The final report Int J Cardiol.* 106 (2006): 21-28.
- Jean-Louis G., Zizi F., Casimir G., Diplama J., Mukherji R. «Sleep-disordered breathing and hypertension among African Americans.» *J Hum Hypertens* 19 (2005): 485-490.
- Jeremy P., Simon Turner, Simon Howell. «Cardiac muscle physiology.» *Continuing Edu in Anaesthesia Critical Care & Pain.* 7 (2007): 85–88.
- Jin JJ., JJian-Ping S. «TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure–function relationships.» *Gene.* 576 (2016): 385–394.
- Jin JP., Bloch RJ., Huang X., Larsson L. «Muscle Contractility and Cell Motility.» *J of Biomed and Biotech.* 2012 (2012): 1-3.
- Johnson DB, Leibold J, Millhorn DE. «Hypoxia Regulates the cAMP- and Ca²⁺/Calmodulin Signaling Systems in PC12 Cells.» *Biochem. & Biophys. Res. Commu.* 242 (1998): 61-66.
- Johny JP, Plank MJ., David T. «Importance of Altered Levels of SERCA, IP3R, and RYR in Vascular Smooth Muscle Cell.» *Biophysical J.* 112 (2017): 265-287.
- Jordan AS., McSharry DG., Malhotra A. «Adult obstructive sleep apnoea.» *Lancet* 383 (2014): 736–747.
- Joseph JS., Ayeleso AO., Mukwevho E. «Role of exercise-induced calmodulin protein kinase (CaMK)II activation in the regulation of omega-6 fatty acids and lipid metabolism genes in rat skeletal muscle.» *Physiol Res.* 66 (2017): 969-977.
- Joyner MJ., Green DJ. «Exercise protects the cardiovascular system: Effects beyond traditional risk factors.» *J Physiol.* 587 (2009): 5551–5558.
- Julian FJ., Moss RL., Sollins MR. «The mechanism for vertebrate striated muscle contraction.» *Circ Res.* 42 (1978): 2-14.
- Jung HJ, Kim JH, Shim JS, and Kwon HJ. «A Novel Ca²⁺/Calmodulin Antagonist HBC Inhibits Angiogenesis and Down-regulates Hypoxia-inducible Factor.» *J Biol Chem.* 285 (2010): 25867–25874.

- Juonala M., Viikari JSA., Laitinen T., Marniemi J., Helenius H., Rönnemaa T., Raitakari TO. «Interrelations Between Brachial Endothelial Function and Carotid Intima-Media Thickness in Young Adults The Cardiovascular Risk in Young Finns Study.» *Circul.* 110 (2004): 2918-2923.
- Jurkovicova D., Sedlakova B., Lacinova L., Kopacek J., Sulova Z., Sedlak J., Krizanova O. «Hypoxia Differently Modulates Gene Expression of Inositol 1,4,5-Trisphosphate Receptors in Mouse Kidney and HEK 293 Cell Line.» *Stress, Neurotransmitters, and Hormones: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1148 (2008): 421–427.
- Kachur S., Chongthammakun V., Lavie CJ., De Schutter A., Arena R., Milani RV., Franklin BA. «Impact of cardiac rehabilitation and exercise training programs in coronary heart disease.» *Prog Cardiovasc Dis.* 60 (2017): 103-114.
- Kadlec AO., Barnes C., Durand MJ., Gutterman DD. «Microvascular Adaptations to Exercise: Protective Effect of PGC-1 Alpha.» *Am J Hypertens.* 31 (2018): 240-246.
- Kallos MS., Behie LA., Vescovi AL. «Extended serial passaging of mammalian neural stem cells in suspension bioreactors.» *Biotechnol Bioeng.* 65 (1999): 589-599.
- Kalyva A., Schmidtman A, Geeves MA. «In Vitro Formation and Characterization of the Skeletal Muscle $\alpha\beta$ Tropomyosin Heterodimers.» *Biochem.* 51 (2012): 6388–6399.
- Kanagy NL. «Vascular Effects of Intermittent Hypoxia.» *ILAR J.* 50 (2009): 282–288.
- Kanagy NL., Walker BR., Nelin LD. «Role of Endothelin in Intermittent Hypoxia-Induced Hypertension.» *Hyperten.* 37 (2001): 511-515.
- Kaneko Y., Szallasi A. «Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective.» *British J of Pharmacol.* 171 (2014): 2474–2507.
- Kanzaki K., Watanabe D, Kuratani M, Yamada T, Matsunaga S, Wada M. «Role of calpain in eccentric contraction-induced proteolysis of Ca²⁺-regulatory proteins and force depression in rat fast-twitch skeletal muscle.» *J Appl Physiol* 122 (2017): 396-405.
- Kao CY, Carsten ME. *Cellular Aspects of Smooth Muscle Function.* Cambridge University Press – Medical - USA, (1997).
- Kara T., Narkiewicz K., Somers VK. «Chemoreflexes--physiology and clinical implications.» *Acta Physiol Scand.* 177 (2003): 377-384.
- Kato M., Roberts-Thomson P., Phillips BG., Haynes WG., Winnicki M., Accurso V., Somers VK. «Impairment of endothelium-dependent vasodilation of resistance vessels in patients with obstructive sleep apnea.» *Circul.* 102 (2000): 2607-2610.
- Katrukha IA. «Human Cardiac Troponin Complex. Structure and Functions.» *Biochemistry.* 78 (2013): 1447-1465.
- Katz AM., Lorell BH. «Regulation of Cardiac Contraction and Relaxation.» *Circul.* 102 (2000): 69-74.
- Kelley C., D'Amore P., Hechtman HB., Shepro D. «Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall.» *J Cell Biol.* 104 (1987): 483-490.
- Kenhub. Types of muscle cells. 2017. <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/types-of-muscle-cells> (accès le Decembre 28, 2017).

- Keshavarz M., Fotouhi M, Rasti A. «Dantrolene: A Selective Ryanodine Receptor Antagonist, Protects Against Pentylentetrazole-Induced Seizure in Mice.» *Acta Med Iran.* 54 (2016): 555-561.
- Kholdani C., Fares WH., Mohsenin V. «Pulmonary hypertension in obstructive sleep apnea: is it clinically significant? A critical analysis of the association and pathophysiology.» *Pulm Circ.* 5 (2015): 220-227.
- Kierszenbaum AL. *Histologie et biologie cellulaire - Une introduction à l'anatomie pathologie.* Elsevier, Espagne (2006).
- Kirkcaldie MTK. «Parvalbumin.» *The Mouse Nervous System – Neocortex.* Elsevier, (2012): Amsterdam, Netherlands.
- Kishi T, Hirooka Y., Nagayama T, Isegawa K., Katsuki M., Takesue K., Sunagawa K. «Calorie Restriction Improves Cognitive Decline via Up-Regulation of Brain-Derived Neurotrophic Factor Tropomyosin-Related Kinase B in Hippocampus of Obesity-Induced Hypertensive Rats.» *Int Heart J.* 56 (2015): 110-115.
- Kishi T., Hirooka Y., Sunagawa K. «Telmisartan protects against cognitive decline via up-regulation of brain-derived neurotrophic factor/tropomyosin-related kinase B in hippocampus of hypertensive rats.» *J of Cardio.* 60 (2013): 489-494.
- Klabunde RE. *Cardiovascular Physiology Concepts* (2nd edition). Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia – USA (2013).
- Klee CB., Vanaman TC. «Calmodulin.» *Adv Protein Chem.* 35 (1982): 213-321.
- Kobayashi S., Yano M, Uchinomi H, Suetomi T, Susa T, Ono M, Xu X, Tateishi H, Oda T, Okuda S, Doi M, Yamamoto T, Matsuzaki M. «Dantrolene, a therapeutic agent for malignant hyperthermia, inhibits catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia in a RyR2(R2474S/+) knock-in mouse model.» *Circ J.* 74 (2010): 2579-2584.
- Kohler M., Stradling JR. «Mechanisms of vascular damage in obstructive sleep apnea.» *Nat Rev Cardiol* 7 (2010): 677-685.
- Kohler R., Heyken WT., Heinau P., Schubert R., Si H., Kacik M., Busch C., Grgic I., Maier T., Hoyer J. «Evidence for a functional role of endothelial transient receptor potential V4 in shear stress-induced vasodilatation.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (2006): 1495–1502.
- Kojda G., Hambrecht R. «Molecular mechanisms of vascular adaptations to exercise. Physical activity as an effective antioxidant therapy?» *Cardiovasc Res.* 67 (2005): 187-197.
- Kokkinos P. «Physical Activity, Health Benefits, and Mortality Risk » *ISRN Cardiol.* 2012 (2012): 718789.
- Kokkinos P., Myers J. «Exercise and physical activity: clinical outcomes and applications.» *Circulation.* 122 (2010): 1637-1648.
- Koledova VV., Khalil RA. «Ca²⁺, Calmodulin, and Cyclins in Vascular Smooth Muscle Cell Cycle.» *Circul. Research* 98 (2006): 1240–1243.
- Korthuis RJ. *Skeletal Muscle Circulation.* Morgan & Claypool Life Sciences, PA – USA (2011).

- Kositprapa C, Zhang B, Berger S, Canty JM Jr, Lee TC. «Calpain-mediated proteolytic cleavage of troponin I induced by hypoxia or metabolic inhibition in cultured neonatal cardiomyocytes.» *Mol Cell Biochem* 214 (2000): 47-55.
- Koskenvuo M., Kaprio J., Telakivi T., Partinen M., Heikkilä K., Sarna S. «Snoring as a risk factor for ischaemic heart disease and stroke in men.» *Br Med J (Clin Res Ed)*. 294 (1987): 16-19.
- Kotlikoff ML., Wang YX., Xin HB., Ji G. «Calcium release by ryanodine receptors in smooth muscle.» *Novartis Found Symp*. 246 (2002): 108-19.
- Krans JL. «The Sliding Filament Theory of Muscle Contraction.» *Nature Ed. 3* (2010): 66.
- Kruger J., Kunert-Keil C., Bisping F., Brinkmeier H. «Transient receptor potential cation channels in normal and dystrophic mdx muscle.» *Neuromuscul Disord*. 18 (2008): 501-513.
- Kubasov IV., Nechaeva MV., Alekseeva TA. «Effect of acute hypoxia on the mechanical and electrical properties of the isolated skeletal muscles in the last third of chick embryogenesis.» *Russ Fiziol Zh Im I M Sechenova*. 100 (2014): 187-200.
- Kubo H., Libonati JR., Kendrick ZV., Paolone A., Gaughan JP., Houser SR. «Differential effects of exercise training on skeletal muscle SERCA gene expression.» *Med Sci Sports Exerc*. 35 (2003): 27-31.
- Kumar GK., Nanduri J., Peng YJ., Prabhakar NR. «Neuromolecular mechanisms mediating the effects of chronic intermittent hypoxia on adrenal medulla.» *Respir Physiol Neurobiol*. 209 (2015): 115-119.
- Kuriyama H., Kitamura K., Nabata H. «Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues.» *Pharmacol Rev* .47 (1995): 387-573.
- Kusudo T., Wang Z, Mizuno A, Suzuki M, Yamashita H. «TRPV4 deficiency increases skeletal muscle metabolic capacity and resistance against diet-induced obesity.» *J Appl Physiol*. 112 (2012): 1223-1232.
- La fédération française de cardiologie. «Hypertension-arterielle.» (2017). <https://www.fedecardio.org> (access August 2017).
- La Gerche A. Claessen G., Van de Bruaene A., Pattyn N., Van Cleemput J., Gewillig M., Bogaert J., Dymarkowski S., Claus P., Heidbuchel H. «Cardiac MRI: a new gold standard for ventricular volume quantification during high-intensity exercise.» *Circ Cardiovasc Imaging* 6 (2013): 329–338.
- La Gerche A., Claessen G. «Is exercise good for the right ventricle? Concepts for health and disease. » *Can J Cardiol*. 31 (2015): 502–508.
- Lacolley P., Regnault V., Segers P., Laurent S. «Vascular Smooth Muscle Cells and Arterial Stiffening: Relevance in Development, Aging, and Disease.» *Physiological Rev*. 97 (2017): 1555-1617.
- Laing NG., Nowak KJ. «When contractile proteins go bad: the sarcomere and skeletal muscle disease.» *BioEssays*. 27 (2005): 809-822.

- Laitinen PJ., Brown KM., Piippo K., Swan H., Devaney JM., Brahmabhatt B., Donarum EA., Marino M., Tiso N., Viitasalo M., Toivonen L., Stephan DA., and Kontula K. «Mutations of the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) Gene in Familial Polymorphic Ventricular Tachycardia.» *J of Circul.* 103 (2001): 485-490.
- Lanner JT, Georgiou DK, Joshi AD, Hamilton SL. «Ryanodine receptors: structure, expression, molecular details, and function in calcium release.» *CSb Perspect Biol.* 11 (2010): a003996.
- Lannoy M., Slove S., Jacob MP. «The function of elastic fibers in the arteries: beyond elasticity.» *Pathol Biol.* 62 (2014): 79-83.
- Larsen S., Nielsen J., Hansen CN., Nielsen LB, Wibrand F., Stride N., Schroder HD., Boushel R., Helge JW., Dela F., Hey-Mogensen M. «Biomarkers of mitochondrial content in skeletal muscle of healthy young human subjects.» *J Physiol* 590 (2012): 3349–3360.
- Larue C., Ferrieres G., Laprade M., Calzolari C., Granier C. «Antigenic definition of cardiac troponin I.» *Clin Chem Lab Med.* 36 (1998): 361-365.
- Lavie L. «Obstructive sleep apnoea syndrome—an oxidative stress disorder.» *Sleep Med Rev.* 7 (2003): 35-51.
- Lavie P., Herer P., Hoffstein V. «Obstructive sleep apnoea syndrome as a risk factor for hypertension: population study.» *BMJ.* 320 (2000): 479-482.
- Lazarides EJ. «Tropomyosin antibody: the specific localization of tropomyosin in nonmuscle cells.» *Cell Biol.* 65 (1975): 549-61.
- Lee H., Iida T., Mizuno A., Suzuki M., Caterina MJ. «Altered thermal selection behavior in mice lacking transient receptor potential vanilloid 4.» *J Neurosci.* 25 (2005): 1304-1310.
- Leek BT., Mudaliar SR., Henry R., Mathieu-Costello O., Richardson RS. «Effect of acute exercise on citrate synthase activity in untrained and trained human skeletal muscle.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 280 (2001): R441-447.
- Leeper N., Myers J., Zhou M., Nead KT., Syed A., Kojima Y., Caceres RD., Cooke JP. «Exercise capacity is the strongest predictor of mortality in patients with peripheral arterial disease.» *J Vasc Surg.* 57 (2013): 728-733.
- Lefèbvre B., Godin-Ribuot D., Joyeux-Faure M., Caron F., Bessard G., Lévy P., Stanke-Labesque F. «Functional assessment of vascular reactivity after chronic intermittent hypoxia in the rat.» *Respir Physiol Neurobiol.* 150 (2006): 278-286.
- Lefèbvre G. «Marqueurs biologiques de souffrance cardiaques.» *Biotribune* 10 (2004): 30-32.
- Leggio M., Fusco A., Limongelli G., Sgorbini L. «Exercise training in patients with pulmonary and systemic hypertension: A unique therapy for two different diseases.» *Eur J Intern Med.* 47 (2018): 17-24.
- Leloup AJA., Van Hove CE., Heykers GRY., A. Schrijvers DM., De Meyer GRY., and Franssen P. «Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca²⁺-Channels.» *Front Physiol.* 6 (2015): 370- 375.

- Lesh RE., Nixon GF., Fleischer S., Airey JA., Somlyo AP., Somlyo AV. «Localization of Ryanodine Receptors in Smooth Muscle.» *Circ Res.* 82 (1998): 175-185.
- Lesske J., Fletcher EC., Bao G., Unger T. «Hypertension caused by chronic intermittent hypoxia—Influence of chemoreceptors and sympathetic nervous system.» *Hypertension J.* 12 (1997): 1593– 1603.
- Lévy P, Tamisier R, Arnaud C, Monneret D, Baguet JP, Stanke-Labesque F, Dematteis M, Godin-Ribuot D, Ribuot C, Pepin JL. «Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases.» *Front Biosci.* 1 (2012).
- Lévy P., Kohler M., McNicholas WT., Barbé F., McEvoy RD., Somers VK., Lavie L., Pépin JL. «Obstructive sleep apnoea syndrome.» *Nat Rev Dis Primers.* 1 (2015): 1-20.
- Lévy P., Pépin JL., Arnaud C., Baguet JP., Dematteis M., Mach F. «Obstructive sleep apnea and atherosclerosis.» *Prog Cardiovasc Dis.* 51 (2009): 400-410.
- Lévy P., Tamisier R., Arnaud C., Monneret D., Baguet JP., Stanke-Labesque F., Dematteis M., Godin-Ribuot D., Ribuot C., Pepin JL. «Sleep deprivation, sleep apnea and cardiovascular diseases.» *Front Biosci.* 1 (2012): 2007-2021.
- Lévy P., Tamisier R., Minville C., Launois S., Pepin JL. «Sleep apnoea syndrome in 2011: current concepts and future directions.» *Eur Respir Rev.* 20 (2011): 134–146.
- Li C., Jackson RM. «Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 282 (2002): C227-C241.
- Li X., Zima AV., Sheikh F., Blatter LA., Chen J. «Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)-receptor type 2-deficient mice.» *Circulation Research.* 96 (2005): 1274–1281.
- Lieber R. *Skeletal Muscle Structure, Function, and Plasticity: The Physiological Basis of Rehabilitation* (2nd edition). Lippincott Williams and Wilkins, 2002.
- Lijnen HR., Arnout JM., Collen D. «Vascular Endothelial Cell Function and Thrombosis.» In *Cardiovascular Medicine*. Springer, PA – USA (2007).
- LimToP WK., Kumar P., Marshall JM. «Hypoxia is an effective stimulus for vesicular release of ATP from human umbilical vein endothelial cells.» *Placenta* 36 (2015): 759-766.
- Lin Q., Zhao G., Fang X., Peng X., Tang H., Wang H., Jing R., Liu J., Lederer WJ., Chen J., Ouyang K. «IP₃ receptors regulate vascular smooth muscle contractility and hypertension.» *JCI insight.* 1 (2016): e89402.
- Lindberg E., Elmasry A., Gislason T., Johnson BD., Bennaroch EE. «Ventilatory and cardiovascular responses to hypoxia and hypercapnia in multiple system atrophy.» *Arch Neurol.* 67 (2010): 211-216.
- Liou B., Peng Y, Li R, Inskeep V, Zhang W, Quinn B, Dasgupta N, Blackwood R, Setchell KD, Fleming S, Grabowski GA, Marshall J, Sun Y. «Modulating ryanodine receptors with dantrolene attenuates neuronopathic phenotype in Gaucher disease mice.» *Hum Mol Genet.* 25 (2016): 5126-5141.
- Lipp A., Schmelzer JD., Low PA., Janson C., Bengtsson H., Hetta J., Nettelblatt M., Boman G. «Evolution of sleep apnea syndrome in sleepy snorers: a population-based prospective study.» *Am J Respir Crit Care Med.* 159 (1999): 2024-2027.

- Lipskaia L, Chemaly ER, Hadri L, Lompre A-M, Hajjar RJ. «Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase as a therapeutic target for heart failure.» *Exp. on biol. therapy.* 10 (2010): 29-41.
- Lipskaia L., del Monte F., Capiod T., Yacoubi S., Hadri L., Hajjar RJ., Lompre AM. «Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat.» *Circ. Res.* 97 (2005): 488–495.
- Lipskaia L., Hadri L., Lopez JJ., Hajjar R., Bobe R. «Benefit of SERCA2a gene transfer to vascular endothelial and smooth muscle cells: a new aspect in therapy of cardiovascular diseases.» *Current vascular pharmacology in press.* 11 (2013): 465-479.
- Lipskaia L., Hadri L., Lopez JJ., Hajjar R., Bobe R. «Benefit of SERCA2a gene transfer to vascular endothelial and smooth muscle cells: a new aspect in therapy of cardiovascular diseases.» *Cur vascl. Pharmaco.* 11 (2013): 465-479.
- Lipskaia L., Limon I., Hajjar R. «Calcium cycling in synthetic and contractile phasic or tonic vascular smooth muscle cells.» In *Current Basic and Pathological Approaches to the Function of Muscle Cells and Tissues—From Molecules to Humans.* InTech, (2012): e48240.
- Liu HG., Wu HM., Xu YJ. «Changes of blood pressure and expression of NADPH oxidase in carotid body in rats exposed to intermittent hypoxia.» *Zhong. Ha.* 34 (2011): 26-29.
- Liu YG., Li W., Song WH. «Effects of oestrogen on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase activity and gene expression in genioglossus in chronic intermittent hypoxia rat.» *Arch. of oral biol.* 54 (2009): 322-328.
- Lodish H., Berk A., Zipursky SL., Matsudaira P., Baltimore D., Darnell J. *Molecular Cell Biology* (4th edition). WH. Freeman, (2000).
- Logan AG., Perlikowski SM., Mente A., Tisler A., Tkacova R., Niroumand M., Leung RS., Bradley TD. «High prevalence of unrecognized sleep apnoea in drug resistant hypertension.» *J Hypertens.* 19 (2001): 2271-2277.
- Loot AE., Popp R., Fisslthaler B., Vriens J., Nilius B., Fleming I. «Role of cytochrome P450-dependent transient receptor potential V4 activation in flow-induced vasodilatation.» *Cardiovasc Res.* 80 (2008): 445–452.
- Loufrani L., Henrion D. «Role of the cytoskeleton in flow (shear stress)- induced dilation and remodeling in resistance arteries.» *Med Biol Eng Comput* 46 (2008): 451-460.
- Lu YL., Jing W., Feng LS., Zhang L., Xu JF., You TJ., Zhao J. «Effects of hypoxic exercise training on microRNA expression and lipid metabolism in obese rat livers.» *J Zhejiang Univ Sci B.* 15 (2014): 820-829.
- Luedekea JD., McCallb RD., Dillamana RM., Kinsey ST. «Properties of slow- and fast-twitch skeletal muscle from mice with an inherited capacity for hypoxic exercise.» *Comp. Biochem. & Physiol.* 138 (2004): 373– 382.
- Maan A., Mansour M., Anter E., Patel VV., Cheng A., Refaat MM., Ruskin JN., Heist EK. «Obstructive Sleep Apnea and Atrial Fibrillation: Pathophysiology and Implications for Treatment.» *Crit Pathw Cardiol.* 14 (2015): 81-85.

- Maass K., Shekhar A., Lu J., Kang G., See F., Kim EE., Delgado C., Shen S., Cohen L., Fishman GI. «Isolation and characterization of embryonic stem cell-derived cardiac Purkinje cells.» *Stem Cells*. 33 (2015): 1102-12.
- Mabuchi K., Li Y., Tao T., Wang CLA. «Immunocytochemical localization of caldesmon and calponin in chicken gizzard smooth muscle.» *J Muscle Res Cell Motil*. 17 (1996): 243-60.
- Macintosh B., Phillip Gardiner –Alan McComas. *Skeletal Muscle: Form and Function* .(USA (2006 -2nd Edition). Sheridan books, SD)
- Mackrill JJ. «Ryanodine receptor calcium release channels: an evolutionary perspective.» *Adv Exp Med Biol*. 740 (2012): 159-82.
- MacLennan DH., Phillips MS. «Malignant hyperthermia.» *Science*. 256 (1992): 789-794.
- Maeda S., Miyauchi T., Kakiyama T., Sugawara J., Iemitsu M., Irukayama-Tomobe Y., Murakami H., Kumagai Y., Kuno S., Matsuda M. «Effects of exercise training of 8 weeks and detraining on plasma levels of endothelium-derived factors, endothelin-1 and nitric oxide, in healthy young humans.» *Life Sci*. 69 (2001): 1005–1016.
- Mandadi S., Sokabe T., Shibasaki K., Katanosaka K., Mizuno A., Moqrich A., Patapoutian A., Fukumi-Tominaga T., Mizumura K., Tominaga M. «TRPV3 in keratinocytes transmits temperature information to sensory neurons via ATP.» *Pflugers Arch*. 458 (2009): 1093–1102.
- Mansukhani MP., Wang S., Somers VK. «Chemoreflex physiology and implications for sleep apnoea: insights from studies in humans.» *Exp. Physiol. J*. 100 (2015): 130-135.
- Marin J, Encabo A., Briones A., Garcia-Cohen EC., Alonso MJ. «Mechanisms Involved In The Cellular Calcium Homeostasis In Vascular Smooth: Calcium Pumps.» *Life Sciences*. 64 (1999): 279-303.
- Marin JM., Carrizo SJ., Vicente E., Agusti AG. «Long-term cardiovascular outcomes in men with obstructive sleep apnoea-hypopnoea with or without treatment with continuous positive airway pressure: an observational study.» *Lancet* 365 (2005): 1046-1053.
- Marks AR, Tempst P, Hwang KS, Taubman MB, Inui M, Chadwick C, Fleischer S, Nadal-Ginard B. «Molecular cloning and characterization of the ryanodine receptor/junctional channel complex cDNA from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.» *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 (1989): 8683-8687.
- Marks AR. «Calcium channels expressed in vascular smooth muscle.» *Circul*. 86 (1992): 1-7.
- Marques CM., Nascimento FAM., Mandarim-de-Lacerda CA., Aguila MB. «Exercise training attenuates cardiovascular adverse remodeling in adult ovariectomized spontaneously hypertensive rats. » *Menopause* 13 (2006): 87-95.
- Marston S., El-Mezgueldi M. «Role of tropomyosin in the regulation of contraction in smooth muscle.» *Adv Exp Med Biol*. 644 (2008): 110-123.
- Marston S., Memo M., Messer A., Papadaki E., Nowak E., McNamara E., Ong R, El-Mezgueldi M., Li X., Lehman W. «Mutations in repeating structural motifs of

tropomyosin cause gain of function in skeletal muscle myopathy patients.» *Hum Mol Genet.* 22 (2013): 4978–4987.

- Marston SB., Copeland O., Messer AE., MacNamara E., Nowak K., Zampronio CG., Ward DG. «Tropomyosin isoform expression and phosphorylation in the human heart in health and disease.» *J Muscle Res Cell Motil.* 34 (2013): 189-197.
- Martin C., Gunning P. «Isoform sorting of tropomyosins.» *Adv Exp Med Biol* 644 (2008): 187–200.
- Martin E., Dahan D., Cardouat G., Gillibert-Duplantier J., Marthan R., Savineau JP., Ducret T. «Involvement of TRPV1 and TRPV4 channels in migration of rat pulmonary arterial smooth muscle cells.» *Pflugers Arch* 464 (2012): 261–272.
- Martin VV., Beierlein M., Morgan JL., Rothe A., Gea KR. «Novel fluo-4 analogs for fluorescent calcium measurements.» *Cell Calcium* 36 (2004): 509–514.
- Martinez D., Vasconcellos LF., de Oliveira PG., Konrad SP. «Weight loss and brown adipose tissue reduction in rat model of sleep apnea.» *Lipids Health Dis.* 31 (2008): 20-26.
- Marx SO. «Ryanodine Receptors in Smooth Muscle.» In *Ryanodine Receptors Structure, Function and dysfunction in clinical disease.* Springer, London, UK (2005).
- Matsuki K., Takemoto M., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S, Takeshima H., Imaizumi Y. «Ryanodine receptor type 3 does not contribute to contractions in the mouse myometrium regardless of pregnancy.» *Pflugers Arch.* 469 (2017): 313-326.
- Matsumoto M., Nakagawa T., Inoue T., Nagata E., Tanaka K., Takano H., Minowa O., Kuno J., Sakakibara S., Yamada M., Yoneshima H., Miyawaki A., Fukuuchi Y., Furuichi T., Okano H., Mikoshiba K., Noda T. «Ataxia and epileptic seizures in mice lacking type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor.» *Nature* 379 (1996): 168-171.
- Matsumoto T., Tanizawa K., Tachikawa R., Murase K., Minami K., Inouchi M., Handa T., Oga T., Hirai T., Chin K. «Associations of obstructive sleep apnea with truncal skeletal muscle mass and density.» *Scientific Reports* 8 (2018): 6550-6558.
- Mattson MP. «ER calcium and Alzheimer's disease: in a state of flux.» *Sci signal.* 3 (2010): 114-118.
- Maxwell JT., Domeier TL, Blatter LA. «Dantrolene prevents arrhythmogenic Ca²⁺ release in heart failure.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 302 (2012): H953-H963.
- Maytum R., Konrad M., Lehrer SS., Geeves MA. «Regulatory Properties of Tropomyosin Effects of Length, Isoform, and N-Terminal Sequence.» *Biochemistry.* 40 (2001): 7334–7341.
- McGuire M., Bradford A. «Chronic intermittent hypercapnic hypoxia increases pulmonary arterial pressure and haematocrit in rats.» *Eur Respir J.* 18 (2001): 279–285.
- McGuire M., Bradford A. «Chronic intermittent hypoxia increases haematocrit and causes right ventricular hypertrophy in the rat.» *Respiration Physiology* 117 (1999): 53-58.
- McMorrow C., Fredsted A., Carberry J., O'Connell RA., Bradford A., Jones JF., O'Halloran KD. «Chronic hypoxia increases rat diaphragm muscle endurance and sodium-potassium ATPase pump content.» *Eur Respir J.* 37 (2011): 1474-1481.

- Mehra R., Benjamin EJ., Shahar E., Gottlieb DJ., Nawabit R., Kichner HL., Sahadevan J., Readline S. «Association of nocturnal arrhythmias with sleep-disordered breathing: the Sleep Heart Health Study.» *Am J Respir Crit Care Med.* 173 (2006): 910-916.
- Meissner G. «The structural basis of ryanodine receptor ion channel function.» *J Gen Physiol.* 149 (2017): 1065-1089.
- Melissa L., MacDougall JD., Tarnopolsky MA., Cipriano N., Green, HJ. «Skeletal muscle adaptations to training under normobaric hypoxic versus normoxic conditions.» *Med. Sci. Sports Exerc.* 29 (1997): 238–243.
- Messegue A., Planells-Cases R., Ferrer-Montiel A. «Physiology and Pharmacology of the Vanilloid Receptor.» *Current Neuropharma.* 4 (2006): 1-15
- Messenger SA., Ciriello J. «Effects of intermittent hypoxia on leptin signalling in the carotid body.» *Neurosci.* 232 (2013): 216-225.
- Michiels C. «Endothelial cell functions.» *J Cell Physiol.* 196 (2003): 430-43.
- Michiels C. «Physiological and Pathological Responses to Hypoxia.» *Am J Pathol.* 164 (2004): 1875–1882.
- Miele EM., Headley SAE. «The Effects of Chronic Aerobic Exercise on Cardiovascular Risk Factors in Persons with Diabetes Mellitus.» *Curr Diab Rep.* 17 (2017): 1-7.
- Mikoshiba K. «IP3 receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts.» *J Neurochem.* 102 (2007): 1426-1446.
- Milleron O. «Risque cardiovasculaire et syndrome d'apnées obstructives du sommeil.» *mt cardio* 1 (2005): 397-406.
- Minke B. «TRP channels and Ca²⁺ signaling.» *Cell Calcium.* 40 (2006): 261-275.
- Mironneau J., Coussin F, Jeyakumar LH, Fleischer S, Mironneau C, Macrez N. «Contribution of ryanodine receptor subtype 3 to Ca²⁺ responses in Ca²⁺-overloaded cultured rat portal vein myocytes.» *J Biol Chem.* 276 (2001): 11257-11264.
- Mitchell BM., Chitaley KC., Webb RC. «Vascular smooth muscle contraction and relaxation.» In *Hypertension Primer: The Essentials of High Blood Pressure.* Am. Heart Assoc., 2003.
- Mizuno A., Matsumoto N., Imai M., Suzuki M. «Impaired osmotic sensation in mice lacking TRPV4.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 285 (2003): C96-101.
- Mulvany MJ. «Small artery remodeling in hypertension.» *Curr Hypertens Rep* 4 (2002): 49-55.
- Mokdad AH., Ford ES., Bowman BA., Dietz WH., Vinicor F., Bales VS., Marks JS. «Prevalence of Obesity, Diabetes, and Obesity-Related Health Risk Factors, 2001.» *JAMA.* 289 (2003): 76-79.
- Monay MN., Thompson PD. «The effect of physical activity on endothelial function in man.» *Acta Physiol. Scand.* 180 (2004): 113-123.
- Mondin L., Balghi H, Constantin B, Cognard C, Sebille S. «Negative modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression prevents dystrophin-deficient muscle cells death.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 297 (2009): C1133-C1145.
- Monneret D., Pepin JL., Godin-Ribuot D., Ducros V., Baguet JP., Levy P., Faure P. «Association of urinary 15-F_{2t}-isoprostane level with oxygen desaturation and carotid

intima-media thickness in nonobese sleep apnea patients.» *Free Radic Biol Med.* 48 (2010): 619-625.

- Montell C., Rubin GM. «Molecular characterization of the *Drosophila* *trp* locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction.» *Neuron.* 2 (1989): 1313-1323.
- Montén C., Gudjonsdottir AH., Browaldh L., Arnell H., Nilsson S., Agardh D., Naluai AS. «Genes involved in muscle contractility and nutrient signaling pathways within celiac disease risk loci show differential mRNA expression.» *BMC Med Genet.* 16 (2015): doi: s12881.
- Montero D., Roberts CK., Vinet A. «Effect of aerobic exercise training on arterial stiffness in obese populations: a systematic review and meta-analysis.» *Sports Med.* 44 (2014): 833-843.
- Moraga FA., Osorio J., Calderón-Jofré R., Pedreros A. «Hemoconcentration During Maximum Exercise in Miners with Chronic Intermittent Exposure to Hypobaric Hypoxia (3800 m).» *High Alt Med Biol.* 1 (2017): 15-20.
- Moran MM., McAlexander MA., Bíró T., Szallasi A. «Transient receptor potential channels as therapeutic targets.» *Nat Rev Drug Discov.* 10 (2011): 601-602.
- More JY., Bruna BA., Lobos PE., Galaz JL., Figueroa PL., Namias S., Sánchez GL., Barrientos GC., Valdés JL., Paula-Lima AC., Hidalgo C., Adasme T. «Calcium Release Mediated by Redox-Sensitive RyR2 Channels Has a Central Role in Hippocampal Structural Plasticity and Spatial Memory.» *Antioxid Redox Signal.* 1 (2018): 1-7.
- Morel JL., Fritz N., Lavie JL., Mironneau J. «Crucial role of type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors for acetylcholine-induced Ca²⁺ oscillations in vascular myocytes.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (2003): 1567– 1575.
- Morel JL., Rakotoarisoa L., Jeyakumar LH, Fleischer S, Mironneau C, Mironneau J. «Decreased expression of ryanodine receptors alters calcium-induced calcium release mechanism in mdx duodenal myocytes.» *J Biol Chem.* 279 (2004): 21287-21293.
- Moreland RS. «Regulation of Smooth Muscle Contraction: A Hypothesis based on skinned Fiber Studies.» In *Regulation of Smooth Muscle Contraction.* Springer, NY-USA (1991).
- Moysés MR., Barker LA., Cabral AM. «Sex hormone modulation of serotonin-induced coronary vasodilation in isolated heart.» *Braz J Med Biol Res.* 34 (2001): 949-958.
- Mueller PJ. «Physical (in)activity-dependent alterations at the rostral ventrolateral medulla : Influence on sympathetic nervous system regulation.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 298 (2010): R1468–R1474.
- Mukherjee S., Trice J., Shinde P., Willis RE., Pressley TA., Perez-Zoghbi JF. «Ca²⁺ oscillations, Ca²⁺ sensitization, and contraction activated by protein kinase C in small airway smooth muscle.» *The Journal of General Physiology.* 141 (2013): 165–178.
- Mulligan-Kehoe MJ., Simons M. «Vasa vasorum in normal and diseased arteries.» *Circul.* 129 (2014): 2557-2566.
- Mulvany MJ., Halpern W. «Mechanical properties of vascular smooth muscle cells in situ.» *Nature.* 260 (1967): 617–619.

- Mungai PT., Waypa GB., Jairaman A., Prakriya M., Dokic D., Ball MK., Schumacker PT. «Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels.» *Mol. & Cell. Biol.* 31 (2011): 3531-3545.
- Munk PS., Butt N., Larsen AI. «High-intensity interval exercise training improves heart rate variability in patients following percutaneous coronary intervention for angina pectoris.» *Int J Cardiol.* 145 (2010): 312–314.
- Murphy CT. «The sequence of the myosin 50-20K loop affects myosin's affinity for actin throughout the actin-myosin ATPase cycle and its maximum ATPase activity.» *JA Biochem.* 38 (1999): 3785–3792.
- Myers J., Nead KT., Chang P., Abella J., Kokkinos J., Leeper NJ. «Improved Reclassification of Mortality Risk by Assessment of Physical Activity in Patients Referred for Exercise Testing.» *Am J of Med.* 128 (2015): 396-402.
- Myers J., Prakash M., Froelicher V., Do D., Partington S., Atwood JE. «Exercise capacity and mortality among men referred for exercise testing.» *N Engl J Med.* 346 (2002): 793-801.
- Nadeem R., Harvey M., Singh M., Khan AA., Albustani M., Baessler A., Madbouly EM., Sajid H., Khan M., Navid N. «Patients with obstructive sleep apnea display increased carotid intima media: a meta-analysis.» *Int J Vasc Med.*, (2013): 1-8.
- Naeije R., Saggar R., Badesch D., Rajagopalan S., Gargani L., Rischard F., Ferrara F., Marra AM., D'Alto M., Bull TM., Saggar R., Grünig E., Bossone E. «Exercise-Induced Pulmonary Hypertension: Translating Pathophysiological Concepts Into Clinical Practice.» *Chest.* 153 (2018): 1-26.
- Naeije R., Vanderpool R., Dhakal BP., Saggar R., Saggar R., Vachiery JL., Lewis GD. «Exercise-induced Pulmonary Hypertension Physiological Basis and Methodological Concerns.» *Am J Respir Crit Care Med* 187 (2013): 576–583.
- Nanduri J., Yuan G., Kumar GK., Semenza GL., Prabhakar NR. «Transcriptional responses to intermittent hypoxia.» *Respir Physiol Neurobiol.* 164 (2008): 277–281.
- Narayanan D., Adebiyi A., Jaggar JH. «Inositol trisphosphate receptors in smooth muscle cells.» *Am J of Physiol - Heart and Circul Physiol.* 302 (2012): H2190–H2210.
- Nathan R. *Cardiac Muscle: the Regulation of Excitation and Contraction* (1st edition). Elsevier, London, UK (1986).
- Naumov DE., Kolosov VP., Perelman JM., Prikhodko AG. «Influence of TRPV4 gene polymorphisms on the development of osmotic airway hyperresponsiveness in patients with bronchial asthma.» *Dokl Biochem Biophys.* 469 (2016): 260-263.
- Nelson MT., Cheng H., Rubart M., Santana LF., Bonev AD., Knot HJ., Lederer WJ. «Relaxation of arterial smooth muscle by calcium sparks.» *Science.* 270 (1995): 633–637.
- Nelson TE., Lin M, Zapata-Sudo G, Sudo RT. «Dantrolene sodium can increase or attenuate activity of skeletal muscle ryanodine receptor calcium release channel. Clinical implications.» *Anesthesiol.* 84 (1996): 1368-1379.

- Neylon CB., Richards SM, Larsen MA, Agrotis A, Bobik A. «Multiple types of ryanodine receptor/Ca²⁺ release channels are expressed in vascular smooth muscle. .» *Biochem Biophys Res Commun.* 215 (1995): 814-21.
- Ngo VA., Perissinotti LL., Miranda W., Chen SRW., Noskov SY. «Mapping Ryanodine Binding Sites in the Pore Cavity of Ryanodine Receptors.» *Biophys J.* 112 (2017): 1645-1653.
- Nieto FJ., Young TB., Lind BK., Shahar E., Samet JM., Redline S., D'Agostino RB., Newman AB., Lebowitz MD., Pickering TG. «Association of sleep-disordered breathing, sleep apnea, and hypertension in a large community-based study. Sleep Heart Health Study.» *JAMA* 283 (2000): 1829-1836.
- Nieto-Posadas A., Jara-Oseguera A., Rosenbaum T. «TRP channel gating physiology.» *Curr Top Med Chem.* 11 (2011): 2131-2150.
- Nilius B., Talavera K., Owsianik G., Prenen J., Droogmans G., Voets T. «Gating of TRP channels : a voltage connection?» *J Physiol.* 567 (2005): 35–44.
- Nilius B., Vennekens R., Prenen J., Hoenderop JG., Bindels RJ., Droogmans G. «Whole-cell and single channel monovalent cation currents through the novel rabbit epithelial Ca²⁺ channel ECaC.» *J Physiol.* 527 (2000): 239-248.
- Nilius B., Vriens J., Prenen J., Droogmans G., Voets T. «TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 286 (2004): C195-C205.
- Nixon GF., Mignery GA., Somlyo AV. «Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle.» *J Muscle Res Cell Motil.* 15 (1994): 682-700.
- Nixon GF., Mignery GA., Somlyo AV. «Immunogold localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors and characterization of ultrastructural features of the sarcoplasmic reticulum in phasic and tonic smooth muscle.» *J Muscle Res Cell Motil.* 15 (1994): 682-700.
- North AJ., Gimona M., Cross RA., Small JV. «Calponin is localized in both the contractile apparatus and the cytoskeleton of smooth muscle cells.» *J Cell Sci.* 107 (1994): 437-44.
- Novák P., Zachařová G., Soukup T. «Individual, age and sex differences in fiber type composition of slow and fast muscles of adult Lewis rats: comparison with other rat strains.» *Physiol Res.* 59 (2010): 783-801.
- Numata T., Kiyonaka S., Kato K., Takahashi N., Mori Y. «Activation of TRP Channels in Mammalian Systems.» In *TRP Channels.* CRC Press/T&F, 2011.
- Nyberg M., Seidelin K., Andersen TR., Overby NN., Hellsten Y., Bangsbo J. «Biomarkers of vascular function in premenopausal and recent postmenopausal women of similar age: Effect of exercise training.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 306 (2014): R510–R517.
- O’Conor CJ., Griffin TM., Liedtke W., Guilak F. «Increased susceptibility of Trpv4-deficient mice to obesity and obesity induced osteoarthritis with very high-fat diet.» *Ann Rheum Dis.* 72 (2013): 300–304.

- O’Neil RG., Heller S. «The mechanosensitive nature of TRPV channels.» *Pflugers Archiv-Eur J Physiol.* 451 (2005): 193-203.
- O’Connor GT., Caffo B., Newman AB., Quan SF., Rapoport DM., Redline S., Resnick HE., Samet J., Shahar E. «Prospective study of sleep-disordered breathing and hypertension: the Sleep Heart Health Study.» *Am J Respir Crit Care Med.* 179 (2009): 1159-1164.
- Oelberg DA., Evans AB., Hrovat MI., Pappagianopoulos PP., Patz S., Systrom DM. «Skeletal muscle chemoreflex and pHi in exercise ventilatory control.» *J Appl Physiol* 84 (1998): 676–682.
- Oka T., Sato K, Hori M, Ozaki H, Karaki H. «Xestospongin C, a novel blocker of IP3 receptor, attenuates the increase in cytosolic calcium level and degranulation that is induced by antigen in RBL-2H3 mast cells.» *Br J Pharmacol.* 135 (2002): 1959-1966.
- Okumachi E., Lee SY., Niikura T., Iwakura T., Dogaki Y., Waki T., Takahara S., Ueha T., Sakai Y., Kuroda R., Kurosaka M. «Comparative analysis of rat mesenchymal stem cells derived from slow and fast skeletal muscle in vitro.» *Int Orthop.* 39 (2015): 569-76.
- Olafiranye O., Akinboboye O., Mitchell JE., Ogedegbe G., Jean-Louis G. «Obstructive sleep apnea and cardiovascular disease in blacks: A call to action from the Association of Black Cardiologists.» *Am Heart J.* 165 (2013): 468-476.
- Olesen C., Picard M., Winther AM., Gyruup C., Morth JP., Oxvig C., Møller JV., Nissen P. «The structural basis of calcium transport by the calcium pump.» *Nature.* 450 (2007): 1036-1042.
- Olivetti G., Melissari M., Balbi T., Quaini F., Sonnenblick EH., Anversa P. «Myocyte nuclear and possible cellular hyperplasia contribute to ventricular remodeling in the hypertrophic senescent heart in humans.» *J Am Coll Cardiol* 24 (1994): 40–149.
- Orallo F. «Regulation of Cystolic Calcium Levels in Vascular Smooth Muscle.» *Pharmacol. Ther* 69. (1996): 153-171.
- Ørtenblad N., Lunde PK, Levin K, Andersen JL, Pedersen PK. «Enhanced sarcoplasmic reticulum Ca(2+) release following intermittent sprint training.» *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 279 (2000): R152-R160.
- Otsu H., Yamamoto A., Maeda N., Mikoshiba K., Tashiro Y. «Immunogold localization of inositol 1, 4, 5-trisphosphate (InsP3) receptor in mouse cerebellar Purkinje cells using three monoclonal antibodies.» *Cell Struct Funct.* 15 (1990): 163-173.
- Ouyang K., Leandro Gomez-Amaro R., Stachura DL., Tang H., Peng X., Fang X., Traver D., Evans SM., Chen J. «Loss of IP3R-dependent Ca2+ signalling in thymocytes leads to aberrant development and acute lymphoblastic leukemia.» *Nat Commun.* 4814 (2014): 1-25.
- Owens RL., Edwards BA., Eckert DJ., Jordan AS., Sands SA., Malhotra A., White DP., Loring SH., Butler JP., Wellman A. «An Integrative Model of Physiological Traits Can be Used to Predict Obstructive Sleep Apnea and Response to Non Positive Airway Pressure Therapy.» *Sleep* 38 (2015): 961-970.

- Oza N., Baveja S., Khayat R., Houmsse M. «Obstructive sleep apnea and atrial fibrillation: understanding the connection.» *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 12 (2014): 613-621.
- Paffenbarger RS Jr., Hyde RT., Wing AL., Hsieh CC. «Physical activity, all-cause mortality, and longevity of college alumni.» *N Engl J Med.* 314 (1986): 605-613.
- Pagkalos M., Koutlianos N., Kouidi E., Pagkalos E., Mandroukas K., Deligiannis A. «Heart rate variability modifications following exercise training in type 2 diabetic patients with definite cardiac autonomic neuropathy.» *Br J Sports Med.* 42 (2008): 47–54.
- Palmer AE., Tsien RY. «Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators.» *Nat Protoc.* 1 (2006): 1057-1065.
- Papageorgiou N. *Cardiovascular Diseases: Genetic Susceptibility, Environmental Factors and Their Interaction.* Elsevier, London, UK. (2016).
- Pappano AJ., Gil Wier W. «Coronary Circulation.» In *Cardiovascular Physiology* (10th Edition). Elsevier, PA- USA (2013).
- Parati G., Ochoa JE., Bilo G., Mattaliano P., Salvi P., Kario K., Lombardi C. «Obstructive sleep apnea syndrome as a cause of resistant hypertension. .» *Hypertens Res.* 37 (2014): 601-613.
- Parati G., Revera M., Giuliano A., Faini A., Bilo G., Gregorini F., Lisi E., Salerno S., Lombardi C., Ramos Becerra CG., Mancina G., Salvi P. «Effects of acetazolamide on central blood pressure, peripheral blood pressure, and arterial distensibility at acute high altitude exposure.» *Eur Heart J* 34 (2013): 759-766.
- Parpaite T., Cardouat G, Mauroux M, Gillibert-Duplantier J, Robillard P, Quignard JF, Marthan R, Savineau JP, Ducret T. «Effect of hypoxia on TRPV1 and TRPV4 channels in rat pulmonary arterial smooth muscle cells.» *Pflugers Arch.* 468 (2016): 111-130.
- Parys JB., Decuyper JP., Bultynck G. «Role of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor/Ca²⁺-release channel in autophagy.» *Cell Comm. Sign.* 10 (2012): 1-17.
- Pasha SM., Wiria AE., Wammes LJ., Smit JW., Partono F., Supali T., Yazdanbakhsh M., Tamsma JT. «Blood pressure class and carotid artery intima-media thickness in a population at the secondary epidemiological transition.» *J Hypertens.* 29 (2011): 2194-2200.
- Pasiakos SM., Berryman CE., Carrigan CT., Young AJ., Carbone JW. «Muscle Protein Turnover and the Molecular Regulation of Muscle Mass during Hypoxia.» *Med Sci Sports Exerc.* 49 (2017): 1340-1350.
- Pate M., Damarla V., Chi DS., Negi S., Krishnaswamy G. 2010. «Endothelial cell biology: role in the inflammatory response.» *Adv Clin Chem.* 52 109-130.
- Pattanakuhar S, Pongchaidecha A., Chattipakorn N., Chattipakorn SC. «The effect of exercise on skeletal muscle fibre type distribution in obesity: From cellular levels to clinical application.» *Obes Res Clin Pract.* 11 (2017): 112-132.
- Pavlov MY., Watts RE., Tan Z., Cornish VW., Ehrenberg M., Forster AC. «Slow peptide bond formation by proline and other N- alkylamino acids in translation.» *Proc. Natl Acad. Sci.* 106 (2009): 50–54.

- Payen JF., Fabre F., Joubert F., Tamasier R., Pepin JL. «Le syndrome d'apnée obstructive du sommeil: prise en charge anesthésique.» Le Congrès Médecins. Conférence d'Actualisation. Sfar, (2016).
- Pedersen BK., Saltin B. «Evidence for prescribing exercise as therapy in chronic disease.» *Scand J Med Sci Sports*. 16 (2006): 3-63.
- Pedersen SF, Owsianik G., Nilius B. «TRP channels: an overview.» *Cell Calc*. 38 (2005): 233-252.
- Pedrosa RP., Drager LF., de Paula LKG., Amaro ACS., Bortolotto LA., Lorenzi-Filho G. «Effects of OSA treatment on BP in patients with resistant hypertension: a randomized trial.» *Chest*. 144 (2013): 1487-1494.
- Pellegrin M., Mazzolai L., Berthelot A., Laurant P. «Endothelial dysfunction and cardiovascular risk. Exercise protects endothelial function and prevents cardiovascular disease.» *Sciences & sports* 24 (2009): 63-73.
- Peng Y., Chen X., Zhang H., Xu Q., Hacker TA., Ge Y. «Top-down targeted proteomics for deep sequencing of tropomyosin isoforms.» *J Proteome Res*. 12 (2013): 187-198.
- Peppard PE., Young T., Palta M., Skatrud J. «Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension.» *N Engl J Med*. 342 (2000): 1378-1384.
- Peppard PE., Young T., Barnet JH., Palta M., Hagen EW., Hla KM. «Increased prevalence of sleep-disordered breathing in adults.» *AM J Epidemiol*. 177 (2013): 1006-1014.
- Peppard PE., Young T., Palta M., Skatrud J. «Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension.» *N Engl J Med* 342 (2000): 1378-1384.
- Periasamy M., Kalyanasundaram A. «SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease.» *Muscle Nerve*. 35 (2007): 430-442.
- Petegem FV. «Ryanodine Receptors: Allosteric Ion Channel Giants.» *J Mol Biol*. 427 (2015): 31-53.
- Petegem FV. «Ryanodine Receptors: Structure and Function.» *J Biol Chem*. 287 (2012): 31624-31632.
- Petrović-Oggiano G., Damjanov V., Gurinović M., Glibetić M. «Physical activity in prevention and reduction of cardiovascular risk.» *Med. Pregl*. 63 (2010): 200-207
- Pillar G., Shehadeh N. «Abdominal fat and sleep apnea: the chicken or the egg.» *Diabetes Care* 31 (2008): S303–309.
- Pinet F. «A quoi sert le système endothéline?» *Med Sci*. 20 (2004): 339–345.
- Place N., Ivarsson N., Venckunas T., Neyroud D., Brazaitis M., Chengb AJ., Ochala J., Kamandulisc J., Girard S., Volungeviciusc G., Pauzas H., Mekidecheg A., Kaysera B., Martinez-Redondob V., Ruasb JL., Brutonb JL., Truffertg A., Lannerb JT., Skurvydasc A., Westerblad A. «Ryanodine receptor fragmentation and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak after one session of high-intensity interval exercise.» *PNAS*. 112 (2015): 15492–15497.

- Poburko D., Lhote P., Szado T., Behra T., Rahimian R., McManus B., Van Breemen C., Ruegg UT. «Basal calcium entry in vascular smooth muscle.» *Eur J Pharmacol.* 505 (2004): 19-29.
- Poburko D., Liao CH., van Breemen C., Demaurex N. «Mitochondrial regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in vascular smooth muscle cells.» *Circ Res.* 104 (2009): 104-112.
- Poburko D., Liao CH., van Breemen C., Demaurex N. «Mitochondrial regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in vascular smooth muscle cells. .» *Circ Res.* 104 (2009): 104-112.
- Pollack GH. «Muscle contraction mechanism: are alternative engines gathering steam?» *Cardiovas Research.* 29 (1995): 737–746.
- Pollock JD., Makaryus AN. «Physiology, Cardiovascular, Cardiac Cycle.» *StatPeals pub.* 1 (2017): Treasure Island, FL, USA.
- Polster A., Nelson BR., Olson EL., Beama KG. «Stac3 has a direct role in skeletal muscle-type excitation–contraction coupling that is disrupted by a myopathy-causing mutation.» *Proc Natl Acad Sci USA.* 113 (2016): 10986–10991.
- Potter JD. «Preparation of troponin and its subunits.» *Methods Enzymol.* 85 (1982): 241-263.
- Powell FL., Garcia N. «Physiological effects of intermittent hypoxia.» *High Alt Med Biol.* 1 (2000): 125-136.
- Powers SK., Smuder AJ., Kavazis AN., Quindry JC. «Mechanisms of Exercise-Induced Cardioprotection.» *Physiol. J.* 29 (2014): 27–38.
- Prabhakar NR., Dick TE., Nanduri J., Kumar GK. «Systemic, cellular and molecular analysis of chemoreflex-mediated sympathoexcitation by chronic intermittent hypoxia.» *Exp Physiol.* 92 (2007): 39-44.
- Prabhakar NR., Peng YJ., Jacono FJ., Kumar GK., Dick TE. «Cardiovascular alterations by chronic intermittent hypoxia: importance of carotid body chemoreflexes.» *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 32 (2005): 447-449.
- Pratt R. «Muscle Tissu.» In *AnatomyOne.* Amirsys, (2012).
- Pritschow BW, Lange T, Kasch J, Kunert-Keil C, Liedtke W, Brinkmeier H. «Functional TRPV4 channels are expressed in mouse skeletal muscle and can modulate resting Ca²⁺ influx and muscle fatigue.» *Pflugers Arch.* 461 (2011): 115-122.
- Proudfoot D., Shanahan CM. «Biology of calcification in vascular cells: intima versus media.» *Herz.* 26 (2001): 245-251.
- Provencher S., Chemla D., Herve P., Sitbon O., Humbert M., Simonneau G. «Heart rate responses during the 6-minute walk test in pulmonary arterial hypertension.» *Eur Respir J.* 27 (2006): 114–120.
- PubMed Health NCBI. Blood Vessels, Systemic Circulation (Blood Circulation), Pulmonary Circulation. NCBI- National Center for Biotechnology Information. 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmedhealth/PMHT0025771/> (access Decembre 2017).
- Pugsley MK., Tabrizchi R. «The vascular system An overview of structure and function.» *J Pharmacol and Toxic Meth.* 44 (2000): 333-340.

- Punjabi NM. «The epidemiology of adult obstructive sleep apnea.» *Proc Am Thorac Soc.* 5 (2008): 136-143.
- Quaini F., Cigola E., Lagrasta C., Saccani G., Quaini E., Rossi C., Olivetti G., Anversa P. «End-stage cardiac failure in humans is coupled with the induction of proliferating cell nuclear antigen and nuclear mitotic division in ventricular myocytes.» *Circ Res.* 75 (1994): 1050–1063.
- Quan SF., Budhiraja R., Clarke DP., Goodwin JL., Gottlieb DJ., Nichols DA., Simon RD., Smith TW., Walsh JK., Kushida CA. «Impact of Treatment with Continuous Positive Airway Pressure (CPAP) on Weight in Obstructive Sleep Apnea.» *J Clin Sleep Med.* 9 (2013): 989–993.
- Quane KA., Healy JM, Keating KE, Manning BM, Couch FJ, Palmucci LM, Doriguzzi C, Fagerlund TH, Berg K, Ording H. «Mutations in the ryanodine receptor gene in central core disease and malignant hyperthermia.» *Nat Genet.* 5 (1993): 51-55.
- Rajala U., Päivänsalo M., Laakso M., Pelkonen O., Suramo I., Keinänen-Kiukaanniemi S. "Associations of blood pressure with carotid intima-media thickness in elderly Finns with diabetes mellitus or impaired glucose tolerance.» *J of Hum Hypert.* 17 (2003): 705–711.
- Rajendran P., Rengarajan T., Thangavel J., Nishigaki Y., Sakthisekaran D., Sethi G., Nishigaki I. «The Vascular Endothelium and Human Diseases.» *Int J Biol Sci.* 9 (2013): 1057–1069.
- Rall JA. «Mechanism of Muscular Contraction.» In *Perspectives in Biology.* Springer, PA - USA (2014).
- Ramos-Franco J., Bare D., Caenepeel S., Nani A., Fill M., Mignery G. «Single-channel function of recombinant type 2 inositol 1,4, 5-trisphosphate receptor.» *Biophys J.* 79 (2000): 1388-1399.
- Randhawa PK., Jaggi AS. «TRPV4 channels: physiological and pathological role in cardiovascular system.» *Basic Res Cardiol.* 110 (2015): 47-54.
- Rassmussen H. «The Calcium Messenger System.» *The New England J of Med.* 314, (1986): 1094-1101.
- Rath G., Saliez J., Behets G., Romero-Perez M., Leon-Gomez E., Bouzin C., Vriens J., Nilius B., Feron O., Dessy C. «Vascular hypoxic preconditioning relies on TRPV4-dependent calcium influx and proper intercellular gap junctions communication.» *Arteriosc Thromb Vasc Biol.* 32 (2012): 2241-2249.
- Ravi Kiran T1, Subramanyam MV, Prathima S, Asha Devi S. «Blood lipid profile and myocardial superoxide dismutase in swim-trained young and middle-aged rats: comparison between left and right ventricular adaptations to oxidative stress.» *J Comp Physiol B.* 176 (2006): 749-762.
- Ray CA. «Sympathetic adaptations to one-legged training.» *J Appl Physiol* 86 (1999): 1583–1587.
- Rebbeck RT., Karunasekara Y., Board PG., Beard NA., Casarotto MG., Dulhunty AF. «Skeletal muscle excitation-contraction coupling: who are the dancing partners?» *Int J Biochem Cell Biol.* 48 (2014): 28-38.

- Reboul C., Tanguy S., Dauzat M., Obert P. «Chronic exercise does not prevent hypoxia-induced increased aortic sensitivity to endothelin in rats.» *Vasc. Pharmacol.* 44 (2006): 333–337.
- Recchioni R., Marcheselli F., Antonicelli R., Mensà E., Lazzarini R., Procopio AD., Olivieri F. «Epigenetic effects of physical activity in elderly patients with cardiovascular disease.» *Exp Gerontol.* (2017): 17-27.
- Recommandations de l'Agence nationale d'accréditation et d'évaluation en santé (Anaes). 2008. www.e-sante.fr (access Juillet 2017).
- Reddy YNV., Andersen MJ., Obokata M., Koepp KE., Kane GC., Melenovsky V., Olson TP., Borlaug BA. «Arterial Stiffening With Exercise in Patients With Heart Failure and Preserved Ejection Fraction.» *J Am Coll Cardiol.* 70 (2017): 136-148.
- Redline S., Yenokyan G., Gottlieb DJ., Shahar E., O'Connor GT., Resnick HE., Diener-West M., Sanders MH., Wolf PA., Geraghty EM., Ali T., Lebowitz M., Punjabi NM. «Obstructive sleep apnea hypopnea and incident stroke: the sleep heart health study.» *Am J Respir Crit Care Med.* 182 (2010): 269-277.
- Reisner HM. *Pathology: A Modern Case Study.* McGill-Hill Education, Canada (2015).
- Ren J., Liu W., Deng Y., Li GC., Pan YY., Xie S., Jin M., Liu HG. 2017. «Losartan attenuates aortic endothelial apoptosis induced by chronic intermittent hypoxia partly via the phospholipase C pathway.» *Sleep Breath.* 21 (2017): 679-689.
- Reynolds BA., Weiss S. «Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system.» *Science* 255 (1992): 1707–1710.
- Richter MJ., Grimminger J., Krüger B., Ghofrani HA., Mooren FC., Gall H., Krüger K. «Effects of exercise training on pulmonary hemodynamics, functional capacity and inflammation in pulmonary hypertension.» *Pulmonary Circulation* 7 (2017): 20–37.
- Ritman EL., Lerman A. «The Dynamic Vasa Vasorum.» *Cardiovasc Res.* 75 (2007): 649–658.
- Rizzo DC. *Fundamentals of anatomy and physiology* (4th edition). Cengage Learning, NY – USA (2015).
- Rizzo V., Kim D., Durfin WN., DeFouw DO. «Differentiation of the microvascular endothelium during early angiogenesis and respiratory onset in the chick chorioallantoic membrane.» *Tiss & Cell.* 27 (1995): 159-166.
- Robbins N., Koch SE., Rubinstein J. «Targeting TRPV1 and TRPV2 for potential therapeutic interventions in cardiovascular disease.» *Transl Res.* 161 (2013): 469-476.
- Roca GQ., Redline S., Claggett B., Bello N., Ballantyne CM., Solomon SD., Shah AM. «Sex-Specific Association of Sleep Apnea Severity With Subclinical Myocardial Injury, Ventricular Hypertrophy, and Heart Failure Risk in a Community-Dwelling Cohort: The Atherosclerosis Risk in Communities-Sleep Heart Health Study.» *Circul.* 132 (2015): 1329-1337.
- Rock MJ., Prenen J., Funari VA., Funari TL., Merriman B., Nelson SF., Lachman RS., Wilcox WR., Reyno S., Quadrelli R., Valgio A., Owsianik G., Janssens A., Voets T., Ikegawa S., Nagai T., Rimo DL., Nilus B., Cohen DH. «Gain-of-function mutations in TRPV4 cause autosomal dominant brachyolmia.» *Nat Genet.* 40 (2008): 999-1003.

- Romero-Corral A., Caples SM., Lopez-Jimenez F., Somers VS. «Interactions Between Obesity and Obstructive Sleep Apnea Implications for Treatment.» *Chest*. 137 (2010): 711–719.
- Rose AJ., Frøsig C., Kiens B., Wojtaszewski JFP., Richter EA. «Effect of endurance exercise training on Ca²⁺–calmodulin-dependent protein kinase II expression and signalling in skeletal muscle of humans.» *J of Physiol*. 583 (2007): 785-795.
- Roveda F., Middlekauff HR., Rondon MU., Reis SF., Souza M., Nastari L., Barretto AC., Krieger EM., Negrao CE. «The effects of exercise training on sympathetic neural activation in advanced heart failure: A randomized controlled trial.» *J Am Coll Cardiol*. 42 (2003): 854–860.
- Ruehland WR., Rochford PD., O'Donoghue FJ., Pierce RJ., Singh P., Thornton AT. «The new AASM criteria for scoring hypopneas: impact on the apnea hypopnea index.» *Sleep*. 32 (2009): 150–157.
- Rutkowski DT., Kaufman RJ. «A trip to the ER: coping with stress.» *Trends Cell Biol*. 14 (2004): 20-28.
- Ryan S., Taylor CT., McNicholas WT. «Selective activation of inflammatory pathways by intermittent hypoxia in obstructive sleep apnea syndrome.» *Circul*. 112 (2005): 2660-2667.
- Javaheri S. «Sleep Apnea: Types, Mechanisms, and Clinical Cardiovascular Consequences.» *J. Am. Coll. Cardiol*. 69 (2017): 841–858.
- Sacchetto R., Bertipaglia I., Giannetti S., Cendron L., Mascarello F., Damiani E., Carafoli E., Zanolini G. «Crystal structure of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA) from bovine muscle.» *Struct Biol*. 17 (2012): 38-44.
- Saleem H., Tovey SC, Molinski TF, Taylor CW. «Interactions of antagonists with subtypes of inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor.» *Br J Pharmacol*. 171 (2014): 3298-3312.
- Sánchez-de-la-Torre M., Campos-Rodriguez F., Barbé F. «Obstructive sleep apnoea and cardiovascular disease.» *Lancet Respir Med*. 1 (2013): 61-72.
- Santulli G, Lewis DR, Marks AR. «Physiology and pathophysiology of excitation-contraction coupling: the functional role of ryanodine receptor.» *J Muscle Res Cell Motil*. 38 (2017): 37-45.
- Sassani A., Findley LJ., Kryger M., Goldlust E., George C., Davidson TM. «Reducing motor-vehicle collisions, costs, and fatalities by treating obstructive sleep apnea syndrome.» *Sleep*. 27 (2004): 453-458.
- Sato C., Hamada K., Ogura T., Miyazawa A., Iwasaki K., Hiroaki Y., Tani K., Terauchi A., Fujiyoshi Y., Mikoshiba K. «Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor contains multiple cavities and L-shaped ligand-binding domains.» *J Mol Biol*. 336 (2004): 155-164.
- Sauzeau V., Le Jeune H., Cario-Toumaniantz C., Smolenski A., Lohmann SM., Bertoglio J., Chardin P., Pacaud P., Loirand G. «Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA-induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle.» *J Biol Chem*. 275 (2000): 1722-1729.

- Sawka MN., Convertino VA., Eichner ER., Schieder SM and Young AJ. «Blood volume : importance and adaptations to exercise training: environmental stresses and trauma/sickness.» *Med Sci Sports Exerc* 32 (2000): 332-348.
- Sayed A., Schierling W, Troidl K, Ruding I., Nelson K, Apfelbeck H, Benli I, Schaper W, Schmitz-Rixen T. «Exercise Linked to Transient Increase in Expression and Activity of Cation Channels in Newly Formed Hind-limb Collaterals.» *Eur J Vasc Endovasc Surg* 40 (2010): 81-87.
- Schaefer M. «Homo- and heteromeric assembly of TRP channel subunits.» *Pflügers Arch.* 451 (2005): 35-42.
- Schäfer H., Koehler U., Ewig S., Hasper E., Tasci S., Lüderitz B. «Obstructive sleep apnea as a risk marker in coronary artery disease.» *Cardiol.* 92 (1999): 79-84.
- Schevzov G., Vrhovski B., Bryce NS, Elmir S., Qiu MR., O'Neill GM., Yang N., Verrills NM., Kavallaris M., Gunning PW. «Tissue-specific tropomyosin isoform composition.» *J Histochem Cytochem.* 53 (2005): 557-570.
- Schuller AP., Green R. «Roadblocks and resolutions in eukaryotic translation.» *Nat. Rev* 34 (2018):1-16.
- Schulte L., Peters D., Taylor J., Navarro J., Kandarian S. «Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ pump expression in denervated skeletal muscle.» *Am J Physiol.* 267 (1994): C617-C622.
- Schulz EM., Wilder T., Chowdhury SAK., Sheikh HN., Wolska BM., Solaro RJ, Wieczorek DF. «Decreasing Tropomyosin Phosphorylation Rescues Tropomyosin-induced Familial Hypertrophic Cardiomyopathy» *J Biol Chem.* 288 (2013): 28925-28935.
- Schwaller B., Meyer M., Schiffmann S. «'New' functions for 'old' proteins: the role of the calcium-binding proteins calbindin D-28k, calretinin and parvalbumin, in cerebellar physiology. Studies with knockout mice.» *Cerebell.* 2002: 241-58.
- Schwartz AR., Patil SP., Laffan AM., Polotsky V., Schneider H., Smith PL. «Obesity and Obstructive Sleep Apnea Pathogenic Mechanisms and Therapeutic Approaches .» *Proc Am Thorac Soc.* 5 (2008): 185–192.
- Seals DR., Walker AE., Pierce GL., Lesniewski LA. «Habitual exercise and vascular ageing.» *J Physiol.* 587 (2009): 5541-5549.
- Searls YM., Loganathan R., Smirnova IV., Stehno-Bittel L. «Intracellular Ca²⁺ regulating proteins in vascular smooth muscle cells are altered with type 1 diabetes due to the direct effects of hyperglycemia.» *Cardiovasc Diabetol.* 9 (2010): 1-8.
- Semelka M., Wilson J., Floyd R. «Diagnosis and Treatment of Obstructive Sleep Apnea in Adults.» *Am Fam Physician.* 94 (2016): 355-360.
- Senaratna C., Perret JL., Lodge C, Lowe A., Campell BE., Matheson MC., Hmailton GS., Dharmage SC. «Prevalence of obstructive sleep apnea: A systemic review.» *Sleep Med Rev.* 34 (2017): 70-81.
- Serysheva II. «Toward a high-resolution structure of IP₃R channel.» *Cell Calc.* 56 (2014): 125-132.

- Sforza E., Hupin D., Pichot V., Barthélémy JC., Roche F. «A 7-year follow-up study of obstructive sleep apnoea in healthy elderly: The PROOF cohort study.» *Respirology*. 22 (2017): 1007-1014.
- Shahar E., Whitney CW., Redline S., Lee ET., Newman AB., Nieto FJ., O'Connor GT., Boland LL., Schwartz JE., Samet JM. «Sleep-disordered breathing and cardiovascular disease: cross-sectional results of the Sleep Heart Health Study.» *Am J Respir Crit Care Med*. 163 (2001): 19-25.
- Shanks J., Herring N., Johnson E., Liu K., Li D., Paterson DJ. «Overexpression of Sarcoendoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2a Promotes Cardiac Sympathetic Neurotransmission via Abnormal Endoplasmic Reticulum and Mitochondria Ca²⁺ Regulation.» *Hypert*. 69 (2017): 625-632.
- Shechter M., Issachar A., Marai I., Koren-Morag N., Freinark D., Shahar Y., Shechter A., Feinberg MS. «Long-term association of brachial artery flow-mediated vasodilation and 718 cardiovascular events in middle-aged subjects with no apparent heart disease.» *Internat. J. of cardiol*. 134 (2009): 52-58.
- Shelton KE., Woodson H., Gay S., Suratt PM. «Pharyngeal fat in obstructive sleep apnea.» *Am Rev Respir Dis*. 148 (1993): 462-466.
- Sheng JJ., Jian-Ping Jin. «TNNI1, TNNI2 and TNNI3: Evolution, regulation, and protein structure–function relationships.» *Gene*. 576 (2016): 385–394.
- Shimoda LA., Polak J. «Hypoxia and ion channel function» *Am J Physiol Cell Physiol*. 300 (2011): C951–C967.
- Shiroma EJ., Lee IM. «Physical Activity and Cardiovascular Health Lessons Learned From Epidemiological Studies Across Age, Gender, and Race/Ethnicity.» *Circul*. 122 (2010): 743-752.
- Shortt CM, Fredsted A., Chow HB., Williams R., Skelly JR., Edge D., Bradford A., O'Halloran KD. «Reactive oxygen species mediated diaphragm fatigue in a rat model of chronic intermittent hypoxia.» *Exp Physiol*. 99 (2014): 688–700.
- Shortt CM., Fredsted A., Bradford A., O'Halloran KD. «Diaphragm muscle remodeling in a rat model of chronic intermittent hypoxia.» *J Histochem Cytochem*. 61 (2013): 487-499.
- Sica AL., Greenberg HE., Ruggiero DA., Scharf SM. «Chronic-intermittent hypoxia: a model of sympathetic activation in the rat.» *Respir Physiol*. 121 (2000): 173-184.
- Simard JM., Tarasov KV., Gerzanich V. «Non-selective cation channels, transient receptor potential channels and ischemic stroke.» *Biochim Biophys*. 1772 (2007): 947-954.
- Sims DE. «The pericyte--a review.» *Tissue Cell*. 18 (1986): 153-174.
- Sindler AL., Delp MD., Reyes R., Wu G., Muller-Delp JM. «Effectsof ageing and exercise training on eNOS uncoupling in skeletal muscle resistance arterioles.» *J Physiol*. 587 (2009): 3885-3897.
- Siu PM., Donley DA., Bryner RW., Alway SE. «Citrate synthase expression and enzyme activity after endurance training in cardiac and skeletal muscles.» *J Appl Physiol*. 94 (2003): 555-660.

- Slart RHJA., Glaudemans AWJM., Hazenberg BPC., Noordzij W. «Imaging cardiac innervation in amyloidosis.» *J Nucl Cardiol.* 1 (2017): 1-14.
- Sleep Apnea Solutions. Qu'est ce que l'apnee du sommeil? 2016. [Https://sleepapneasolutions.ca/fr](https://sleepapneasolutions.ca/fr) (access January 2018).
- Small JV., Fürst DO., Thornell LE. «The cytoskeletal lattice of muscle cells.» *Eur J Biochem.* 208 (1992): 559-72.
- Smith C. «The Elevated Troponin: What else besides ACS could cause troponin elevation?» *emDocs*, (2016).
- Smith TW. «Morgan JP. Excitation-contraction coupling in myocardium.» Wolters Kluwer, London – UK (2017).
- Sokabe T., Fukumi-Tominaga T., Yonemura S., Mizuno A., Tominaga M. «The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes.» *J Biol Chem.* 285 (2010): 18749-18758.
- Solaro RJ. «Myosin light chain phosphatase: a Cinderella of cellular signaling.» *Circ Res.* 87 (2000): 173–175.
- Solutions d'Apnée du Sommeil. Solutions d'apnee du Sommeil. 2016. [Https://sleepapneasolutions.ca/fr](https://sleepapneasolutions.ca/fr) (access January 2018).
- Somers VK., Dyken ME., Clary MP., Abboud FM. «Sympathetic neural mechanisms in obstructive sleep apnea.» *J Clin Invest.* 96 (1995): 1897-1904.
- Somlyo AP., Somlyo AV. «Signal transduction and regulation in smooth muscle.» *Nature.* 372 (1994): 231-236.
- Somlyo AP., Wu X., Lalker LA., Somlyo AV. «Pharmacomechanical coupling: the role of calcium, G-proteins, kinases and phosphatases.» *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 134 (1999): 201– 234.
- Sonkusare SK., Bonev AD., Ledoux J., Liedtke W., Kotlikoff MI., Heppner TJ., Hill-Eubanks DC., Nelson MT. «Elementary Ca²⁺ signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function.» *Science.* 336 (2012): 597-601.
- Sontam DM., Firth EC, Tsai P, Vickers MH & O'Sullivan JM. «Different exercise modalities have distinct effects on the integrin-linked kinase (ILK) and Ca²⁺ signaling pathways in the male rat bone.» *Physiol Rep* 3 (2015): e12568.
- Stabouli S., Kotsis V., Karagianni C., Zakopoulos N., Konstantopoulos A. «Blood pressure and carotid artery intima-media thickness in children and adolescents: the role of obesity.» *Hellenic J Cardiol.* 53 (2012): 41-47.
- Spier SA, Laughlin MH, Delp MD. «Effects of acute and chronic exercise on vasoconstrictor responsiveness of rat abdominal aorta.» *Am. J. of physiol.* 87 (1999): 1752-1757.
- Squire JM. *Muscle Contraction: Regulation.* eLS John Wil., California – USA (2010).
- Stamatakis E., Hamer M., O'Donovan G., Batty GD., Kivimaki M. «A non-exercise testing method for estimating cardiorespiratory fitness: associations with all-cause and cardiovascular mortality in a pooled analysis of eight population-based cohorts.» *Eur Heart J.* 34 (2013): 750-758.

- Stammers NA., Susser SE., Hamm NC., Hlynsky MW., Kimber D., Kehler S., Duhamel Andrew N. Stammers, Shanel E. Susser, Naomi C. Hamm, Michael W. Hlynsky, Dustin E. Kimber, D. Scott Kehler, Duhamel TA. «The regulation of sarco(endo)plasmic reticulum calcium-ATPases (SERCA).» *Canad J of Physiol & Pharmacol.* 93 (2015): 843-854.
- Stewart IB., McKenzie DC. «The human sleep during physiological stress.» *Sports Med* 32 (2002): 361–369.
- Stokes K. «Skeletal muscle: from molecules to movement.» *Br J Sports Med.* 40 (2006): 950-952.
- Sugama K., Suzuki K., Yoshitani K., Shiraiishi K., Miura S., Yoshioka H., Mori Y., Kometani T. «Changes of thioredoxin, oxidative stress markers, inflammation and muscle/renal damage following intensive endurance exercise.» *Exerc Immunol Rev.* 21 (2015): 130–142.
- Sugawara J., Komine H., Hayashi K., Yoshizawa M., Otsuki T., Shimojo N., Miyauchi T., Yokoi T., Maeda S., Tanaka H. «Systemic α -adrenergic and nitric oxide inhibition on basal limb blood flow: Effects of endurance training in middle-aged and older adults.» *Am J Physiol.* 293 (2007): H1466–H1472.
- Sun CY, Qi SS, Lou XF, Sun SH, Wang X, Dai KY, Hu SW, Liu NB. « Changes of learning, memory and levels of CaMKII, CaM mRNA, CREB mRNA in the hippocampus of chronic multiple-stressed rats.» *Chi. Med.* 119 (2006): 140-147.
- Sun MY., Geyer M., Komarova YA. «IP3 receptor signaling and endothelial barrier function.» *Cell Mol Life Sci.* 74 (2017): 4189-4207.
- Svensson M., Holmstrom M., Broman JE., Lindberg E. «Can anatomical and functional features in the upper airways predict sleep apnea? A population-based study in females.» *Acta Otolaryngol.* 126 (2006): 613-620.
- Swedish Council on Health Technology Assessment. «Methods of Promoting Physical Activity: A Systematic Review.» SBU Yellow Report - Swedish Council on Health Technology Assessment (SBU), Stockholm, Sweden (2007).
- Szymanski PT., Chacko TK, Rovner AS, Goyal RK. «Differences in contractile protein content and isoforms in phasic and tonic smooth muscles.» *Am J Physiol.* 275 (1998): C684-C692.
- Tabuchi K., Suzuki M, Mizuno A, Hara A. «Hearing impairment in TRPV4 knockout mice.» *Neurosci Lett* 382 (2005): 304–308.
- Taggart MJ. «Smooth Muscle Excitation-Contraction Coupling: a Role for Caveolae and Caveolins?» *Physiol.* 16 (2001): 61-65.
- Takeshima H., Nishimura S, Matsumoto T, Ishida H, Kangawa K, Minamino N, Matsuo H, Ueda M, Hanaoka M, Hirose T. «Primary structure and expression from complementary DNA of skeletal muscle ryanodine receptor.» *Nature.* 339 (1989): 439-445.
- Tamisier R., Pepin JL, Remy J., Baguet JP., Taylor JA, Weiss JW & Levy P. «14 nights of intermittent hypoxia elevate daytime blood pressure and sympathetic activity in healthy humans.» *Eur Respir J* 37 (2011): 119–128.

- Tasker PN., Taylor CW., Nixon GF. «Expression and distribution of InsP3 receptor subtypes in proliferating vascular smooth muscle cells.» *Biochem Biophys Res Comm.* 273 (2000): 907– 912.
- Taylor CW, Konieczny V. «IP3 receptors: take four IP3 to open.» *Sci Signal.* 9 (2016): pe1-pe2.
- Taylor CW., Tovey SC. «IP3 Receptors: Toward Understanding Their Activation.» *CSH Pers in Biol.* 12 (2010): a004010-a004010.
- Tennant M., McGeachie JK. «Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances.» *Aust N Z J Surg.* 60 (1990): 747-753.
- Termin A., Pette D. «Changes in myosin heavy-chain isoforms synthesis of chronically stimulated rat fast twitch muscle.» *Eur. J. Biochem* 204 (1992): 569-573.
- The Cost of CVD. «The Cost of CVD | Champion Advocates Programme.» (2017). [Http://www.championadvocates.org/en/champion-advocates-programme/the-costs-of-cvd](http://www.championadvocates.org/en/champion-advocates-programme/the-costs-of-cvd).
- Thijssen DH., Ellenkamp R., Kooijman M., Pickkers P., Rongen GA., Hopman MT., Smits P. «A causal role for endothelin-1 in the vascular adaptation to skeletal muscle deconditioning in spinal cord injury.» *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27 (2007): 325– 331.
- Thomas A., Belaidi E., Moulin S., Horman S., Van Der Zon GC., Viollet B., Levy P., Bertrand L., Pepin JL., Godin-Ribuot D., Guigas B. «Chronic Intermittent Hypoxia Impairs Insulin Sensitivity but Improves Whole-Body Glucose Tolerance by Activating Skeletal Muscle AMPK.» *Diabetes.* 66 (2017): 2942-2951.
- Thomas BJ., Wanstall JC. «Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia.» *Eur J Pharmacol.* 477 (2003): 153-161.
- Thompson PD., Buchner D., Pina IL., Balady GJ., Williams MA., Marcus BH., Berra K., Blair SN., Costa F., Franklin B., Fletcher GF., Gordon NF., Pate RR., Rodriguez BL., Yancey AK., Wenger NK. «Exercise and physical activity in the prevention and treatment of atherosclerotic cardiovascular disease: a statement from the Council on Clinical Cardiology (Subcommittee on Exercise, Rehabilitation, and Prevention) and the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism (Subcommittee on Physical Activity).» *Circul.* 107 (2003): 3109-3116.
- Thorne GD., Paul RJ. «Effects of organ culture on arterial gene expression and hypoxic relaxation: role of the ryanodine receptor.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 284 (2003): C999–C1005.
- Thorneloe KS., Cheung M., Bao W., Alsaïd H., Lenhard S., Jian MY., Costell M., Maniscalco-Hauk K., Krawiec JA., Olzinski A., Gordon E., Lozinskaya I, Elefante L., Qin P., Matasic DS., James C., Tunstead J., Donovan B., Kallal L., Waszkiewicz A., Vaidya K., Davenport EA., Larkin J., Burgert M., Casillas LN., Marquis RW., Ye G., Eidam HS., Goodman KB., Toomey JR., Roethke TJ., Jucker BM., Schnackenberg CG., Townsley MI., Lepore JJ., Willette RN. «An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure.» *Sci Transl Med.* 4 (2012): 148-159.

- Tjondrokoesoemo A, Li N, Lin PH, Pan Z, Ferrante CJ, Shirokova N, Brotto M, Weisleder N, Ma J. «Type 1 inositol (1,4,5)-trisphosphate receptor activates ryanodine receptor 1 to mediate calcium spark signaling in adult mammalian skeletal muscle.» *J Biol Chem.* 288 (2013): 2103-2109.
- Tonge DP., Bardsley RG., Parr T., Maciewicz RA., Jones SW. «Evidence of changes to skeletal muscle contractile properties during the initiation of disease in the ageing guinea pig model of osteoarthritis.» *Longv & Healthspan.* 2 (2013): 1-15.
- Torres G., Sánchez-de-la-Torre M., Barbé F. «Relationship Between OSA and Hypertension.» *Chest.* 148 (2015): 824-832.
- Tortora G., Grabowski SR. «Principes d'anatomie te de physiologie.» Deboeck Université, Bruxelles – Belgium (2001).
- Townsend N., Wilson L., Bhatnagar P., Wickramasinghe K., Rayner M., Nichols M. «Cardiovascular Disease In Europe: Epidemiological Update.» *Eur Heart J.* 37 (2016): 3232-3245.
- Toyoshima C., Nakasako M., Nomura H., Ogawa H. «Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution.» *Nature.* 405 (2000): 647-655.
- Trachsel LD. «Physical activity and exercise training in preventive cardiology.» *Swiss Sports & Exe. Med.* 64 (2016): 6–12.
- Trzepizur W., Priou P., Meslier N., Urban T., Martínez MC., Andriantsitohaina R., Gagnadoux F. «Vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea: Implication of microparticules.» *Rev Pneumol Clin.* 73 (2017): 306-308.
- Tu H., Wang Z., Nosyreva E., De Smedt H., Bezprozvanny I. «Functional characterization of mammalian inositol 1,4,5-trisphosphate receptor isoforms.» *Biophys J.* 88 (2005): 1046–1055.
- Tucker WD., Bhimji SS. «Anatomy, Blood Vessels.» *StatPearls.* 1 (2017): 1-3.
- Turnbull CD. «Intermittent hypoxia, cardiovascular disease and obstructive sleep apnoea.» *Thor. Disease J.* 10 (2017): S33-S39.
- Tykocki NR., Thompson JM., Jackson WF., Watts SW. «Ryanodine receptors are uncoupled from contraction in rat vena cava.» *Cell Calc.* 53 (2013): 112–119.
- UniProt. UniProt.org. 2018. [Http: //www.uniprot.org/uniprot/Q93084](http://www.uniprot.org/uniprot/Q93084) (access January 2018).
- Urdampilleta A, González-Muniesa P, Portillo MP, Martínez JA. «Usefulness of combining intermittent hypoxia and physical exercise in the treatment of obesity.» *J Physiol Biochem.* 68 (2012): 289-304.
- Ursu D., Sebille S., Dietze B., Freise D., Flockerzi V., and Melzer W. «Excitation–contraction coupling in skeletal muscle of a mouse lacking the dihydropyridine receptor subunit $\gamma 1$.» *J of Physiol.* 533 (2001): 367-377.
- Vallot O., Combettes L., Jourdon P., Inamo J., Marty I., Claret M., Lompré AM. «Intracellular Ca^{2+} handling in vascular smooth muscle cells is affected by proliferation.» *Arteriosc Thromb Vasc Biol.* 20 (2000): 1225-1235.

- Van Guilder GP., Westby CM., Greiner JJ., Stauffer BL., De- Souza CA. «Endothelin-1 vasoconstrictor tone increases with age in healthy men but can be reduced by regular aerobic exercise.» *Hypertension* 50 (2007): 403–409.
- Van Vleet JF., Victor J. Ferrans, Eugene Herman. «Cardiovascular and Skeletal Muscle Systems.» In *Toxicological Pathology* (2nd edition). Elsevier, 2002.
- Venkatachalam K., Montell C. «TRP channels.» *Annu Rev Biochem.* 76 (2007): 387-417.
- Vennekens R., Owsianik G., Nilius B. «Vanilloid transient receptor potential cation channels: an overview.» *Curr Pharm Des.* 14 (2008): 18-31.
- Ventura-Clapier R., De Sousa E., Veksler V. «Metabolic myopathy in heart failure. .» *News Physiol Sci* 17 (2002): 191–196.
- Vervloessem T., Yule DI., Bultynck G., Parys JB. «The type 2 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, emerging functions for an intriguing Ca^{2+} -release channel.» *Biochim Biophys Acta.* 1853 (2015): 1992-2005.
- Vetterkind S., Morgan KG. «Regulation of Smooth Muscle Contraction.» *Muscle.* Chapter 87 (2012): 1173-1180.
- Vindin H., Gunning P. «Cytoskeletal tropomyosins: choreographers of actin filament functional diversity.» *J Muscle Res Cell Motil.* 34 (2013): 261-274.
- Vogt M., Puntschart A., Geiser J., Zuleger C., Billeter R., Hoppeler H. «Training high – living low : Molecular adaptations in human skeletal muscle to endurance training under simulated high-altitude conditions.» *Applied Physiol J.* 91 (2001): 173–182.
- Von der Ecken J., Muller M., Lehman W., Manstein DJ., Penczek PA., Raunser S. «Structure of the F-actin—tropomyosin complex .» *Nature* 033 (2014): 1-17.
- Vriens J, Nilius B., Vennekens R. «Herbal compounds and toxins modulating TRP channels.» *Curr Neuropharmacol.* 6 (2008): 79–96.
- Vriens J., Appendino G., Nilius B. «Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels.» *Mol Pharmacol.* 75 (2009): 1262-1279.
- Wada M., Kuratani M, and Kanzaki K. «Calcium kinetics of sarcoplasmic reticulum and muscle fatigue.» *J Phys Fitness Sports Med* 2 (2013): 169-178.
- Wakizaka M., Eshima H., Tanaka Y., Shirakawa H., Poole DC., Kano Y. «In vivo Ca^{2+} dynamics induced by Ca^{2+} injection in individual rat skeletal muscle fibers.» *Physiol Rep.* 5 (2017): e13180.
- Wall H., Smith C., Hubbard R. «Body mass index and obstructive sleep apnoea in the UK: a cross-sectional study of the over-50s.» *Prim Care Respir J.* 21 (2012): 371-376.
- Waller BF., Gering LE, Branyas NA., Slack JD. «Anatomy, Histology, and Pathology of the Cardiac Conduction System.» *Clin. Cardiol* 16 (1993): 249-252.
- Walsh MP. «Contractile Proteins of Smooth Muscle.» In *Physiology and Pathophysiology of the Heart. Developments in Cardiovascular Medicine.* Springer, CA - USA (1989).
- Wang CLA., Coluccio LM. «New Insights into the Regulation of the Actin Cytoskeleton by Tropomyosin.» *Int Rev Cell Mol Biol.* 281 (2010): 91–128.

- Wang H., Patterson C., Riascos-Bernal DF., Sibinga NES. «Vascular Smooth Muscle Cells.» In *Atherosclerosis: Risks, Mechanisms, and Therapies*. John Wiley, London, UK (2015).
- Wang H., Zhu HF., Xia R., Zhou ZN., Zhu PH. «Effect of intermittent and continuous hypoxia on ryanodine receptors of rat heart.» *Life Sci.* 73 (2003): 2151-2160.
- Wang S., Trumble WR., Liao H., Wesson CR., Dunker AK., Kang CH. «Crystal structure of calsequestrin from rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.» *Nat Struct Biol.* 5 (1998): 476-483.
- Wang Y., Chen J., Wang Y., Taylor CW., Hirata Y., Hagiwara H., Mikoshiba K., Toyooka T., Omata M., Sakaki Y. «Crucial role of type 1, but not type 3, inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptors in IP₃-induced Ca²⁺ release, capacitative Ca²⁺ entry, and proliferation of A7r5 vascular smooth muscle cells.» *Circ Res.* 88 (2001): 202– 209.
- Warburton DER., Nicol CW., Bredin SSD. «Health benefits of physical activity: the evidence.» *CMAJ.* 174 (2006): 801–809.
- Watanabe H., Vriens J., Prenen J., Droogmans G., Voets T., Nilius B. « Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. » *Nature* 424 (2003): 434–438.
- Webb RC. «Smooth muscle contraction and relaxation.» *Adv Physiol Educ.* 27 (2003): 201-206.
- Wei B., Jin JP. «TNNT1, TNNT2, and TNNT3: Isoform genes, regulation, and structure–function relationships Author links open overlay panel.» *Gene.* 582 (2016): 1-13.
- Wes PD., Chevesich J., Jeromin A., Rosenberg C., Stetten G., Montell C. «TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel.» *Proc Natl Acad Sci USA.* 92 (1995): 9652-9656.
- Westcott EB., Goodwin EL., Segal SS., Jackson WF. «Function and expression of ryanodine receptors and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in smooth muscle cells of murine feed arteries and arterioles.» *J of Physiol.* 590 (2012): 1849–1869.
- Wickramasinghe CD., Ayers CR., Das S., de Lemos JA., Willis BL., Berry JD. «Prediction of 30-year risk for cardiovascular mortality by fitness and risk factor levels: the Cooper Center Longitudinal Study.» *Circ Cardiovasc Qual Outcomes.* 7 (2014): 597-602.
- Wilkerson MK., Heppner TJ., Bonev AD., Nelson MT. «Inositol trisphosphate receptor calcium release is required for cerebral artery smooth muscle cell proliferation.» *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 290 (2006): H240-H247.
- Wilkins E., Wilson L., Wickramasinghe K., Bhatnagar P., Leal J., Luengo-Fernandez R., Burns R., Rayner M., Townsend N. «European Cardiovascular Disease Statistics.» European Heart Network. Brussels, Belgium (2017).
- Willette RN., Bao W., Nerurkar S., Yue TL., Doe CP., Stankus G., Tumer GH., Ju H., Thomas H., Fishman CE., Sulpizio A., Behm DJ., Hoffman S., Lin Z., Lozinskaya I., Casillas LN., Lin M., Trout RE. Votta BJ., Thomeloe K. , Lashinger ES., Figueroa DJ., Marquis R, Xu X. «Systemic activation of the transient receptor potential vanilloid

subtype 4 channel causes endothelial failure and circulatory collapse.» *J Pharmacol Exp Ther.* 326 (2008): 443-452.

- Williams JK., Heistad DD. «The vasa vasorum of the arteries.» *J Mal Vasc.* 21 (1996): 266-269.
- Wimms A., Ketheeswaran S., Ramanan D., Armitstead J., Woehrle H. «Gender Differences in Obstructive Sleep Apnea.» *Obstructive Sleep Apnea from smgebooks* 1 (2016):1-11.
- Winquist RJ., Webb RC., Bohr DF. «Calcium antagonism is no rose.» *Federation Proc.* 40, (1981): 2852-2854.
- Witzcak CA., Wamhoff BR., Sturek M. «Exercise training prevents Ca²⁺ dysregulation in coronary smooth muscle from diabetic dyslipidemic yucatan swine.» *J Appl Physiol:* 101 (2006): 752–762.
- Wong HS., Williams AJ., Mok Y. «The relationship between pulmonary hypertension and obstructive sleep apnea.» *Curr Opin Pulm Med.* 23 (2017): 517-521.
- Woodman CR., Turk JR., Rush JW., Laughlin MH. «Exercise attenuates the effects of hypercholesterolemia on endothelium-dependent relaxation in coronary arteries from adult female pigs.» *J Appl Physiol.* 96 (2004): 1105-1113.
- Woodman CR., Turk JR., Rush JW., Laughlin MH. «Exercise training preserves endothelium-dependent relaxation in brachial arteries from hyperlipidemic pigs.» *J Appl Physiol.* 94 (2003): 2017-2026.
- Woodrum DA., Brophy CM. «The paradox of smooth muscle physiology.» *Mol Cell Endocrinol* 177 (2001): 135–143.
- World Health Organisation - Fact sheet. *Maladies Cardiovasculaires.* (2015). [Http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/fr/) (access April 2017).
- World Health Organization - CVDs. *Cardiovascular Diseases (Cvds).* (2016). World Health Organization. [Http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/](http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/).
- World Health Organization. «Global Status Report On Noncommunicable Diseases.» (2014). [Http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/](http://www.who.int/nmh/publications/ncd-status-report-2014/en/).
- Wray S., Burdya T. «Sarcoplasmic reticulum function in smooth muscle.» *Physiol Rev.* 90 (2010): 113-178.
- Wu QF., Qian C., Zhao N., Dong Q., Li J., Wang BB., Liao YH. «Activation of transient receptor potential vanilloid 4 involves in hypoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes.» *Cell Death & Disease* 8 (2017): 2828-2840.
- Wuytack F., Raeymaekers L., Missiaen L. «Molecular physiology of the SERCA and SPCA pumps.» *Cell Calcium* 32 (2002): 279-305.
- Xu XM., Yao D., Cai XD., Ding C., Lin QD., Wang LX., Huang XY. «Effect of chronic continual- and intermittent hypoxia-induced systemic inflammation on the cardiovascular system in rats.» *Sleep B.* (2014): 677-684.
- Yaggi HK., Concato J., Kernan WN., Lichtman JH., Brass LM., Mohsenin V. «Obstructive sleep apnea as a risk factor for stroke and death.» *N Engl J Med.* 353 (2005): 2034-2041.

- Yan Z., Bai X., Yan C., Wu J., Li Z., Xie T., Peng W., Yin C., Li X., Scheres SHW., Shi Y., and Yan N. «Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution.» *Nature*. 517 (2015): 50-55.
- Yang XR, Lin AH, Hughes JM, Flavahan NA, Cao YN, Liedtke W, Sham JS. «Upregulation of osmo-mechanosensitive TRPV4 channel facilitates chronic hypoxia-induced myogenic tone and pulmonary hypertension.» *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302 (2012): L555-L568.
- Yang XR, Lin MJ., Yip KP., Jeyakumar LH., Fleischer S., Leung GP., Sham JS. «Multiple ryanodine receptor subtypes and heterogeneous ryanodine receptor-gated Ca²⁺-stores in pulmonary arterial smooth muscle cells.» *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289 (2005): L338–L348.
- Yang XR., Lin MJ., McIntosh LS., Sham JS. «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 (2006): L1267-1276.
- Yang Z., Yamazaki, M., Shen, Q.W., & Swartz, D.R. «Differences between Cardiac and Skeletal Troponin Interaction with the Thin Filament Probed by Troponin Exchange in Skeletal Myofibrils.» *Biophysical J*. 97 (2009): 183–194.
- Ye Win Oo, Nieves Gomez-Hurtado, Kafa Walweel, Dirk F. van H. «Essential Role of Calmodulin in RyR Inhibition by Dantrolene.» *Mol Pharmacol*. 88 (2015): 57-63.
- Yea Q., Weia Y., Fischera R., Bornerb C., Berchtolda MW. «Expression of calmodulin and calmodulin binding proteins in rat fibroblasts stably transfected with protein kinase C and oncogenes.» *BBA - Mol. Cell Research* 1359 (1997): 89-96.
- Yellin H. «Neural regulation of enzymes in muscles fibres of red and white muscle.» *Exp. Neurol* 19 (1979): 92-103.
- Yin J., Kuebler WM. «Mechanotransduction by TRP channels: general concepts and specific role in the vasculature.» *Cell Biochem Biophys*. 56 (2010): 1-18.
- Yokoyama T., Nakamuta N., Kusakabe T., Yamamoto Y. «Sympathetic regulation of vascular tone via noradrenaline and serotonin in the rat carotid body as revealed by intracellular calcium imaging.» *Brain Res*. 1596 (2015): 126-135.
- Young T, Skatrud J., Peppard PE. «Risk factors for obstructive sleep apnea in adults.» *JAMA*. 291 (2004): 2013-2016.
- Young T., Peppard PE., Gottlieb DJ. «Epidemiology of obstructive sleep apnea: a population health perspective.» *Am J Respir Crit Care Med*. 165 (2002): 1217-1239.
- Yu H., Clarke MCH., Figg N., Littlewood TD., Bennett MR. «Smooth Muscle Cell Apoptosis Promotes Vessel Remodeling and Repair via Activation of Cell Migration, Proliferation, and Collagen Synthesis.» *Arterioscler Thromb and Vasc Biol*. 11 (2011): 2402-2409.
- Yuan G., Nanduri J., Bhasker CR., Semenza GL., Prabhakar NR. «Ca²⁺/calmodulin kinase-dependent activation of hypoxia inducible factor 1 transcriptional activity in cells subjected to intermittent hypoxia.» *J Biol Chem*. 280 (2005): 4321–4432.

- Yuan G., Nanduri J., Khan S., Semenza GL., Prabhakar NR. «Induction of HIF-1 α Expression by Intermittent Hypoxia: Involvement of NADPH oxidase, Ca²⁺ signaling, Prolyl hydroxylases, and mTOR.» *J Cellular Physiol.* 217 (2008): 674-685.
- Zacour ME., Teoh H, Halayko AJ, Ward ME. «Mechanisms of aortic smooth muscle hyporeactivity after prolonged hypoxia in rats.» *J Appl Physiol* 92 (2002): 2625–2632.
- Zalk R., Lehnart SE., Marks AR. «Modulation of the ryanodine receptor and intracellular calcium.» *Annu Rev Biochem.* 76 (2007): 367-385.
- Zaninetti R., Fomarelli A., Ciarletta M., Lirri D., Caldarelli A., Pirai T., Cariboni A., Owsianik G., Nilius B., Canonico PL., Distasi C., Genazzani AA. «Activation of TRPV4 channels reduces migration of immortalized neuroendocrine cells.» *Neurochem J.* 116 (2011): 606-615.
- Zhang SJ., Bruton JD., Katz A., Westerblad H. «Limited oxygen diffusion accelerates fatigue development in mouse skeletal muscle.» *J Physiol.* 572 (2006): 551–559.
- Zhang Y., Chen HS., Khanna VK., De Leon S., Phillips MS., Schappert K., Britt BA., Browell AK., MacLennan DH. «A mutation in the human ryanodine receptor gene associated with central core disease.» *Nat Genet.* 5 (1993): 46-50.
- Zhao F., Li P, Chen SR, Louis CF, Fruen BR. «Dantrolene inhibition of ryanodine receptor Ca²⁺ release channels. Molecular mechanism and isoform selectivity.» *J Biol Chem.* 276 (2001): 13810-13816.
- Zhao G., Adebisi A., Blaskova E., Xi Q., Jaggar JH. «Type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptors mediate UTP-induced cation currents, Ca²⁺ signals, and vasoconstriction in cerebral arteries.» *Am J Physiol Cell Physiol.* 295 (2008): C1376– C1384.
- Zhao PJ., Pan J., Li F., Sun K. «Effects of chronic hypoxia on the expression of calmodulin and calcicum/calmodulin-dependent protein kinase II and the calcium activity in myocardial cells in young rats.» *Zh. Da. Dai Er Ke* 10 (2008): 381-385.
- Zheng J. «Molecular Mechanism of TRP Channels.» *Compr Physiol.* 3 (2013): 221–242.
- Zheng YM, Wang QS, Liu QH, Rathore R, Yadav V, Wang YX. «Heterogeneous gene expression and functional activity of ryanodine receptors in resistance and conduit pulmonary as well as mesenteric artery smooth muscle cells.» *J Vasc Res.* 45 (2008): 469-479.
- Zheng YM., Wang QS., Rathore R., Zhang WH., Mazurkiewicz JE., Sorrentino V., Singer HA., Kotlikoff MI., Wang YX. «Type-3 ryanodine receptors mediate hypoxia-, but not neurotransmitter-induced calcium release and contraction in pulmonary artery smooth muscle cells.» *J Gen Physiol* 125 (2005): 427–440.
- Zhou H., Nakamura T., Matsumoto N., Hisatsune C., Mizutani A., Iesaki T., Daida H., Mikoshiba K. «Predominant role of type 1 IP₃ receptor in aortic vascular muscle contraction.» *Biochem Biophys Res Commun.* 369 (2008): 213– 219.
- Zhou Z., Hong EJ., Cohen S., Zhao WN., Ho HY., Schmidt L., Chen WG., Lin Y., Savner E., Griffith EC., Hu L., Steen JA., Weitz CJ., Greenberg ME. «Brain-specific phosphorylation of MeCP2 regulates activity-dependent Bdnf transcription, dendritic growth, and spine maturation.» *Neuron.* 52 (2006): 255-269.

- Zhu X., Chu PB., Peyton M., Birnbaumer L. «Molecular cloning of a widely expressed human homologue for the Drosophila trp gene.» FEBS Lett. 373 (1995): 193-8.
- Ziaaldini MM., Hosseini SR., Fathi M. «Mitochondrial adaptations in aged skeletal muscle: effect of exercise training.» Physiol Res. 66 (2017): 1-14.
- Ziomek G., van Breemen C., Esfandiarei M. «Measurement of Calcium Fluctuations Within the Sarcoplasmic Reticulum of Cultured Smooth Muscle Cells Using FRET-based Confocal Imaging.» J.Vis. Exp. 112 (2016): 2016.
- Zoltani CK. «Cardiovascular toxicity biomarkers.» In Biomarkers in Toxicology. Elsevier, (2014).
- Zorzato F., Fujii J., Otsu K., Phillips M., Green NM., Lai FA., Meissner G., MacLennan DH. «Molecular cloning of cDNA encoding human and rabbit forms of the Ca²⁺ release channel (ryanodine receptor) of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum.» J Biol Chem. 265 (1990): 2244-2256